

Aus der Klinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie  
des Universitätsklinikums des Saarlandes  
(Direktor: Univ. –Professor Dr. Thomas Volk)

Endogene und exogene Melatoninexposition vermindern hepatisches MT-1-  
Rezeptorprotein nach hämorrhagischem Schock

-eine tierexperimentelle Untersuchung-

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes  
2010

vorgelegt von:  
Paul Günther Baptist Heymann  
geboren am 17.08.1984 in Mainz

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Kapitel: Zusammenfassung</b> .....	4
1.1. Endogene und exogene Melatoninexposition vermindern das MT-1-Rezeptorprotein in der Leber nach hämorrhagischem Schock .....	4
1.2. Endogenous and exogenous melatonin exposure attenuates hepatic MT-1 Melatonin receptor protein after hemorrhagic shock in rat .....	7
<b>2. Kapitel: Einleitung</b> .....	9
2.1. Melatonin und das zirkadiane System .....	9
2.1.2. Rolle der Melatoninproduktion für das zirkadiane System.....	11
2.1.3. Regulation der Melatoninsynthese .....	12
2.2. Melatoninrezeptoren .....	12
2.2.1. Signaltransduktion der Melatoninrezeptoren.....	14
2.2.1.1. Regulation der Adenylatzyklaseaktivität .....	14
2.2.1.2. Regulation der Phospholipase C-Aktivität.....	14
2.2.1.3. Regulation der Phospholipase A2 Aktivität.....	15
2.2.1.4. Regulation des zellulären cGMP-Levels .....	15
2.2.1.5. Regulation von Kalium- und Kalziumkanälen .....	15
2.2.1.5.1. Kaliumkanäle .....	16
2.2.1.5.2. Kalziumkanäle .....	16
2.2.1.6. Der MT-3-Rezeptor .....	16
2.2.2. Lokalisation der Melatoninrezeptoren .....	17
2.2.3. Regulation der Melatoninrezeptoren .....	17
2.3. Organprotektion durch Melatonin .....	18
2.3.1. Direkte antioxidative Wirkung .....	18
2.3.2. Die indirekte antioxidative Wirkung.....	19
2.3.3. Folgen der antioxidativen Wirkung für die Mitochondrien .....	21
2.4. Melatoninrezeptoragonist Ramelteon .....	22
2.5. Fragestellung dieser Arbeit.....	22
<b>3. Kapitel: Material und Methodik</b> .....	25
3.1. Material .....	25
3.1.1. Tiere.....	25
3.1.2. Medikamente und Chemikalien .....	25
3.2. Methodik .....	25
3.2.1. Hämorrhagisches Schockmodell .....	25
3.2.2. Narkose .....	26
3.2.3. Chirurgisches Vorgehen.....	26
3.2.4. Schockeinleitung und Schockaufrechterhaltung .....	27
3.2.5. Hämodynamik.....	27
3.2.6. Leberentnahme.....	27
3.2.7. Versuchstiergruppen .....	28
3.2.8. RNA-Isolierung .....	28
3.2.9. RNA-Qualitätskontrollen.....	29
3.2.9.1. Photometrische Konzentrationsbestimmung.....	29
3.2.9.2. Agarosegelelektrophorese der Gesamt-RNA .....	29
3.2.9.3. RNA-Integritätsnummer (RIN).....	30
3.2.10. Real-Time-Quantitative Polymerase Chain Reaction (RTq-PCR) ....	30
3.2.10.1. Prinzip der RT-PCR.....	30
3.2.10.2. Durchführung der Reversen Transkription.....	31
3.2.10.3. Durchführung der RTq-PCR.....	31

3.2.10.4. Durchführung der Auswertung der RTq-PCR.....	31
3.2.11. Western Immunoblot Analyse .....	31
3.2.12. Immunhistochemische Färbung .....	33
3.2.12.1. Probenaufbereitung.....	33
3.2.12.2. Prinzip der immunhistochemischen Färbung .....	33
3.2.12.3. Durchführung der Labeled-Streptavidin-Biotin/Horseradish- Peroxidase-Färbung (LSAB/HRP).....	34
3.2.13. Melatonin ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) .....	34
3.2.14. Statistische Auswertung.....	35
4. Kapitel: Ergebnisse .....	36
4.1. Hämorrhagisches Schockmodell: Makrohämodynamische Effekte.....	36
4.2. Blutgasanalyse.....	38
4.3. Plasmamelatonin Spiegel .....	40
4.4. Melatoninrezeptor mRNA .....	41
4.5. Melatoninrezeptorprotein .....	43
4.6. Räumliches Expressionsmuster von Melatoninrezeptoren .....	44
5. Kapitel: Diskussion .....	49
5.1. Zusammenfassung der Ergebnisse.....	49
5.2. Plasmamelatonin Spiegel .....	50
5.3. RTq-PCR der MT-1-Rezeptor mRNA .....	51
5.4. Westernimmunoblotanalyse des MT-1-Rezeptorproteins .....	51
5.5. Expressionsmuster der MT-1-Rezeptoren bei Sham/Vehikel-Tieren .....	52
5.6. Expressionsmuster der MT-1-Rezeptoren nach Melatonin- oder Ramelteongabe .....	53
5.7. Verminderung der membranären MT-1-Rezeptordichte nach Agonistenexposition.....	55
5.8. MT-2-Rezeptorprotein .....	57
5.9. Molekulare Erklärung für die MT-1-Rezeptorinternalisierung .....	58
5.10. Schlussfolgerung.....	59
6. Kapitel: Literaturverzeichnis .....	60
7. Kapitel: Danksagung .....	79
8. Kapitel: Lebenslauf.....	79

# 1. Kapitel: Zusammenfassung

## 1.1. Endogene und exogene Melatoninexposition vermindern das MT-1-Rezeptorprotein in der Leber nach hämorrhagischem Schock

Melatonin ist ein epiphysäres Hormon, dessen Synthese einem zirkadianen Rhythmus unterliegt. Der Melatoninspiegel im Blut übernimmt somit die Funktion eines hormonellen Zeitgebers. Daneben konnte schon in zahlreichen oxidativen Stressmodellen gezeigt werden, dass dieses Hormon beispielsweise für Herz, Magen, Leber und Gehirn protektiv wirkt. Hauptverantwortlich hierfür scheinen nicht seine direkten antioxidativen Eigenschaften als Radikalfänger zu sein, sondern die Aktivierung membranärer Melatoninrezeptoren. Die Rezeptorabhängigkeit wurde durch die antagonistische Wirkung des Melatoninrezeptorantagonisten Luzindole gezeigt, oder aber durch Applikation des selektiven Agonisten Ramelteon, der selbst keine direkten antioxidativen Eigenschaften besitzt, aber ebenfalls protektiv wirkt. Durch mehrere Arbeitsgruppen wurde bereits Melatoninrezeptor-messenger ribonucleinacid (mRNA) in der Leber der Ratte identifiziert, wobei Uneinigkeit über die Existenz beider membranärer Subtypen in der Leber herrscht. In *in vitro* Versuchen mit humanen rekombinanten membranären Melatoninrezeptoren beobachtete man eine Rezeptordesensibilisierung und Internalisierung bei Zelllinien, die man bei physiologischen und pharmakologischen Melatoninkonzentrationen inkubierte.

Wie nun die Melatoninrezeptoren innerhalb der Leber räumlich exprimiert werden und welche regulatorischen Einflüsse die Gabe eines Agonisten *in vivo* auf ihre Expression in der Leber der Ratte hat, ist nicht bekannt. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, das räumliche Verteilungsmuster, die Gen- und Proteinexpression von hepatischen Melatoninrezeptoren unter endogener und exogener Melatoninexposition in einem Modell des hämorrhagischen Schocks und der Reperfusion bei der Ratte zu untersuchen.

Die Untersuchungen wurden an anästhesierten, spontan atmenden männlichen Sprague-Dawley-Ratten durchgeführt. Für alle Versuchsgruppen wurde  $n = 5$  gesetzt. Die Tiere wurden einem 90-minütigen hämorrhagischen Schock (Mean Arterial Pressure (MAP) = mittlerer arterieller Druck = 30-40 mmHg) mit

anschließender intravenöser Therapie mit Vehikellösung, Melatonin oder Ramelteon unterzogen. Daran schloss sich eine zweistündige Reperfusionphase an, zu deren Beginn 60 % des entnommenen Blutvolumens retransfundiert wurden. Als Kontrolle dienten scheinoperierte Tiere, die zwar keinem hämorrhagischem Schock ausgesetzt waren, aber ansonsten gleich behandelt wurden. Die hepatische mRNA-Expression von Melatoninrezeptoren wurde mit einer Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction (RTq-PCR) und die zugehörige Proteinexpression mit Westernimmunoblot ermittelt. Zur Untersuchung des räumlichen Verteilungsmusters der Melatoninrezeptoren 1 und 2 (MT-1 und MT-2) wurden Leberschnitte immunhistochemisch gefärbt. Des Weiteren wurde zur Bestimmung der Plasmamelatoninkonzentration ein Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) verwendet.

Der hämorrhagische Schock führte zu einer signifikanten Zunahme der Plasmamelatoninkonzentration in allen Gruppen. Bei mit Ramelteon oder mit Vehikelsubstanz behandelten Tieren war die Konzentration im Blut nur einmalig fünf Minuten nach Beginn der Reperfusionphase erhöht, bei Melatonintherapie über den gesamten Zeitraum der Reperfusion hinweg. Des Weiteren gelang der Nachweis von mRNA und Protein nur für den MT-1-Rezeptor, nicht aber für den MT-2-Rezeptor. Bei der histologischen Beurteilung der Leberschnitte von scheinoperierten Tieren lies sich die MT-1-Rezeptorexpression als vorwiegend perizentral mit einer sehr dichten Anordnung der Rezeptoren zentrolobulär beschreiben. Hämorrhagischer Schock mit Retransfusion in Kombination mit einer Melatonin- oder Ramelteongabe führte zu einer bis zu 50%igen Reduktion ( $p \leq 0,001$ ) von MT-1-Rezeptorprotein in der Leberzelle im Vergleich zu scheinoperierten Kontrollgruppen. Bei der dazu gehörigen Immunhistologie dieser Gruppe konnte man ein disseminiertes Muster der MT-1-Rezeptoren im Leberlobulus erkennen, mit einzelnen perizentral und midzonal lokalisierten Rezeptoren. Mit Blick auf die MT-1-Rezeptorgenexpression konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede des hepatischen MT-1-mRNA-Gehaltes zwischen Schockgruppen und scheinoperierten Kontrollgruppen erkannt werden.

Die beobachteten Ergebnisse legen nahe, dass MT-1-Rezeptoren in der Leber der Ratte vorwiegend perizentral im Leberazinus lokalisiert sind. Endogene und exogene Melatoninexposition sowie eine Ramelteongabe alleine oder in Kombination mit hämorrhagischem Schock führen zu einer signifikanten Abnahme des MT-1-Rezeptorproteingehaltes der Leber. Gleichzeitig kann man in der entsprechenden

Histologie ein disseminiertes Rezeptorexpressionsmuster erkennen. Folglich könnte die rezeptorabhängige Organprotektion von Melatonin auf einer Rezeptordesensibilisierung mit darauffolgender Internalisierung beruhen, was zu einer Hochregulation zellulärer Schutzsysteme wie beispielsweise antioxidativen Enzymen führen könnte.

## **1.2. Endogenous and exogenous melatonin exposure attenuates hepatic MT-1 Melatonin receptor protein after hemorrhagic shock in rat**

Melatonin is a pineal hormone, which is synthesised in a circadian fashion. Therefore, melatonin blood levels serve as a hormonal message of the photoperiod. Furthermore, various experimental models of oxidative stress revealed that this hormone is organ protective such as seen for heart, gut, liver and brain. It is postulated that this effect is mainly based on activation of plasma membrane localised receptors and not only on its properties to serve as a free radical scavenger. The receptor dependence of this effect was demonstrated either by coadministration of the melatonin receptor antagonist luzindole or by application of ramelteon alone, which is known to be a highly selective MT-1 receptor agonist with no direct antioxidative capacities. Several studies have shown that melatonin receptor mRNA is present in the rat liver. Conflicting data exist about the presence of both subtypes of membrane bound melatonin receptors type 1 and 2 (MT-1 and MT-2). It has been described for different cell lines, that human recombinant melatonin receptors may be desensitised and/or internalized after incubation with physiological or pharmacological concentrations of melatonin.

However, the distribution of melatonin receptors in the architecture of liver lobules is unknown. Furthermore, the influence of agonist exposure on the expression of these hepatic receptors has not been investigated *in vivo*. Thus, this study was designed to identify the regional expression pattern, as well as mRNA and protein expression of hepatic MT-1 and MT-2 receptors in rat exposed to endogenous melatonin after haemorrhage and resuscitation, or to exogenous melatonin or ramelteon in sham operated animals and after hemorrhagic shock.

All experiments were carried out with anaesthetised, spontaneous breathing male Sprague-Dawley rats. For each group, n = 5 was appointed. Animals underwent haemorrhage for 90 minutes (mean arterial pressure = 30-40 mmHg) with a subsequent intravenous therapy using vehicle, melatonin or ramelteon. Animals were retransfused with 60% of shed blood infused during the first five minutes of resuscitation, followed by two hours of reperfusion. As a control, sham operated animals did not undergo haemorrhage, but apart from that were treated equally.

Hepatic gene expression of melatonin receptors type 1 and type 2 was investigated by utilising RTq-PCR. The corresponding protein expression was analysed with western blot. To detect the spatial expression pattern of MT-1 and MT-2, liver sections were immuno- histochemically stained. To quantify the plasma melatonin content during the course of the experiment, an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used.

Hemorrhagic shock significantly increased plasma melatonin content in all groups. In vehicle and ramelteon treated animals, plasma melatonin levels were only increased above baseline five minutes after reperfusion. In all other groups receiving melatonin, plasma melatonin content was elevated during the whole period of reperfusion. Only MT-1, but not MT-2 mRNA and protein was detected in rat liver.

Immunohistochemical analysis of liver samples from sham operated animals revealed that MT-1 was primary located around the central vein with a very dense configuration pericentrally. Hemorrhagic shock in combination with either ramelteon or melatonin therapy significantly reduced the amount of MT-1 protein about approximately 50 percent in comparison to sham operated control groups. The corresponding histology presented a rather disseminated pattern of MT-1 in the centrolobular area, with few receptors localised pericentrally and midzonally. With regard to the MT-1 gene expression, no statistical significant changes were observed between the groups.

The obtained results suggest that MT-1 receptors are predominantly expressed in pericentral areas of liver lobules. Endogenous and exogenous exposition to melatonin as well as to ramelteon significantly reduce the MT-1 protein content of the liver. Simultaneously, the concentrated allocation of MT-1 in pericentral areas, as described for untreated animals, was replaced by a rather disseminated pattern in pericentral field of liver lobules. Thus, the receptor dependent organ protection of melatonin could rely on receptor desensitisation with subsequent internalization. This could lead to an upregulation of cellular protective systems such as antioxidative enzymes.

## 2. Kapitel: Einleitung

### 2.1. Melatonin und das zirkadiane System

Das in Säugetieren vorkommende Hormon Melatonin ist das Hauptsekretionsprodukt der Epiphyse (Zirbeldrüse). Sie wird auch als Pinealorgan bezeichnet. Chemisch handelt es sich bei Melatonin um ein Alkaloid mit Tryptaminstruktur: 5-Methoxy-N-Acetyltryptamin.

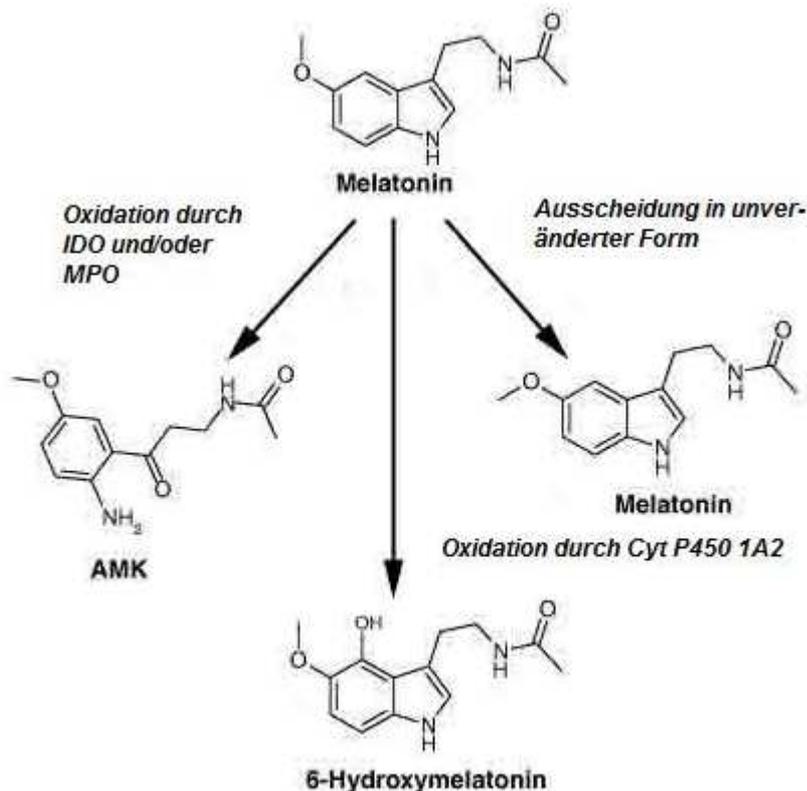
Die Synthese von Melatonin beginnt mit der Aufnahme von Tryptophan aus dem Blutgefäßsystem in die Epiphyse (für eine Übersichtsarbeit siehe Boutin 2005). Danach kommt es zur Hydroxylierung durch das mitochondriale Enzym Tryptophan-5-Hydroxylase. Im Folgenden wird es durch die zytoplasmatische Aminosäuredecarboxylase zu 5-Hydroxytryptamin, dem Serotonin, decarboxyliert. Als nächster Schritt erfolgt die N-Acetylierung des Serotonins durch die Arylalkylamin-N-Acetyltransferase (AANAT) zu N-Acetylserotonin. Dieses Enzym ist ebenfalls im Zytoplasma der Epiphyse lokalisiert, benötigt als Kofaktor Acetyl-CoA und stellt wahrscheinlich den limitierenden Schritt in der Biosynthese von Melatonin dar. Zum Schluss findet eine Methylierung zu 5-Methoxy-N-Acetyltryptamin, dem Melatonin, durch die zytosolische Hydroxyindol-O-Methyltransferase (HIOMT) statt. Melatonin wird im Gegensatz zu vielen anderen Hormonen nicht gespeichert, sondern vermutlich im Anschluss an die Synthese aufgrund seiner hohen Lipophilie durch passive Diffusion direkt in Blut oder Liquor abgegeben. Dieser Sachverhalt wird auch als *de-novo* Synthese bezeichnet.

Das frei zirkulierende Melatonin wird relativ schnell nach seiner Freisetzung hauptsächlich in der Leber wieder abgebaut, so dass es nicht zu einer nennenswerten Akkumulation des Hormons im Blut kommt. Es konnte durch Claustrat 2005 demonstriert werden, dass intravenös verabreichtes Melatonin eine zweiphasige Eliminationskinetik mit einer ersten Eliminationshalbwertszeit von zwei Minuten und einer zweiten Eliminationshalbwertszeit von 20 Minuten hat.

Nahezu 75% des gebildeten Hormons werden in der Leber durch zwei verschiedene Abbauewege katabolisiert. Möglichkeit eins stellt die klassische Hydroxylierung durch die Cytochrom P450 1A2 dar. Das hydroxylierte Produkt kann dann entweder sulfatiert zu 6-Sulfomelatonin oder glukoronidiert zu 6-Hydroxymelatonin-glucoronid mit dem Harn ausgeschieden werden. Einen alternativen Abbaueweg beschreibt die

Metabolisierung des Indolringes zu dem sehr instabilen N-Acetyl-N-Formyl-5-Methoxy-Kynuramin (AFMK). Katalysiert wird dieser Reaktionsschritt durch die beiden Enzyme Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) und/oder die Myeloperoxidase (MPO). Danach erfolgt eine Umlagerung in das sehr viel stabilere N-Acetyl-5-Methoxy-Kynuramin (AMK).

Ungefähr 25% des ausgeschütteten Melatonins werden unverändert hepatisch oder renal ausgeschieden (für eine Übersicht siehe Abbildung 1).



**Abbildung 1:** Darstellung des Melatoninkatabolismus (modifiziert nach Boutin 2005)

IDO = Indolamin-2,3-Dioxygenase, MPO = Myeloperoxidase

Cyt P450 1A2 = Cytochrom P450 1A2

Melatonin wird auch in einigen anderen Organsystemen gebildet. Als extrapineale Syntheseorte wurden unter anderem die Retina (Tosini und Menaker 1998), der Gastrointestinaltrakt (Bubenik 2002), die Haut (Slominski 2005), die Lymphozyten (Carrillo-Vico 2004), die Testes (Tijmes 1996) und das Knochenmark (Conti 2000) beschrieben.

### **2.1.2. Rolle der Melatoninproduktion für das zirkadiane System**

Unter einem zirkadianen Rhythmus versteht man in der Chronobiologie einen endogenen Tag-Nacht-Rhythmus mit einer Periodenlänge von zirka 24 Stunden. Bei Säugetieren kann über den retinalen Lichteinfall zum einen die Tageslänge gemessen, zum andern die Veränderung der Tageslänge im Verlauf der Jahreszeiten wahrgenommen werden (Goldman 2001).

Die Synthese und Ausschüttung von Melatonin durch die Epiphyse erfolgt während der Dunkelphase. Aus diesem Grund wird Melatonin auch als ein Signal für die Dunkelheit bezeichnet. Als oberste Instanz der zirkadianen Uhr werden die suprachiasmatischen Nuklei (SCN) des Hypothalamus gesehen. Sie sind als Oszillatoren zu verstehen, die den zirkadianen Rhythmus auch ohne Information über die Lichtverhältnisse generieren können. Ihre Information über die äußeren Lichtbedingungen erhalten sie durch den retino-hypothalamischen Trakt. Die Kerne sind also für die Transformation der Dunkelheit in ein endogenes Signal verantwortlich, indem sie die Epiphyse zur Melatoninproduktion und Ausschüttung bei Nacht anregen. Die Dauer der Produktion verhält sich invers zur Tageslänge, das heißt je länger der Tag, desto geringer die Dauer und desto niedriger die Amplitude der Melatoninproduktion (Pevet 1998). Der Melatoninplasmaspiegel erreicht Spitzenkonzentrationen zwischen zwei und vier Uhr in der Nacht, während die geringsten Spiegel im Blut tagsüber zu finden sind. Folglich sind lange Nächte durch eine verlängerte und eine erhöhte Melatoninsekretion gekennzeichnet (Cardinali und Pevet 1998). Daraus ist es für den Organismus möglich die Länge der Nacht und den Verlauf der Jahreszeiten an Hand der Melatoninproduktion abzulesen (Hastings 1985).

Das Generieren eines zirkadianen Rhythmus durch Melatonin als Mediator ist für den Organismus von zentraler Bedeutung. Dies gilt besonders für so genannte photoperiodische Spezies, wie den sibirischen Hamster, welcher zum Beispiel sein Reproduktionsverhalten der Photoperiode anpassen kann (Reiter 1980). Aber auch bei nichtphotoperiodischen Spezies, wie dem Menschen, können auf diese Weise tageszeitabhängige Prozesse wie Schlafen (Shochat 1997), Nahrungsaufnahme, Hormonausschüttung, Herzfrequenz, Blutdruck (Grossman 2006) und Körpertemperatur im Tag-Nacht-Rhythmus verändert werden (Paredes 2009). Des Weiteren wird Melatonin eine Rolle in der Pubertät (Salti 2000), während des physiologischen Alterungsprozesses (Karasek 2004) und in der Regulation des

Immunsystems (Carrillo-Vico 2006) zugeschrieben. Erklärt werden diese Effekte durch den direkten Einfluss des Pinealhormons auf physiologische, neuroendokrine und reproduktive Systeme (Reiter 1980, Cardinali und Pevet 1998). Als zentrale Angriffspunkte wurden dabei die Kerne des Hypothalamus und die Pars tuberalis der Hypophyse identifiziert (Lincoln 2006).

### **2.1.3. Regulation der Melatoninbiosynthese**

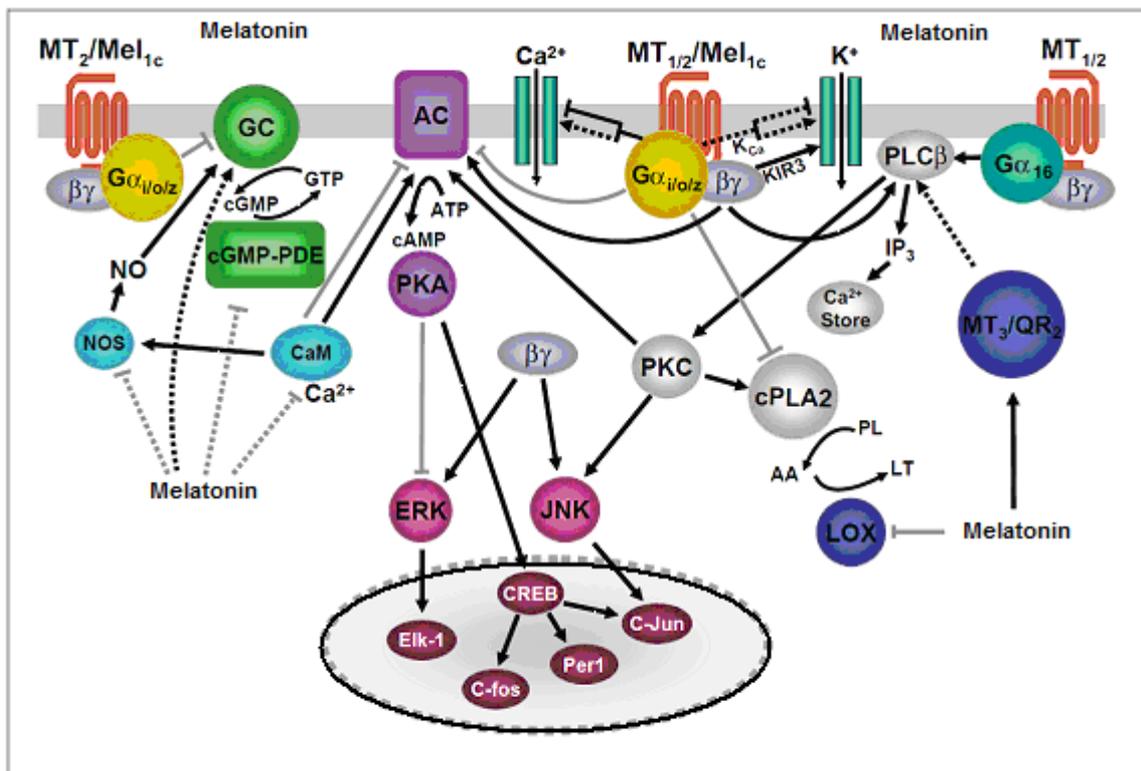
Die Regulation der Melatoninbiosynthese unterliegt den suprachiasmatischen Nuklei (SCN). Untermauert wird diese Feststellung durch die Tatsache, dass Läsionen der SCN zu einem kompletten Ausfall der Melatoninsynthese führen können (Klein und Moore 1979). Durch ein polysynaptisches Netzwerk, welches die paraventriculären Kerne des Hypothalamus miteinbezieht, steuern sie die Synthese des Pinealhormons. Deszendierende Bahnen dieser Areale erreichen die intermediolateralen Hörner der zervikalen Rückenmarkssegmente (Buijs 1998). Die postsynaptischen Fasern der dort gelegenen zervikalen Sympathikusganglien ziehen bis zur Epiphyse. Bei Stimulation wird der Transmitter Noradrenalin (NA) präsynaptisch freigesetzt und bindet postsynaptisch an epiphysäre  $\beta$ -Adreno- oder  $\alpha$ 1-Adrenorezeptoren. Der durch  $\beta$ -Adrenorezeptoraktivierung hervorgerufene cAMP-Anstieg stimuliert die Expression der AANAT über Proteinkinase-A abhängige Phosphorylierung (Schomerus und Korf 2005). Diese  $\beta$ -adrenerge Wirkung wird durch  $\alpha$ 1-Adrenorezeptoraktivierung potenziert. Auf zellulärer Ebene wird diese Potenzierung durch einen starken Anstieg des intrazellulären Kalziums mit nachfolgender Proteinkinase C Aktivierung und gesteigerter Prostaglandinsynthese erklärt (Vacas 1980, Ho und Klein 1987, Krause und Dubocovich 1990). Bei retinalem Lichteinfall wird die Synthese durch eine Degradation der AANAT (Gastel 1998) sofort gestoppt.

## **2.2. Melatoninrezeptoren**

Für die Wirkung von Melatonin auf den Organismus werden folgende Bindungspartner verantwortlich gemacht (für eine Übersichtsarbeit siehe New 2003):

membranäre, intrazelluläre bzw. zytoplasmatische (wie die Quinonreduktase oder Calmodulin) und nukleäre Rezeptoren.

Bei den membranären heptahelikalen Melatoninrezeptoren werden der für Melatonin hoch affine MT-1-, früher Mel 1a, und der mit geringerer Affinität bindende MT-2-Rezeptor, früher Mel 1b, klassifiziert. Beide sind durch teilweise unterschiedliche und teilweise gemeinsame heterotrimeren G-Proteine an die folgenden zellulären Effektorsysteme gekoppelt: Adenylatzyklase, Phospholipase C $\beta$  und K-Kanäle. Im Fokus der Forschung stehen außerdem noch die Arachidonsäure, cGMP und Kalzium-Kanäle als mögliche Interaktionspartner (für eine Übersicht siehe Abbildung 2).



**Abbildung 2:** Intrazelluläre Signalkaskade von Melatoninrezeptoren modifiziert nach New (2003)

Das Diagramm stellt die Kopplung der heterotrimeren G-Proteine an Melatoninrezeptoren mit den sich daraus ergebenden zellulären Signalwegen dar.

AA = Arachidonsäure; AC = Adenylatzyklase; CaM = Calmodulin; CREB = cAMP-responsives Element-Bindungsprotein; cGMP-PDE = cGMP Phosphodiesterase; cPLA<sub>2</sub> = zytosolische Phospholipase A<sub>2</sub>; ERK = extracellulär signal-related Kinase; GC = Guanylylzyklase; JNK = c-jun NH<sub>2</sub>-terminal Kinase; KCa = Ca<sup>2+</sup>-abhängiger Kaliumkanal; KIR = G Protein gekoppelter einwärts gerichteter Kaliumkanal; LOX = Lipoxygenase; LT = Leukotriene; NO = Nitritoxid; NOS = Nitritoxidsynthase;

PKA = Proteinkinase A; PKC = Proteinkinase C; PL = Phospholipide; PLC = Phospholipase C $\beta$ ; QR<sub>2</sub> = Quinonreduktase 2.

## **2.2.1. Signaltransduktion der Melatoninrezeptoren**

### 2.2.1.1. Regulation der Adenylatzyklaseaktivität

Die Aktivierung von membranären Rezeptoren führt über  $G_i$ -Proteine als second messenger je nach vorliegender Isoform der Adenylatzyklase zu deren Hemmung (Vacas 1984) oder Aktivierung (Yung 1995) mit konsekutiv veränderten cAMP-Konzentrationen. Daraus resultieren entweder höhere oder niedrigere Spiegel an aktivierter Proteinkinase A mit nachfolgend unterschiedlich gesteigerter Aktivität des Transkriptionsfaktors CREB (cAMP-responsive element binding protein) (McNulty 1994).

Für die Regulation der Adenylatzyklaseaktivität konnte unabhängig von Melatonin in früheren Versuchen gezeigt werden, dass die beiden aktiven Untereinheiten des  $G_i$ -Proteins  $G\alpha$  und  $G\beta/\gamma$  je nach Isoform inhibierend (Taussig 1998) oder aktivierend (Tsu 1996) wirken können.

Eine zweite Möglichkeit der regulatorischen Einflussnahme von Melatonin auf die Adenylatzyklase könnte der Ca-Calmodulin-Komplex darstellen. Durch die Bindung von Melatonin an die Kalziumbindungsstelle von Calmodulin (Benitez-King 1993) kommt es zu dessen Inaktivierung. Abermals abhängig vom Adenylatzyklasetyp würde dann die Aktivierung oder Inhibierung durch aktives Ca-Calmodulin wegfallen (New 2003).

Ein dritter möglicher Regulationsmechanismus stellt die aktive Proteinkinase C dar, die durch Phosphorylierung alle Adenylatzyklaseklassen aktiviert (Taussig 1995). Der Melatonineinfluss auf den Aktivitätszustand dieser Proteinkinase ist abhängig von dem im jeweiligen Gewebe vorhandenen zellulären Melatoninrezeptorsystem.

Der durch den Einfluss des Pinealhormons auf die Adenylatzyklase veränderte cAMP-Spiegel gipfelt als Endpunkt der Signaltransduktion in dem bereits oben erwähnten Transkriptionsfaktors CREB. Er ist für die gesteigerte Expression von IEGs (immediate-early genes) wie c-fos und junB verantwortlich. Es ist gezeigt worden, dass durch die Melatonin-induzierte Inhibierung der cAMP Produktion die Expression dieser Gene (Ross 1996, von Gall 2002) vermindert wird.

### 2.2.1.2. Regulation der Phospholipase C-Aktivität

MT-1/2-Rezeptoren sind funktionell über  $G_i$ -Proteine an die Phospholipase C gekoppelt, durch deren Aktivierung es zu einer Freisetzung von Inositoltriphosphat

(IP-3) kommt (Eison 1993). Es wird postuliert, dass hierfür wahrscheinlich die G $\beta$ / $\gamma$ -Untereinheit der G $_i$ -Proteine verantwortlich ist (MacKenzie 2002).

#### 2.2.1.3. Regulation der Phospholipase A2 Aktivität

Ein weiteres an die Melatoninrezeptoren gekoppeltes Signalsystem stellt die Phospholipase A2 dar (Godson 1997), die den Botenstoff Arachidonsäure bildet. Weiterhin zeigte sich hier, dass je nachdem welche Melatonin-Rezeptorsysteme zellulär exprimiert werden, die Phospholipase A2 durch die Proteinkinase C aktiviert oder durch G $_i$ -Proteine inhibiert wird. Mitverantwortlich für die erhöhten Arachidonsäurespiegel ist die Fähigkeit von Melatonin in den Metabolismus der Arachidonsäure einzugreifen, indem abbauende Enzyme wie die thrombozytäre Lipooxygenase inhibiert werden (Martinuzzo 1991) oder ihre Expression supprimiert wird (Steinhilber 1995).

#### 2.2.1.4. Regulation des zellulären cGMP-Levels

Als viertes von Melatonin genutztes second messenger System ist cGMP zu nennen. Interessanterweise konnte im Tierversuch gezeigt werden, dass der zelluläre cGMP Spiegel tageszeitabhängig im Kortex des Huhns schwankt und sich invers zur Melatoninkonzentration im Blut verhält (Guerrero 1996). Membranäre MT-Rezeptoren inhibieren über G $_i$ -Proteine die Guanylzyklase-Aktivität (Bubis 1999). Des Weiteren wird postuliert, dass Melatonin die Stickoxid-Synthase-Aktivität blockiert. Hierdurch kommt es zur verminderten Bildung von Stickstoffmonoxid, welches einen Aktivator der Guanylzyklase darstellt (Spessert 1993). Konträr zu dieser Erkenntnis verhält sich die Beobachtung, dass es unter Melatoninexposition auch zu gesteigerten cGMP-Spiegeln kommen kann, nachgewiesen so in Lymphozyten (Lopez-Gonzalez 1992), Leber, Schilddrüse und Dünndarm (Vesely 1981). Hypothetisch werden hierfür eine Inhibierung der cGMP-metabolisierenden Phosphodiesterase (Bubis 1999) und eine Aktivierung der Guanylzyklase (Olcese 2002) über noch unbekannte intrazelluläre Kopplungen angenommen.

#### 2.2.1.5. Regulation von Kalium- und Kalziumkanälen

Hormone und Neurotransmitter sind in der Lage Kalium- und Kalziumkanäle direkt über G $\alpha$  und G $\beta$ / $\gamma$ -Untereinheiten oder indirekt über andere second messenger Systeme zu regulieren (Schneider 1997). In diesem Zusammenhang konnte auch für

das Pinealhormon gezeigt werden, dass es *in vitro* die Entladungsrate von hypothalamischen Neuronen signifikant reduziert (Shibata 1989).

#### 2.2.1.5.1. Kaliumkanäle

Frühere Arbeitsgruppen beobachteten unabhängig von Melatonin, dass die G $\alpha$ -Untereinheit eines G $_i$ -Proteins inhibierend (Schreibmayer 1996) und die G $\beta/\gamma$ -Untereinheiten aktivierend (Kofuji 1995) auf Kir3 Kalium Kanäle wirkt.

Da nun MT-Rezeptoren an ein G $_i$ -Protein gekoppelt sind, könnten sie durch ihre jeweilige Untereinheiten die Aktivität von Kaliumkanälen beeinflussen, so gezeigt von Nelson (1996) und Huan (2001) in *in vitro* Versuchen.

#### 2.2.1.5.2. Kalziumkanäle

Mehrere Arbeitsgruppen beobachteten die Wirkung von Melatonin auf Kalziumkanäle. So zeigte Lew (1999), dass das epiphysäre Hormon eine vasokonstriktorische Wirkung auf Arterien ausübt. Mei (2001) wies experimentell nach, dass die Kontraktilität und das Schlagvolumen von Myozyten durch Melatoninexposition gesteigert werden.

Erklärt werden diese beiden Beobachtungen durch die Hypothese, dass eine Aktivierung von MT-1/MT-2-Rezeptoren G-Protein gekoppelt das Öffnen spannungsabhängiger Kalziumkanäle ermöglicht.

#### 2.2.1.6. Der MT-3-Rezeptor

Neben den bereits beschriebenen membranären Rezeptoren gibt es auch einen intrazellulären spezifischen Melatoninrezeptor, den MT-3-Rezeptor. Das MT-3-Rezeptorprotein zeigt eine 95%ige Homologie zu der menschlichen Quinonreduktase-2 (QR-2), die zu den Entgiftungsenzymen gerechnet wird (Nosjean 2000). Ursprünglich wurde der MT-3-Rezeptor als membrangebunden beschrieben (Duncan 1988). Man fand jedoch heraus, dass für den membranären MT-3-Rezeptor hoch affine Liganden nicht in gleichem Ausmaße an die zytosolische Form binden (Mailliet 2005). Dieser pharmakologische Unterschied wird durch die mögliche Existenz von QR-2 Monomeren in der Membran erklärt, weil die funktionstüchtige zytosolische QR-2 ein Homodimer darstellt. Es wird vermutet, dass ein Teil dieses Homodimers in die Membran integriert sein könnte, beispielsweise durch Myristoylierung (Boutin 1997). Unter Myristoylierung wird biochemisch ein

enzymatischer Alkylierungsprozess des N-terminalen Endes der Aminosäure Glycin in Proteinen verstanden. Dadurch nimmt die Lipophilie des Proteins zu, wodurch eine Integration in die zelluläre Plasmamembran erleichtert wird.

### **2.2.2. Lokalisation der Melatoninrezeptoren**

MT-1- und MT-2-Rezeptoren werden im Organismus teilweise einzeln und teilweise gemeinsam von verschiedenen Geweben exprimiert.

Der Nachweis von MT-1-Rezeptor-mRNA gelang bis jetzt in folgenden Strukturen: suprachiasmatische Nuclei (Liu 1997), Cerebellum (Al Ghouli 1998), Hippocampus (Savaskan 2002) und in Arealen mit dopaminergen Transmittersystemen wie Substantia nigra, Nuclei accumbentes, Nuclei caudati, Putamina und ventrales Tegmentum (Uz 2005). Weiterhin wurde ihre Existenz in den Ovarien (Clemens 2001), Testes (Frungeri 2005) und Brustdrüsen (Ram 2002) beschrieben. Außerdem dokumentierte man ihre Präsenz in den Koronarien und der Aorta (Ekmekcioglu 2001), Leber und Niere (Naji 2004), Gallenblase (Aust 2004), Haut (Slominski 2003) und Immunsystem (Pozo 2004).

Prinzipiell scheinen MT-2-Rezeptoren im Organismus seltener exprimiert zu werden, da der Nachweis der entsprechenden mRNA bis jetzt in wenigeren Geweben gelang. Hierzu zählen hauptsächlich das Gehirn, aber auch Herz, Lunge, Aorta, Koronarien, Myometrium, Granulosazellen, Immunzellen, Duodenum und Adipozyten (Dubocovich und Markowska 2005).

Für den MT-3-Rezeptor zeigte man die Existenz in Leber, Niere, Gehirn, Herz, Lunge, Darm, Muskel und braunem Fettgewebe (Nosjean 2001). Dass MT-3-Agonisten im Tierversuch den intraokulären Druck senken, wird als Hinweis für das Vorhandensein von okulären MT-3-Rezeptoren gesehen (Pintor 2003).

### **2.2.3. Regulation der Melatoninrezeptoren**

Erstaunlicherweise unterliegen die Bindungsaffinität für Melatonin und die mRNA-Expression der Rezeptoren ebenfalls wie die Melatoninsynthese einer zirkadianen Rhythmik. So fand man heraus, dass es zu einer Zunahme der Rezeptordichte in der Pars tuberalis der Hypophyse und den SCN bei pinealektomierten Tieren oder Tieren, die einer konstanten Belichtung ausgesetzt waren, kommt (Gauer 1992).

Umgekehrt kommt es durch eine einzige Melatonininjektion wieder zu einer Abnahme der Rezeptordichte (Gauer 1993). Es wird postuliert, dass die MT1-mRNA-Expression einer komplexen Regulation bestehend aus Melatoninplasmaspiegeln, der zirkadianen Uhr und den Tag-Nachtzeiten unterliegt. So vermutet man, dass eine verminderte MT-1-Rezeptordichte auf eine Repression des MT-1-Gens durch erhöhte Melatoninspiegel zurückzuführen ist (Schuster 2001). Eine Abnahme der membranären Rezeptoren ließe sich auch durch eine Desensibilisierung von MT-1/2-Rezeptoren durch Proteinkinase C erklären, so gezeigt *in vitro* an humanen Prostatazellen (Gilad 1997).

Neben Melatonin werden noch weitere Einflussgrößen auf die melatoninerge Rezeptorebene diskutiert. Als Beispiele wären hier Estradiol (Zisapel 1987), das Alter (Laudon 1988) oder Morbus Alzheimer (Brunner 2006) zu nennen, deren Wirkung auf Melatoninrezeptoren bis jetzt nur teilweise verstanden sind. Sie stehen deshalb im Fokus der momentanen Forschung.

## **2.3. Organprotektion durch Melatonin**

Die organprotektive Wirkung von Melatonin lässt sich in eine direkte und in die indirekte antioxidative Wirkung unterteilen. Die direkte Wirkung beruht auf verschiedenen biochemischen Prozessen der Radikalelimination. Die indirekte Wirkung findet wahrscheinlich über eine Rezeptoraktivierung statt, die auf verschiedenen zellulären Ebenen das Enzymsystem beeinflusst.

### **2.3.1. Direkte antioxidative Wirkung**

Die direkte Inaktivierung von Radikalen durch Melatonin ist radikalspezifisch. Bei Hydroxyl- und Stickstoffmonoxidradikalen findet eine nichtenzymatische Addition an das Melatonin-Molekül statt, so dass zum Beispiel Nitrosomelatonin entsteht (Tan 2002).

Den Haupteliminationsweg der meisten im Organismus entstehenden Radikale stellt jedoch der Einzel-Elektronentransfer dar. Hierzu zählen Reaktionen mit Carbonat- und Sauerstoffradikalen wie auch mit Ozon. Dabei überträgt Melatonin als Elektronendonator ein Elektron oder Hydrogenatom auf das Radikal, wodurch es

selbst oxidiert wird. In experimentellen Arbeiten konnte nachgewiesen werden, dass auch nichtbiologische Substanzen wie Arylradikale und Oxoferrylhämoglobin von dem Hormon reduziert werden können (Tesoriere 2001). Das zentrale Reaktionsprodukt der Melatoninoxidation ist das sehr instabile N-Acetyl-N-Formyl-5-Methoxy-Kynuramin, kurz AFMK (Hardeland 2005). Dies ist der einzige Melatoninmetabolit, der in einzelligen Organismen und in Metazoen nachgewiesen werden konnte. Es hat ebenfalls eine große antioxidative Kapazität, da es zwei Elektronen pro Molekül fängt. Seine organprotektive Wirkung wurde in Zellkulturen deutlich, wo es das Überleben von Nervenzellen des Hippocampus entweder unter Peroxid- und Glutamat- oder Amyloid b25-35-Exposition signifikant steigerte (Tan 2001).

AFMK wird wiederum durch die beiden Enzyme Arylaminformidase und Hämoperoxidase in das sehr viel stabilere N-Acetyl-5-Methoxy-Kynuramin (AMK) überführt. Dieses Abbauprodukt ist stark antiinflammatorisch wirksam, da es zum einen fähig ist die Cyclooxygenase II selektiv zu inhibieren und zum anderen ihre Expression in Makrophagen herunterzuregulieren (Majo 2005).

Somit beruhen die antioxidative und die antiinflammatorische Eigenschaft von Melatonin nicht nur auf Melatonin alleine, sondern vielmehr auf der Wirkung von sekundär, tertiär und quartär entstehenden Metaboliten des epiphysären Hormons. Es wurde beobachtet, dass je höher der oxidative Stress im Organismus ist, desto mehr AFMK produziert wird. Demnach könnte man also anhand eines Quotienten aus AFMK zu anderen Melatoninmetaboliten den oxidativen Stress beurteilen (Tan 2007).

### **2.3.2. Die indirekte antioxidative Wirkung**

Die indirekte Wirkung von Melatonin läuft wahrscheinlich über die Aktivierung von Melatoninrezeptoren ab. Bindet Melatonin an den MT-3-Rezeptor, die der Quinonreduktase-2 entspricht, kommt es zur Aktivierung dieses Enzyms. Daraus könnte sich ein gesteigerter Abbau von Giftstoffen ergeben (Boutin 2005).

Mehrere experimentelle Arbeiten konnten im Rahmen von oxidativen Stressmodellen zeigen, dass es unter einer Melatonintherapie zu einer Hochregulation von antioxidativen Enzymen wie der Glutathionperoxidase (Pan 2006), der Glutathionreduktase, Superoxiddismutase und Katalase (Liu 2000) kommt.

Gleichzeitig findet eine Runterregulation von prooxidativen Enzymen statt. Hierzu zählen die 12-Lipoxygenase (Zhang 1999) und die NO-Synthase (Pozo 1994, Gilad 1998). Ob diese Beobachtung auf einer Aktivierung von MT-Rezeptoren beruht, ist momentan Gegenstand der Forschung.

Durch Bindung von Melatonin an membranäre MT-1- und MT-2-Rezeptoren kann man zum einen eine Vasodilatation (Boutin 2005) und zum anderen eine Hemmung der Entzündungsreaktion durch verminderte Leukozytenadhäsion (Lotufo 2001) feststellen.

Zahlreiche Versuche lieferten Beispiele für die rezeptorabhängige Protektion verschiedener Organsysteme durch das Pinealhormon. Als Gründe für die Rezeptorabhängigkeit dieser Beobachtung werden in den verschiedenen Arbeiten die Blockierbarkeit dieses Effektes zum einen durch den MT-2-Antagonisten Luzindole und zum anderen durch Forskolin, welches die intrazellulären cAMP-Spiegel im Gegensatz zu Melatonin steigert, angeführt.

Im Tierversuch gelang der Nachweis der neuroprotektiven Eigenschaften von Melatonin anhand von Mäusen mit einer periventriculären Leukomalazie, induziert durch das toxisch wirkende Ibotenat (Husson 2002). Zwar war das epiphysäre Hormon nicht in der Lage die initiale Zystenbildung durch Ibotenat zu verhindern, doch führte seine intraperitoneale Verabreichung zu einer 82%igen Reduktion der Zystengröße im Vergleich zur Kontrollgruppe. Erklärt wird diese Beobachtung mit der stimulierenden Wirkung von Melatonin auf zelluläre Reparaturvorgänge.

Die kardioprotektive Wirkung des epiphysären Hormons wurde anhand von mehreren experimentellen Arbeiten dargestellt. Bei Ischämie-Reperfusionversuchen von Genade und Kollegen (2008) führte man die Verminderung des Reperfusionsschadens auch auf die Aktivierung von membranären Melatoninrezeptoren zurück, was sowohl zu einem zellulären cAMP-Abfall als auch zu einer Aktivierung der NO-Synthase und Guanylylzyklase führte. In Studien von Lochner (2006) zur postischämischen Erholung von Myokardzellen beobachtete man eine verbesserte kardiale Leistungsfähigkeit und eine geringe Infarktgröße, sogar bis zu vier Tagen nach Gabe der letzten Melatoninosis vor dem eigentlichen ischämischen Ereignis. Die Rezeptorabhängigkeit wurde wie bereits weiter oben beschrieben mit Luzindole und Forskolin gezeigt.

In experimentellen Arbeiten zur Kardiotoxizität von Cyclosporin A erklärte man die schützende Wirkung des Pinealhormons mit einer über aktivierte MT-1-/MT-2-

Rezeptoren verlaufenden Signalkaskade, die eine Stimulierung der Phospholipase C mit Kalziumanstieg und gesteigerter Transkription von antioxidativen Enzymen beinhaltet (Rezzani 2006). Passend hierzu war der oxidative Stress, gemessen mit TBARS Reagenz (Thiobarbituric acid reactive substances), in den mit Melatonin behandelten Kardiomyozyten geringer.

Auch im Gastrointestinaltrakt erkannte man die schützende Funktion des Pinealhormons in Zusammenhang mit Stressulzera (Brzozowski 2005). Man fand heraus, dass exogen zugeführtes Melatonin genauso wie sein Vorläufermolekül Tryptophan Ulzera und Läsionen der Magenschleimhaut Melatoninrezeptor-getriggert vermindert. Es konnte eine gesteigerte hepatische Mikrozirkulation in Zusammenhang mit einer verstärkten Prostaglandin E<sub>2</sub>- Synthese festgestellt werden. Die verstärkte Prostaglandinsynthese wird durch eine Induktion der mukosalen Cyclooxygenase 2 durch Melatonin erklärt, weil eine Pinealektomie zur Runterregulation der Cyclooxygenase führt. Die Rezeptorabhängigkeit der Enzyminduktion durch Melatonin wurde durch simultane Luzindoleapplikation demonstriert, die zu einer signifikanten Verminderung der beobachteten protektiven Melatoninwirkung führte.

### **2.3.3. Folgen der antioxidativen Wirkung für die Mitochondrien**

Im Rahmen der antioxidativen Wirkung scheint Melatonin auf verschiedenen Wegen protektiv auf die Mitochondrien zu wirken (Molpeceres 2007, Guha 2007). Sie werden zum einen selbst als Hauptquelle für freie Radikale gesehen, zum anderen nehmen sie bei eigener Dysfunktion eine zentrale Rolle in der Apoptose ein. So konnte weiterhin experimentell demonstriert werden, dass das Pinealhormon vor mitochondrialer Lipidperoxidation und DNA-Modifikation schützt (Wakatsuki 2001). Hinzu kommt die Konzentrationserhöhung von Reduktionsäquivalenten wie Coenzym Q (Yalcin 2004) und Glutathion (Murawska-Cialowicz 2009). Außerdem führt es direkt zu einer Aktivitätssteigerung der Komplexe I und IV der Atmungskette, wodurch die mitochondriale Atmung und die ATP-Synthese angekurbelt werden (Okatani 2002). Die so gesteigerte ATP-Bildung und der vermehrte Sauerstoffverbrauch können als ein Indikator für die Reduktion von Elektronenlecks gelten. Dies zieht wiederum eine verminderte Radikalbildung nach sich (Hardeland 2005).

## **2.4. Melatoninrezeptoragonist Ramelteon**

Die Substanz Ramelteon wurde als selektiver Melatoninrezeptoragonist primär zur Behandlung der Insomnie entwickelt (Cajochen 2005). Außerdem wurde sie in klinischen Studien zur Behandlung der Schlaflosigkeit erprobt (Zammit 2007) und steht im Fokus zur Linderung der Symptome des Jetlags (Srinivasan 2008).

Neben seiner hohen Selektivität für MT-1-Rezeptoren hat Ramelteon eine höhere Affinität, eine größere Potenz (Kato 2005) und eine längere Halbwertszeit als Melatonin (Pandi-Perumal 2009). Im Gegensatz zu Melatonin besitzt Ramelteon keine messbare Affinität zu Opiat-, Dopamin-, Benzodiazepin- und Serotoninrezeptoren (Kato 2005).

Adam McGechan und Keri Wellington konnten 2005 zeigen, dass nach oraler Gabe Ramelteon fast vollständig resorbiert wird und es eine Bioverfügbarkeit von unter zwei Prozent besitzt. Grund dafür sei der ausgeprägte hepatische first-pass Metabolismus. Damit wäre auch die kurze Halbwertszeit von 1,2 Stunden zu erklären. Weiterhin zeigte sich hier, dass bei der Verstoffwechslung vier Metabolite M-I bis M-IV entstehen, wobei M-II die höchste systemische Konzentration erreicht. Gemäß den Autoren kommt es während der hepatischen Metabolisierung zu einer Oxidation der Hydroxyl- und Carbonylgruppe durch das Enzym Cytochrom P450. Anschließend werden diese Reaktionsprodukte an Glukuronsäure gekoppelt. Der größte Teil, rund 84%, wird dann mit dem Urin, ein geringer Teil, ungefähr 4%, mit dem Stuhl und der Rest unverstoffwechselt ausgeschieden.

## **2.5. Fragestellung dieser Arbeit**

Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine Melatoninvorbehandlung oder Therapie die Leberfunktion und -perfusion nach hämorrhagischem Schock verbessert (Mathes 2008). Dass diese Organprotektion teilweise MT-1- und MT-2-Rezeptor-getriggert abläuft, wurde durch die simultane Applikation des Antagonisten Luzindole demonstriert, die zur Aufhebung der protektiven Effekte führte. In darauf aufbauenden Versuchen wurde durch die Verwendung des Melatoninrezeptoragonisten Ramelteon, der selbst keinerlei relevanten antioxidativen Eigenschaften im Vergleich zum Epiphysenhormon besitzt, die Rezeptorabhängigkeit der Leberprotektion gezeigt. Unter Ramelteongabe kam es ebenfalls zu einer

Verbesserung der hepatischen Funktion und Perfusion nach hämorrhagischem Schock (Mathes 2008).

Für die hepatische Expression von MT-1- und MT-2-mRNA liegen teilweise unterschiedliche Ergebnisse vor. Dass die Leber MT-2-mRNA exprimiert, wurde sowohl von Sánchez-Hildago (2009) und Sallinen (2005) für die Ratte belegt als auch von Poon (2001) für die Maus gezeigt. Widersprüchlich ist die Datenlage zur Existenz von hepatischer MT-1-mRNA, da Poirel (2003) der Nachweis in der Ratte gelang, Sallinen (2005) jedoch nicht. Begründet wird dies durch mögliche methodische Unterschiede in der verwendeten RT-PCR-Technik.

Welchen regulatorischen Einfluss die Höhe der extrazellulären Melatoninkonzentration auf membranäre MT-1- und MT-2-Rezeptoren hat, ist bis jetzt nur teilweise verstanden. So wurde anhand von Zellkulturen mit rekombinanten MT-1- und MT-2-Rezeptoren gezeigt, dass eine Melatoninexposition in pharmakologischer Dosierung die Affinität von beiden Rezeptortypen für die nachfolgende Bindung von Iodomelatonin deutlich vermindert. Allein für den MT-2-Rezeptor konnte bei entsprechenden supraphysiologischen Melatoninspiegeln eine Desensibilisierung und Internalisierung gezeigt werden (Gerdin 2003).

Im Gegensatz dazu führten diese Melatoninspiegel zu einer Zunahme der membranären MT-1-Rezeptordichte (Gerdin 2004). Der Antagonist Luzindole steigert zwar bei dreitägiger Inkubation die membranäre MT-1-Rezeptordichte, führt jedoch paradoxerweise zu einer Runterregulation der gesamten zellulären MT-1-Spiegel (Kokkola 2007). Konträr dazu steigert Melatonin unter den gleichen Versuchsbedingungen den zellulären Gehalt an MT-1-Rezeptoren.

Zusammenfassend scheint die Rezeptorregulation multifaktoriell abzulaufen, da sie abhängig vom entsprechenden Rezeptortyp (MT-1 oder MT-2), dem zu untersuchenden Gewebe und von der Höhe des Melatoninspiegels zu sein scheint.

Wie die MT-1- und MT-2-Rezeptoren lokoregionär in der Leber verteilt sind und welche regulatorischen Einflüssen Melatoninrezeptoragonisten auf sie und ihre Expression *in vivo* ausüben, ist bis jetzt noch nicht untersucht worden.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es daher, die hepatische mRNA- und Proteinexpression sowie die räumliche Verteilung der MT-1- und MT-2-Rezeptoren im Leberläppchen der Ratte *in vivo* zu untersuchen. Dafür wurden folgende Versuchsbedingungen gewählt: zum einen bei physiologischen Melatoninspiegeln

nach Schock und Retransfusion, zum anderen bei exogener Melatonin- oder Ramelteongabe nach Schock und Retransfusion.

## **3. Kapitel: Material und Methodik**

### **3.1. Material**

#### **3.1.1. Tiere**

Die Versuche wurden nach Genehmigung durch die zuständige Landesbehörde (Landesamt für Soziales, Gesundheit und Verbraucherschutz, Saarbrücken) in den Forschungslaboren der Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin der Universität des Saarlandes durchgeführt. Für die folgenden Experimente wurden männliche Sprague-Dawley-Ratten verwendet, die ein Körpergewicht zwischen 200 g und 300 g hatten. Wir bezogen die Tiere von der Firma Charles River (Sulzfeld).

Vor der Operation wurden die Tiere für 12 Stunden nüchtern für feste Nahrung gehalten. Sie hatten aber freien Zugang zu Wasser. Weiterhin wurden sie einem Tag-Nacht-Rhythmus mit jeweils zwölf Stunden (Licht und Dunkelheit) ausgesetzt (LD 12:12 h). Alle Operationen wurden zwischen den Zeitgeber Zeiten zwei und sechs Stunden durchgeführt.

#### **3.1.2. Medikamente und Chemikalien**

Ramelteon wurde von der Firma Takeda und Melatonin wurde von der Firma Sigma bereitgestellt. Pentobarbital-Natrium (Narcoren) wurde von der Firma Merial GmbH bezogen. RNA-Later zur Stabilisierung der Leber-RNA kam von der Firma Quiagen. Soweit nicht anders angegeben, wurden allen anderen Chemikalien von Sigma (Deisenhofen) oder Roth (Karlsruhe) in höchster Reinheit und unter RNase-freien Bedingungen eingesetzt.

### **3.2. Methodik**

#### **3.2.1. Hämorrhagisches Schockmodell**

Ein druckgesteuertes Modell der hämorrhagischen Hypotension mit anschließender Volumensubstitution durch entnommenes Blut und zusätzliche Gabe von Vollelektrolytlösung diente als kliniknahes Modell des therapierten hämorrhagischen Schocks (Einzelheiten siehe unten).

### **3.2.2. Narkose**

Zur Narkoseeinleitung wurde den Tieren Pentobarbital-Natrium in einen der beiden unteren abdominellen Quadranten intraperitoneal injiziert. Hierbei wurden 50 mg/kg Körpergewicht appliziert. Zur Überprüfung der Narkosetiefe wurden auditorische Reize und Schmerzreize gesetzt. Die Narkosetiefe wurde so gewählt, dass das Tier noch spontan suffizient atmete aber gleichzeitig eine lang dauernde wirksame Anästhesie vorhanden war.

### **3.2.3. Chirurgisches Vorgehen**

Die Aufrechterhaltung der Körpertemperatur zwischen 36,5-37,5 °C wurde durch eine Heizplatte gewährleistet.

Nach Lagerung der Ratte in Rückenlage wurde ein zwei Zentimeter langer Hautschnitt in der Medianlinie zwischen Mandibula und Sternum durchgeführt. Die Speicheldrüsen wurden stumpf zur Seite präpariert und die prätracheale Halsmuskulatur mit zwei Pinzetten auseinander gezogen. Nach einem Einschnitt zwischen den trachealen Knorpelspangen wurde ein Polyethylen-Tubus zirka einen Zentimeter tief in die Trachea eingeführt und auf beidseitige Lungenatmung geachtet. Nach Freipräparation der rechten Vena jugularis externa wurde diese kranial ligiert. Mit Mikropinzette und Schere wurde die Vene tangential eingeschnitten und ein mit Sterofundin gespülter Polyethylen-Katheter (PE-Katheter) einen Zentimeter vorgeschoben. Der ZVK (zentraler Venenkatheter) diente der Flüssigkeits- und Medikamentengabe sowie der Reperfusion mit dem zur Schockinduktion und -aufrechterhaltung entnommenen Blut. Die linke Arteria carotis interna wurde in der tiefen paratrachealen Halsmuskulatur stumpf freipräpariert, kranial ligiert, proximal mit einer mikrochirurgischen Gefäßklemme versehen und nach Eröffnung des Gefäßes ein PE-Katheter eingeführt. Insgesamt wurde dieser dann zirka einen Zentimeter in das Lumen der Carotis vorgeschoben. Über diesen Katheter wurde die Herzfrequenz und der mittlere arterielle Blutdruck nach Anschluss an ein handelsübliches Druckwandler-System (PMSET 1DT-XX, Becton Dickinson) aufgenommen und über einen Monitor (Typ 66S, Hewlett Packard) kontinuierlich aufgezeichnet. Außerdem nahmen wir über diesen Zugang die Blutgasanalysen ab und induzierten den Schock.

### **3.2.4. Schockeinleitung und Schockaufrechterhaltung**

Der hämorrhagische Schock wurde in Anlehnung an das isobare, heparinfreie Schockmodell nach WIGGERS und INGRAHAM (1946) durch zügige Blutabnahme aus der Arteria carotis (Zielblutdruck 35 mmHg +/- 5 mmHg für 90 Minuten) induziert und aufrechterhalten. Nach 90 Minuten wurde den Tieren 60 % des entnommenen Blutvolumens (= Shedblood), welches durch Zitrat-Phosphat-Dextrose (CPD-Puffer 1:5 = 0,25 ml CPD / ml Blut) antikoaguliert wurde, innerhalb von fünf Minuten (zur Retransfusion) zurückgegeben. Im Anschluss daran folgten zwei Stunden Reperfusion, wobei in der ersten Stunde 200 % des Shedblood Volumens und in der zweiten Stunde 100 % des Shedblood Volumens als Ringeracetat-Lösung über einen Perfusor via ZVK gegeben wurden.

### **3.2.5. Hämodynamik**

Während der Schockversuche überwachten und dokumentierten wir kontinuierlich die Herzfrequenz und den mittleren arteriellen Blutdruck (MAP). Blutgasanalysen (BGAs) wurden vor der Induktion des hämorrhagischen Schocks, unmittelbar vor der Reperusionsphase sowie am Versuchsende durchgeführt. Aus den Blutproben wurde mit Hilfe eines handelsüblichen Gerätes (STAT profile 5, Nova Biochemicals, Rödermark, Deutschland) der arterielle Sauerstoffpartialdruck (pO<sub>2</sub>) [mmHg], der Kohlendioxidpartialdruck (pCO<sub>2</sub>) [mmHg], Laktat [mmol/l], Hämatokrit [%] sowie der Basenüberschuss (Base Excess, BE) [mmol/l] bestimmt.

### **3.2.6. Leberentnahme**

Nach zwei Stunden Reperfusion wurde die Leber entnommen. Dazu wurde die Ratte median laparotomiert. Im Anschluss an die Unterbindung der Arteriae epigastricae superiores et inferiores wurde die Rektusmuskulatur auf beiden Seiten transversal ein bis zwei Zentimeter eingeschnitten. Die Pfortader wurde freipräpariert und ligiert. Kaudal der Vena splenica brachten wir einen gespülten PE-Katheter in das Lumen der Pfortader ein. Die Vena cava inferior wurde eingeschnitten und danach wurde mit zwanzig Millilitern Sterofundin über den Katheter die Leber nahezu blutleer gespült. Als nächstes erfolgte die zügige Entnahme der Leber, wobei man zwei Stücke für die immunhistochemische Aufarbeitung in Formalin fixierte und zwei Stücke

entsprechend den Angaben des Herstellers in RNA-Later einbettete. Der verbliebene Rest der Leber wurde bei -70 °C in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

### **3.2.7. Versuchstiergruppen**

Um die Wirkung von Ramelteon und Melatonin analysieren zu können, wurden sechs verschiedene Gruppen von Tieren gebildet:

1. Drei Schocktiergruppen, die dem hämorrhagischen Schock unterzogen wurden und anschließend entweder Vehikellösung (5 % DMSO), Melatonin (Dosierung 1 mg/kg) oder Ramelteon (Dosierung 1 mg/kg) erhielten.
2. Drei Gruppen scheinoperierter Tiere (Sham-Tiere), die nicht dem hämorrhagischen Schock unterzogen wurden, und entweder Vehikellösung (5 % DMSO), Melatonin (Dosierung 1 mg/kg) oder Ramelteon (Dosierung 1 mg/kg) erhielten.

Für alle Gruppen wurde  $n = 5$  festgesetzt. Alle Tiere bekamen die Medikamentenlösungen in der Dosis 0.5 ml/100g Körpergewicht appliziert.

### **3.2.8. RNA-Isolierung**

Die RNA-Isolierung erfolgte mittels eines handelsüblichen, auf der Methode nach Chomczynski und Sacchi (Chomczynski 1987) basierenden RNA-Isolierungssets (RNeasy Mini kit, Quiagen, Hilden, Germany). Dafür wurden 70-80 mg Lebergewebe von jedem Tier am Ende des Versuches verwendet und bis zur weiteren Verarbeitung in einer RNA-Later-Lösung (Quiagen, Hilden, Germany) aufbewahrt.

In einem ersten Schritt homogenisierten wir die Leberproben mit einem Guanidiniumisothiocyanat-Puffer (4 M Guanidinisothiocyanat, 20 mM Natriumcitrat, 0,5 % N-Laurylsarkosin, 2-Mercaptoethanol). Anschließend wurden die Proben mit Proteinase K (20 mg/ml; Invitrogen, Karlsruhe Germany) zwecks sofortiger Inaktivierung endogener Nukleasen (DNase, RNasen) versetzt. Um eine komplette Dissoziation des Nukleoproteinkomplexes zu ermöglichen, erfolgte eine Phenol-Chloroform-Extraktion (wassergesättigtes Phenol:Chloroform:Isomylalkohol= 250:49:1). Daran schloss sich eine Inkubation auf Eis für 30 Minuten an. Eine 20-minütige Zentrifugation bei 3000 x g führte zur Trennung des Gemisches in drei Phasen. In der unteren organischen und in der Interphase sammelten sich DNA und

Proteine, während die obere wässrige Phase, die etwa 40-50 % des Gesamtvolumens ausmachte, die RNA enthielt. Durch vorsichtiges Abpipettieren der obersten Phase wurde die RNA separiert.

Zur Reinigung der Proben von DNA wurde ein Verdau mit DNase (RNase free DNase Set Quiagen, Hilden, Germany) durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde das Reaktionsgemisch bestehend aus 5 µl 10 x DNase Puffer, 10 µg RNA in 40 µl DEPC-H<sub>2</sub>O und 25U DNase (RNase free) bei 37 °C für 2 h inkubiert. Um die DNase zu inaktivieren, erfolgte anschließend eine Inkubation für 5 Minuten bei 90 °C. Zum Schluss wurde die Probe für weitere 5 Minuten auf Eis gestellt. Zur Überprüfung der vollständigen DNA-Eliminierung setzte man eine Kontroll-PCR mit Primern, die spezifisch für chromosomales β-Aktin sind, an. Bei so nachgewiesener DNA-Kontamination, wurde der Verdau nach oben beschriebenem Protokoll wiederholt bis die Probe DNA frei war.

Anschließend wurde die verbliebene RNA mit 70 % Isopropylalkohol bei -20 °C gefällt. Aus jeder Leberprobe wurden auf diese Art und Weise etwa 140 µg RNA gewonnen. Die Isolate lagerte man bei -80 °C bis sie für die RTq-PCR benötigt wurden.

### **3.2.9. RNA-Qualitätskontrollen**

#### **3.2.9.1. Photometrische Konzentrationsbestimmung**

Die Reinheit der RNA wurde photometrisch ermittelt, indem bei einer Wellenlänge von 260 nm (Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren) und 280 nm (Absorptionsmaximum von Proteinen) die Extinktion (E) gemessen wurde. War der Koeffizient kleiner als 1,9, so war die Präparation mit Protein, genomischer DNA und/oder aromatischen Substanzen kontaminiert.

#### **3.2.9.2. Agarosegelelektrophorese der Gesamt-RNA**

Mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese wurden unterschiedliche RNA-Fragmente ihrer Größe nach aufgetrennt. Zu diesem Zweck lösten wir jeweils 20 µg RNA in Probenpuffer (50 % Formamid, 2,2 M Formaldehyd, 50 mM 3-[N-morpholino]-propansulfonsäure [pH 7,0], 2,72 mg Saccharose, 34 µg Bromophenolblau, 0,55 µg Ethidiumbromid). Es folgte eine 30-minütige Inkubation im Wasserbad bei 65 °C zur Denaturierung. Daran schloss sich eine Elektrophorese für 1,5 Stunden bei 120 Volt

in einem 1,2%igen Agarose-Formaldehyd-Gel an. Mittels Kapillarkräften transferierten wir die RNA auf eine positiv geladene Nylonmembran (Boehringer Mannheim, Mannheim). Als Transferpuffer wurde 10 x SSC (0,15 M Natriumcitrat, 1,5 M Natriumchlorid, pH 7,0) verwendet. Anschließend wurde die RNA durch UV-Bestrahlung (Stratalinker 1800, Stratagene, La Jolla, CA) auf der Membran fixiert. Durch die Zugabe des interkalierenden Farbstoffes Ethidiumbromid wurde die RNA angefärbt und konnte anschließend durch UV-Licht (302 nm) sichtbar gemacht werden. Das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten der 28S- und der 18S-rRNA der für die RTq-PCR verwendeten Proben betrug mindestens 2:1.

#### 3.2.9.3. RNA-Integritätsnummer (RIN)

In diesem System wird der RNA-Qualität ein numerischer Zahlenwert zugeordnet. Eine Software berechnet einen Wert mit Hilfe von ribosomalen Untereinheiten 28S- und 18S-rRNA, deren Verhältnis und den resultierenden Abbauprodukten. Die Skala erstreckt sich von 1 bis 10. 10 beschreibt eine völlig intakte RNA, während 1 einer komplett degradierten RNA entspricht. Nur RNA-Proben, deren RIN-Wert größer 7 war, wurden für die weitere Analytik zugelassen.

### 3.2.10. Real-Time-Quantitative Polymerase Chain Reaction (RTq-PCR)

#### 3.2.10.1. Prinzip der RT-PCR

Soll RNA in der PCR amplifiziert werden, so muss mit dem Enzym Reverse-Transkriptase (RNA-abhängige-DNA-Polymerase) zuerst eine (komplementäre) cDNA (complementary DNA) synthetisiert werden. Dies hat zudem den Vorteil, dass die RNA nicht mehr durch ubiquitär vorkommende RNasen abgebaut wird und als cDNA thermisch stabiler ist. Es ist dann möglich im darauffolgenden Reaktionsschritt durch die Amplifizierung von cDNA die ursprüngliche mRNA-Menge quantitativ zu erfassen. Aus diesem Grund wird dieses Verfahren zur vergleichenden Expressionsanalyse von verschiedenen Gewebeproben genutzt. Für diese Arbeit wurde ein Zwei-Schritt-PCR-Protokoll verwendet.

#### 3.2.10.2. Durchführung der Reversen Transkription

Für die Reverse Transkription wurde High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems) verwendet. Aliquots von jeweils 5 µg der isolierten RNA wurden mit Aqua injectabilia auf ein Gesamtvolumen von 10 µl aufgefüllt. Diesem Ansatz fügten wir nach Angaben des Herstellers einen Mastermix aus reverser Transkriptase, dem zugehörigen Puffer, Random Hexamer Primer, dNTP Mix und Wasser hinzu. Im Thermocycler wurde ein zweistufiges Temperaturprofil, mit 25 °C für 10 Minuten und 37 °C für 120 Minuten gefahren.

#### 3.2.10.3. Durchführung der RTq-PCR

Zur Durchführung der RTq-PCR wurden jeweils 10 µl verdünnter cDNA für zwei getrennte Versuchsreihen verwendet. In diesem Volumen befanden sich 10 ng RNA-Äquivalente in der ersten und 0,5 µg RNA-Äquivalente in der zweiten Versuchsreihe. Zu jedem Ansatz wurde nach Protokoll des Herstellers Taq-Man Universal PCR Master-Mix, rattenspezifische inventarisierte Primer, Taq-Man-Sonden für MT-1- (Rn01447987\_ml) sowie MT-2-Rezeptoren (Rn01447987\_ml) und Wasser hinzugefügt. Die Messung des laserinduzierten Fluoreszenzspektrums während der Reaktion erfolgte unter Zuhilfenahme des GeneAmp 5700 Sequence Detection System (SDS) von Applied Biosystems.

#### 3.2.10.4. Durchführung der Auswertung der RTq-PCR

Zur Beurteilung der differenzierten Genexpression von MT-1-Rezeptoren, setzten wir die MT-1-mRNA der Gruppe scheinoperierter Vehikel-Tiere als Standard. Es wurde ein Quotient aus der MT-1-Genexpression der interessierenden Gruppe gegen diesen Standard gebildet. Für eine signifikante Hochregulation von MT-1-Rezeptoren musste das so berechnete Verhältnis  $\geq 2$  und für herunterregulierte Gene  $\leq 0,5$  sein.

#### **3.2.11. Western Immunoblot Analyse**

Als erster Schritt der Aufarbeitung wurden 100 mg Lebergewebe homogenisiert. Dafür wurden die Proben mit dem zehnfachen Volumen an Zelllysepuffer versetzt. Durch zehnminütiges Abzentrifugieren bei 18 000 x g wurden die unlöslichen Bestandteile von dem löslichen Gesamtprotein getrennt. Danach erfolgte eine Bestimmung der Proteinkonzentration im Überstand durch den Bradford Test.

Diese spektralphotometrische Messung beruht auf dem Prinzip, dass das Absorptionsmaximum einer sauren Lösung von Comassie Brillant Blau G-250 bei der Bindung an ein Protein von 465 nm nach 595 nm verschoben wird. Als Referenz diente das Bradford Protein.

Daraufhin wurden die Proben durch fünfminütiges Kochen in einem Probenpuffer (62,5mM Tris, pH 6.8, 2 % DSD, 10 % Glycerin, 5 % 2-Mercaptoethanol, 0,0025 % Bromophenolblau) denaturiert. Für die SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) wurden Aliquots von 100 µg pro Bahn in 12 % Tris-Glycin Gelen (Anamed, Offenbach, FRG) aufgetragen. Die Elektrophorese wurde unter reduzierenden Bedingungen durch Verwendung des entsprechenden Puffers nach Lämmli (25 mM Tris, pH 8.3, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS) bei 215 Volt für 1 h 15 min durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde aufgereinigtes MT-1-Protein aus dem ZNS der Ratte benutzt. Anschließend wurden die Gele mittels Elektrophorese auf Polyvinylidendifluorid-Membranen (Roche) geblottet und danach bei 4 °C bis zur Antigendetektion für maximal 24 h aufbewahrt. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran für 30 min bei Raumtemperatur in 5 % fettfreier Trockenmilch (Slimfast) in Tween-haltiger Tris-gepufferter Kochsalzlösung (TTBS, 20 mM Tris, pH 7.5, 0.5 M Natriumchlorid, 0,1 % Tween20) vorinkubiert. Danach schloss sich die Inkubation mit einem polyklonalen Kaninchen-Anti-Ratte-MT-1- oder Anti-Maus-MT-2-Primärantikörper (Verdünnung 1:1000, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA) für 90 min bei Raumtemperatur an. Der ungebundene Primärantikörper wurde durch wiederholtes Waschen der Membran mit Tween-haltiger Tris-gepufferter Kochsalzlösung entfernt. Als Sekundärantikörper wurde ein mit Meerrettichperoxidase gekoppelter Esel-Anti-Kaninchen-Sekundärantikörper (Verdünnung 1:10 000, Santa Cruz SC-2020) unter den bereits beschriebenen Bedingungen verwendet. Nach erneutem mehrmaligem Waschen mit TTBS erfolgte die Detektion des Antigen-Antikörper-Konjugates mittels verstärkter Chemolumineszenz (ECL Western Blot Analysis System, Amersham Buchler, Braunschweig) nach Anleitung des Herstellers.

Verantwortlich für die Chemolumineszenz ist das durch die Peroxidase oxidierte Luminol. Direkt nach der Oxidation befindet es sich in einem angeregten und instabilen Zustand. Unter Aussendung von Licht kehrt es dann wieder in den energetisch stabileren Grundzustand zurück.

Das so entstehende Signal der Membran wurde nach kurzem Kontakt (1-5 Minuten) mit einem Röntgenfilm (Fuji Medical X-Ray Film) auf diesem sichtbar. Dieser Film befand sich zusätzlich in einer mit Verstärkerfolie ausgekleideten Röntgenkassette. Die Auswertung erfolgte mittels Densitometrie.

### **3.2.12. Immunhistochemische Färbung**

Das Lebergewebe wurde immunhistochemisch gefärbt um zu klären, wie die zelltypspezifische und zonale MT-1- und MT-2-Rezeptoren Expression in der Leber ist.

#### **3.2.12.1. Probenaufbereitung**

Um die unmittelbar einsetzende Auto- bzw. Heterolyse zu stoppen, wurden die nach zweistündiger Reperfusion entnommenen Leberproben (siehe 3.2.5.) in 3,8 % Formaldehydlösung für mindestens einen Tag fixiert. Anschließend fand eine Entwässerung durch eine aufsteigende Alkoholreihe sowie eine Entfettung durch Xylol statt. Daraufhin folgte die Paraffineinbettung. Mit einem Schlittenmikrotom wurden danach 5-7 µm dicke Schnitte angefertigt. Nachdem diese über Nacht bei 37 °C getrocknet waren, wurden sie bis zu ihrer weiteren Verwendung bei 4 °C aufbewahrt. Vor der eigentlichen histologischen Färbung entparaffinierten wir die Präparate in Xylol, rehydratisierten sie in einer absteigenden Alkoholreihe und überführten sie in Aqua bidest.

#### **3.2.12.2. Prinzip der immunhistochemischen Färbung**

Die Grundlage dieser Färbung bildet ein Primärantikörper, der gegen das zu untersuchende Protein gerichtet ist und auf der Basis einer Antigen-Antikörperreaktion bindet. Der Sekundärantikörper, der gegen den Fc-Teil des Primärantikörpers gerichtet ist, trägt ein Signalmolekül. Da mehrere Sekundärantikörper binden können, erreicht man eine Signalverstärkung. Die an den Sekundärantikörper gekoppelten Signalmoleküle machen die Reaktion sichtbar.

### 3.2.12.3. Durchführung der Labeled-Streptavidin-Biotin/Horseradish-Peroxidase-Färbung (LSAB/HRP)

Als erstes erfolgte zur Wiederherstellung der verloren gegangenen Immunreaktivität eine Antigendemaskierung durch Hitze, indem man die Schnitte mit Citratpuffer versetzte und dreimal für jeweils fünf Minuten erhitzte. Nachdem diese wieder abgekühlt waren, wurden sie mit PBS (Phosphat buffered saline)-Puffer gewaschen. Zur Vermeidung unerwünschter Hintergrundfärbungen blockierte man die endogene Peroxidase mit 3 % Wasserstoffperoxid-Methanol Lösung und führte eine Vorinkubation mit Blockierungsserum durch. Das hierfür verwendete Kaninchen-Serum verhinderte die unspezifische Bindung der Primärantikörper an stark geladene Kollagen- und/oder Bindegewebsselemente der Präparate. Zu diesem Zweck verwendete Seren entstammen immer von der Spezies in der auch der Sekundärantikörper hergestellt wurde. Anschließend erfolgte ein weiterer Spülschritt für 3 x 5 Minuten mit PBS-Puffer. Die Schnitte wurden dann mit den polyklonalen Anti-Ratten-MT1- oder -MT2-Primärantikörpern (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA) für 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach dreimaligem Spülen mit Pufferlösung wurde der biotinylierte Kaninchen-Anti-Ratten-Sekundärantikörper (Link) für 20 Minuten bei Raumtemperatur aufgetragen. Bevor wir die Präparate mit dem Streptavidin-Biotin-Enzymkomplex (Label) versetzten, spülten wir erneut ausgiebig mit Pufferlösung. Zum Schluss wurden den gewaschenen Schnitten eine Substratlösung, die das Chromogen 3,3-Diaminobenzidine in Kombination mit 3 % CoCl<sub>2</sub> enthielt, hinzugefügt. Daraus resultierte ein durch die Meerrettich (horseradish)-Peroxidase hervorgerufener brauner Niederschlag. Anschließend wurden die Schnitte mit Hämatoxylin gegengefärbt. Im nächsten Schritt schloss sich eine mikroskopische Untersuchung und Beurteilung der Präparate an.

### 3.2.13. Melatonin ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)

Um zu evaluieren, welchen Änderungen der Melatoninplasmaspiegel im Verlauf eines Versuches unterworfen ist, führten wir einen Melatonin-ELISA durch. Zu diesem Zweck wurden den Ratten zu Versuchsbeginn (direkt nach Ende der chirurgischen Präparation), nach 45, 95, 150 und 210 Minuten Blutproben entnommen.

Das hierfür verwendete Kit von IBL International GmbH Hamburg basiert auf dem Prinzip des kompetitiven Immunoassays. Das heißt, dass das in der Probe zu detektierende Antigen mit einem biotinylierten Antigen des Kits um die Anzahl der Bindungsstellen des an den Wells der Mikrotiterplatte gebundenen Antikörpers konkurriert. An die Inkubation schloss sich eine Waschung zum Entfernen des nicht gebundenen biotinylierten Kit-Antigens an. Der gebundene Anteil wird durch den Marker alkalische Phosphatase und dessen Substrat p-Nitrophenylphosphat sichtbar gemacht. Es liegt eine negative Proportionalität der Substratreaktion zur Antigenkonzentration in der Probe vor.

### **3.2.14. Statistische Auswertung**

Die statistische Analyse der Daten erfolgte unter Zuhilfenahme der Software SigmaStat (Systat Software, Erkrath, Deutschland).

Erster Schritt der Auswertung war die Prüfung auf Normalverteilung durch den Kolmogorov-Smirnow-Test. Um gleiche Varianz sicherzustellen, setzten wir den Levene-Median-Test ein. Bei normal verteilten Daten wurde die One Way Analysis of Variance (ANOVA) verwendet, bei nicht-normalverteilten Daten ein ANOVA on Ranks; anschließend wurde eine „post hoc“-Testung durch den Student Newman-Keuls-Test bzw. mittels Dunns-Test durchgeführt. Als Signifikanzniveau wurde ein p-Wert von  $< 0,05$  festgelegt.

Die graphische Aufarbeitung erfolgte mit dem Softwarepaket SigmaPlot 9.0 (Systat Software, Erkrath, Deutschland). Die Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (standard deviation = SD) angegeben.

## 4. Kapitel: Ergebnisse

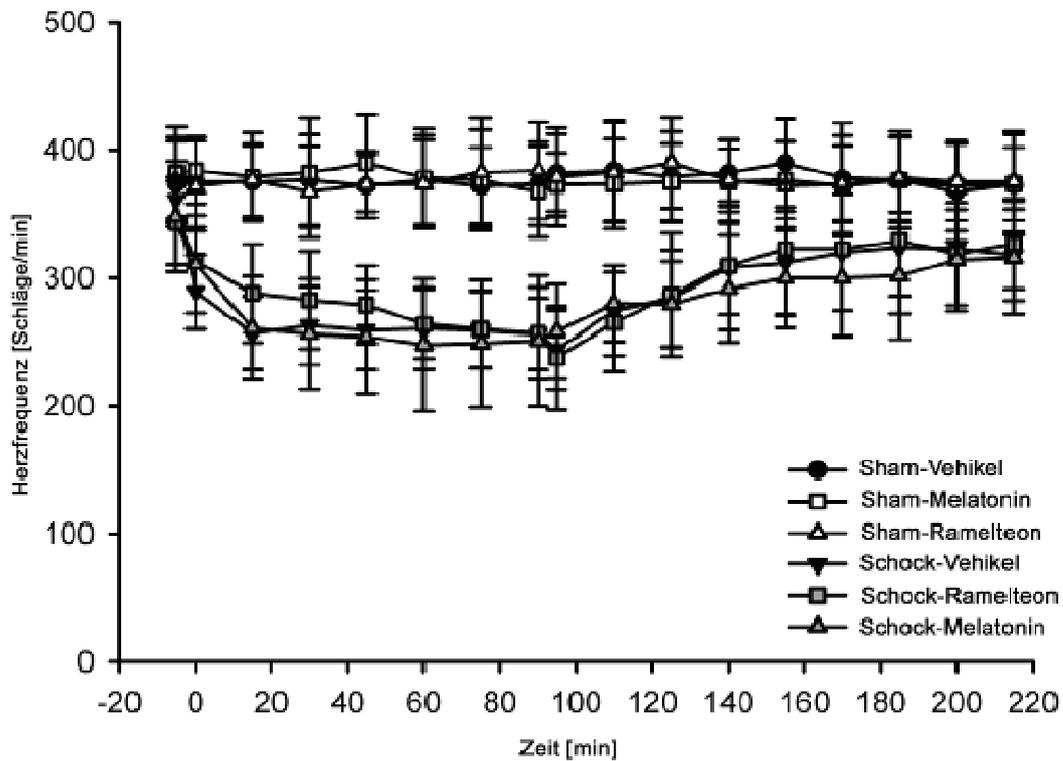
### 4.1. Hämorrhagisches Schockmodell: Makrohämodynamische Effekte

Die Ausgangswerte für den mittleren arteriellen Blutdruck (MAP = mean arterial pressure) und die Herzfrequenz (HF) zu Anfang des Versuches zeigten bei allen Gruppen keine signifikanten Unterschiede ( $p > 0,05$ ).

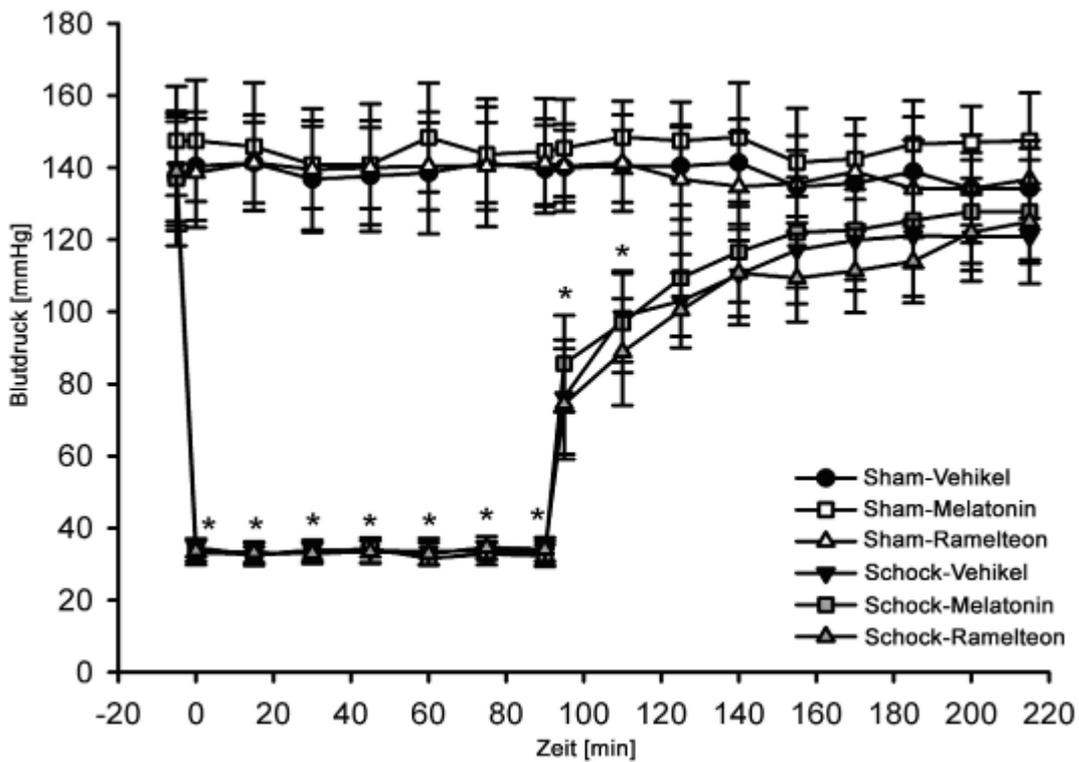
In den Schockgruppen kam es durch Schockinduktion zu einer signifikanten Abnahme der Herzfrequenz im Vergleich zu den Ausgangswerten ( $p < 0,05$ ), die für die gesamten 90 Minuten des Schocks auch erniedrigt blieb (siehe Abbildung 3).

Um den mittleren arteriellen Blutdruck auf  $35 \text{ mmHg} \pm 5 \text{ mmHg}$  für 1,5 Stunden zu senken, war in allen Schockgruppen der Entzug von ähnlichen Blutvolumina nötig. Es ergaben sich diesbezüglich keine statistisch signifikanten Unterschiede ( $p = 0,875$ ). In der Schock-Vehikel-Gruppe wurden durchschnittlich  $47,31 \text{ ml/kg} \pm 4,62 \text{ ml/kg}$  entnommen. Bei den Schock-Therapie-Tieren waren bei Melatoningabe  $45,66 \text{ ml/kg} \pm 4,99 \text{ ml/kg}$  und bei Ramelteongabe  $46,29 \text{ ml/kg} \pm 5,57 \text{ ml/kg}$  notwendig. Die sich nach einstündigem Schock anschließende zweistündige Reperfusion mit Retransfusion von 60 % des entnommenen Blutes und Ringerlaktat führte zur schrittweisen Normalisierung von Herzfrequenz und Blutdruck. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Schockgruppen ( $p > 0,05$ ) in Bezug auf Herzfrequenz und Blutdruck während des Schocks und während der Reperfusion.

Bei den scheinoperierten Tieren traten über den gesamten Zeitraum des Versuchs hinweg keine relevanten Abweichungen hinsichtlich des mittleren arteriellen Drucks und der Herzfrequenz auf. Die Gabe von Vehikel-Substanz, Melatonin oder Ramelteon beeinflusste diese Werte nicht. Herzfrequenz und Blutdruck wiesen zwischen den einzelnen Tiergruppen, die scheinoperiert waren, keine statistisch signifikanten Unterschiede auf ( $p > 0,05$ ).



**Abbildung 3:** Herzfrequenz im Laufe des Versuchs



**Abbildung 4:** Blutdruck im Laufe des Versuchs

Ein Stern (\*) kennzeichnet eine Signifikanz mit einem p-Wert < 0,05 im Vergleich zu den Ausgangswert. min = Minuten, mmHg = Millimeter Quecksilbersäule

## 4.2. Blutgasanalyse

Die Ausgangswerte für die untersuchten Parameter Hämoglobin (Hb), Laktat, pH und Basenüberschuss (BE = base excess) unterschieden sich nicht signifikant zwischen Schocktieren und scheinoperierten Tieren (siehe Tabelle 1).

Der hämorrhagische Schock führte zu einem signifikantem Abfall von Hb und BE sowie zu einer signifikanten Zunahme des Laktat in allen Schocktiergruppen im Vergleich zu den Ausgangswerten ( $p < 0,05$ ).

In den durchgeführten Versuchen zeigten sich in Bezug auf den BE und den pH zwischen den Schockgruppen keine statistisch relevanten Unterschiede.

Am Ende des Versuches sah man eine signifikante Erholung von der azidotischen Stoffwechsellage mit sich normalisierenden Werten von Hb, Laktat und BE. Diese Beobachtung war signifikant mit einem p-Wert von  $< 0,05$  im Vergleich mit Werten erhoben am Ende des hämorrhagischen Schocks.

Bei den scheinoperierten Tieren wurden weder signifikante Schwankungen der vier beschriebenen Laborparameter festgestellt, noch eine Beeinflussung durch Vehikelsubstanz, Melatonin oder Ramelteon beobachtet (siehe Tabelle).

		Versuchsbeginn	Schockende	Versuchsende
Hb	Sham/Vehikel	10,7 ± 0,4	10,1 ± 0,4	10,1 ± 0,5
	Sham/Melatonin	11,2 ± 0,7	10,6 ± 0,5	10,0 ± 0,7
	Sham/Ramelteon	11,4 ± 0,4	10,2 ± 0,4	9,9 ± 0,5
	Schock/Vehikel	11,2 ± 0,2	* 6,3 ± 0,4	# 8,7 ± 0,4
	Schock/Melatonin	11,1 ± 0,3	* 6,0 ± 0,5	# 8,5 ± 0,3
	Schock/Ramelteon	10,8 ± 0,3	* 6,7 ± 0,5	# 8,4 ± 0,4
Laktat	Sham/Vehikel	1,7 ± 0,2	1,6 ± 0,3	1,7 ± 0,1
	Sham/Melatonin	1,4 ± 0,2	1,9 ± 0,2	1,4 ± 0,3
	Sham/Ramelteon	1,6 ± 0,2	1,8 ± 0,1	1,3 ± 0,2
	Schock/Vehikel	1,4 ± 0,2	* 8,2 ± 0,5	# 1,8 ± 0,2
	Schock/Melatonin	2,0 ± 0,1	* 9,1 ± 0,6	# 1,6 ± 0,1
	Schock/Ramelteon	1,4 ± 0,2	* 7,5 ± 0,8	# 1,4 ± 0,2
pH	Sham/Vehikel	7,37 ± 0,02	7,39 ± 0,02	7,40 ± 0,02
	Sham/Melatonin	7,36 ± 0,01	7,38 ± 0,01	7,41 ± 0,01
	Sham/Ramelteon	7,36 ± 0,02	7,39 ± 0,02	7,41 ± 0,02
	Schock/Vehikel	7,36 ± 0,02	7,28 ± 0,02	7,33 ± 0,03
	Schock/Melatonin	7,37 ± 0,02	7,29 ± 0,02	7,35 ± 0,02
	Schock/Ramelteon	7,35 ± 0,01	7,27 ± 0,02	7,36 ± 0,02
BE	Sham/Vehikel	-1,6 ± 0,8	- 1,8 ± 0,5	-3,8 ± 1,2
	Sham/Melatonin	-1,3 ± 1,0	- 2,1 ± 0,8	-4,5 ± 0,6
	Sham/Ramelteon	-0,8 ± 1,2	- 2,0 ± 1,0	-3,1 ± 1,7
	Schock/Vehikel	-1,8 ± 0,9	* -12,0 ± 1,9	# -6,5 ± 1,5
	Schock/Melatonin	-1,0 ± 0,9	* -11,3 ± 1,6	# -5,8 ± 0,9
	Schock/Ramelteon	-2,0 ± 0,7	* -12,4 ± 1,7	# -6,9 ± 1,1

**Tabelle 1:** Blutgasanalysen

Ein Stern (\*) kennzeichnet eine Signifikanz mit einem p-Wert < 0,05 im Vergleich zum Beginn des Versuchs.

Eine Raute (#) steht für eine Signifikanz mit einem p-Wert < 0,05 im Vergleich zu den Werten am Ende des Schocks.

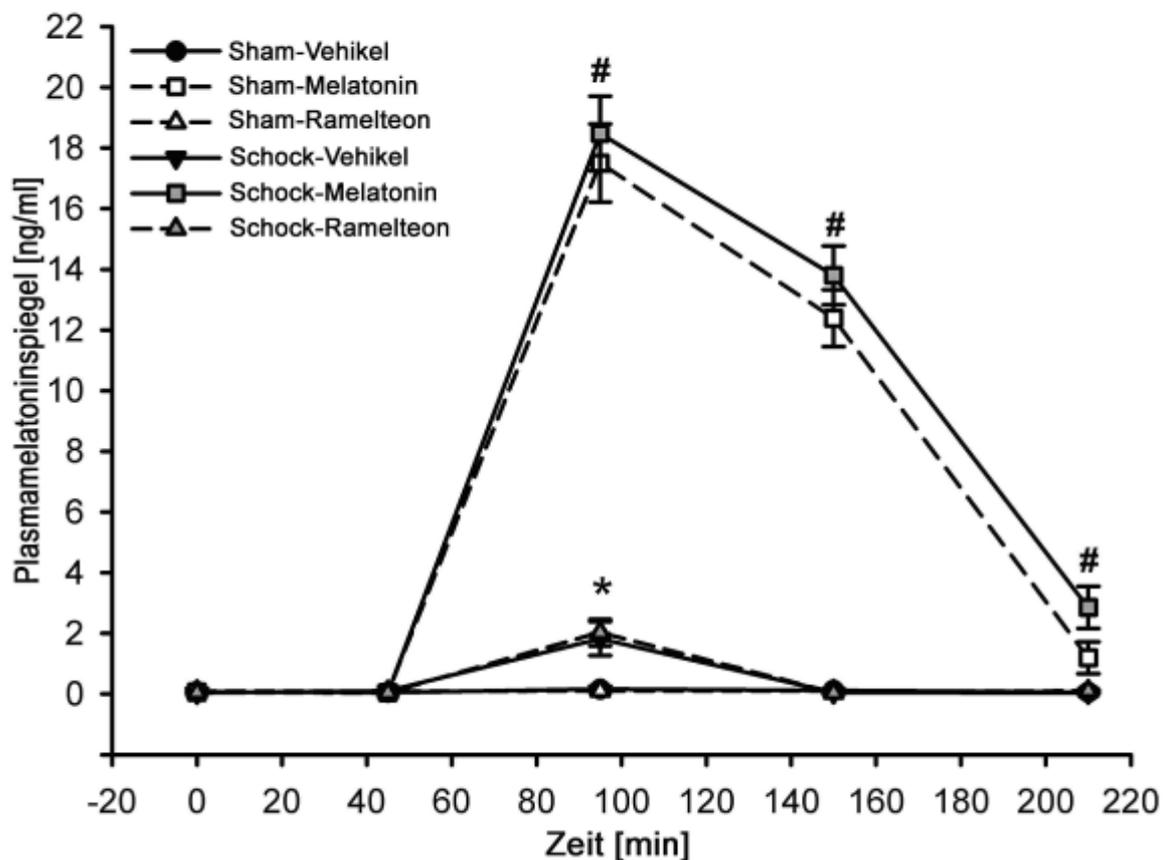
Hb = Hämoglobin, BE = Basenüberschuss (base excess)

### **4.3. Plasmamelatonin Spiegel**

Bei scheinoperierten Tieren, die entweder Ramelteon oder Vehikelsubstanz erhielten, lag der Plasmamelatonin Spiegel im Blut im physiologischen Bereich für diese Tageszeit und blieb über die gesamte Versuchsdauer konstant (siehe Abbildung 5).

Nach hämorrhagischem Schock war der Plasmamelatonin Spiegel bei Tieren, denen Vehikelsubstanz oder Ramelteon appliziert wurde, signifikant erhöht (mit einem p-Wert  $< 0,001$  im Vergleich zu der entsprechenden Sham-Gruppe). Die einmalig erhöhten Melatonin Spiegel wurden fünf Minuten nach Beginn der Reperfusion beobachtet. Nach 150 Minuten hatte sich der Melatonin Spiegel im Blut auf Konzentrationen, wie sie vor Schockinduktion oder bei scheinoperierten Ramelteon- oder Vehikel-Tieren gemessen wurden, normalisiert. Bis Versuchsende bei 210 Minuten konnte kein weiterer Anstieg des Melatonin Spiegels beobachtet werden.

Supraphysiologische Plasmakonzentrationen von Melatonin waren in den Versuchsgruppen zu verzeichnen, denen Melatonin appliziert wurde (Schock/Melatonin-Tiere und Sham/Melatonin-Tiere). Der p-Wert war mit  $< 0,001$  im Vergleich zu allen anderen Versuchstiergruppen signifikant. Das Maximum der Melatoninkonzentration war fünf Minuten nach Beginn der Reperfusion und der damit verbundenen Melatoningabe zu sehen. Die gemessene Konzentration nahm dann bis zum Versuchsende kontinuierlich ab und war auch noch zum Schluss ebenfalls mit einem p-Wert  $< 0,001$  im Vergleich mit allen anderen Gruppen signifikant erhöht.



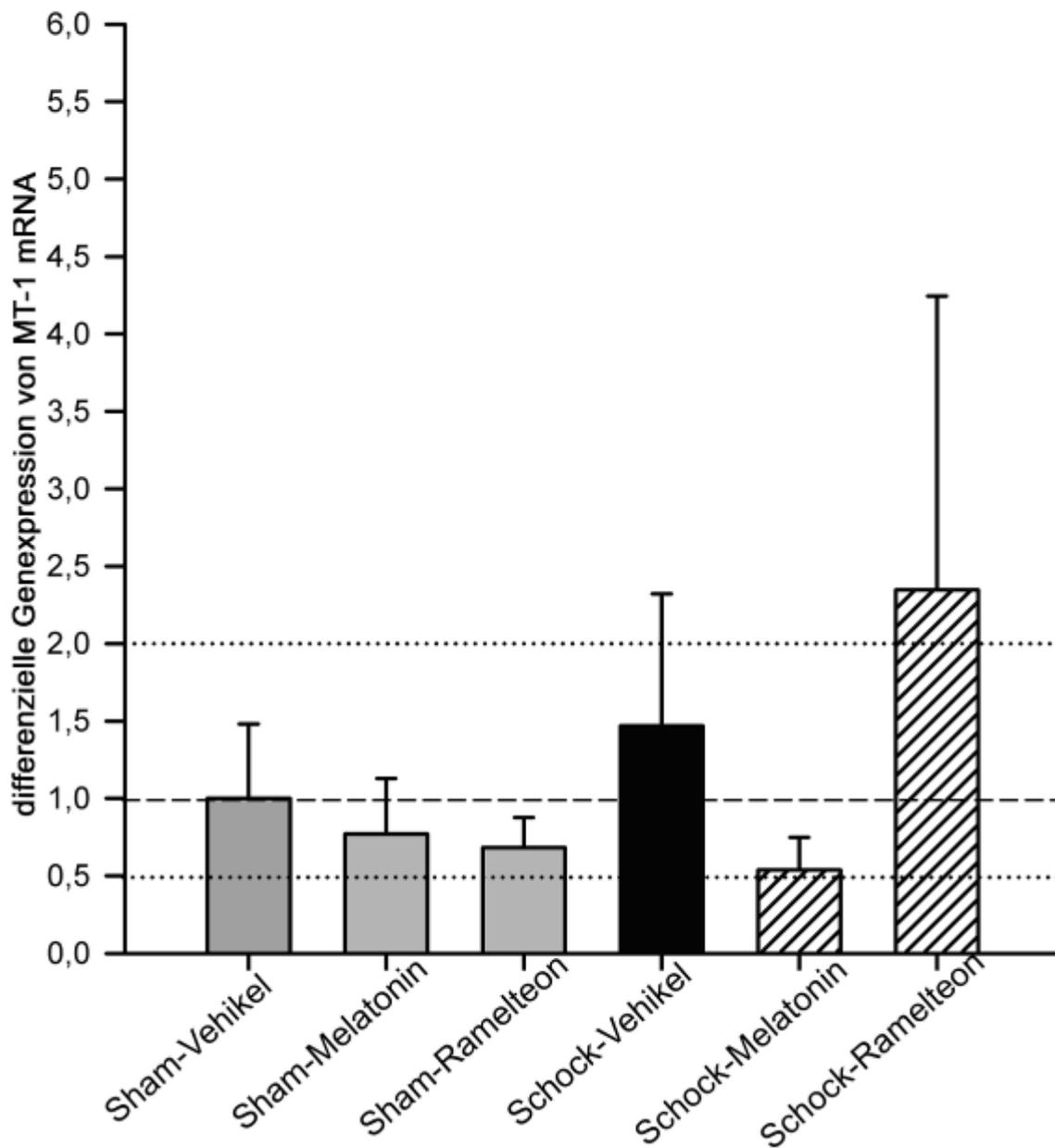
**Abbildung 5:** Plasmamelatoninspiegel

Ein Stern (\*) kennzeichnet eine Signifikanz mit einem p-Wert < 0,001 im Vergleich mit der Sham/Vehikel- und der Sham/Ramelteon-Gruppe.

Eine Raute (#) weist auf eine Signifikanz mit einem p-Wert < 0,001 im Vergleich mit allen anderen Gruppen hin. ng = Nanogramm, min = Minuten, ml = Milliliter

#### 4.4. Melatoninrezeptor mRNA

In allen Versuchstiergruppen gelang der Nachweis von MT-1-mRNA. MT-2-mRNA konnte in keiner Gruppe detektiert werden. Für die verschiedenen Schock- und scheinoperierten Gruppen konnte jedoch keine statistisch signifikante Hoch- oder Runterregulation der MT-1-mRNA-Expression gezeigt werden. Jedoch zeigte sich ein Trend zur gesteigerten MT-1-mRNA-Synthese in der Schock/Vehikel- und der Schock/Ramelteon-Gruppe.



**Abbildung 6:** Differenzielle Genexpression von MT-1 mRNA

Die gestrichelte Linie stellt den Durchschnittswert der MT-1 mRNA-Expression der Sham/Vehikel-Gruppe dar.

Die gepunktete Linie kennzeichnet den Quotient 0,5 für eine signifikante Runterregulation und den Quotienten 2,0 für eine signifikante Hochregulation der MT-1 mRNA-Expression.

#### **4.5. Melatoninrezeptorprotein**

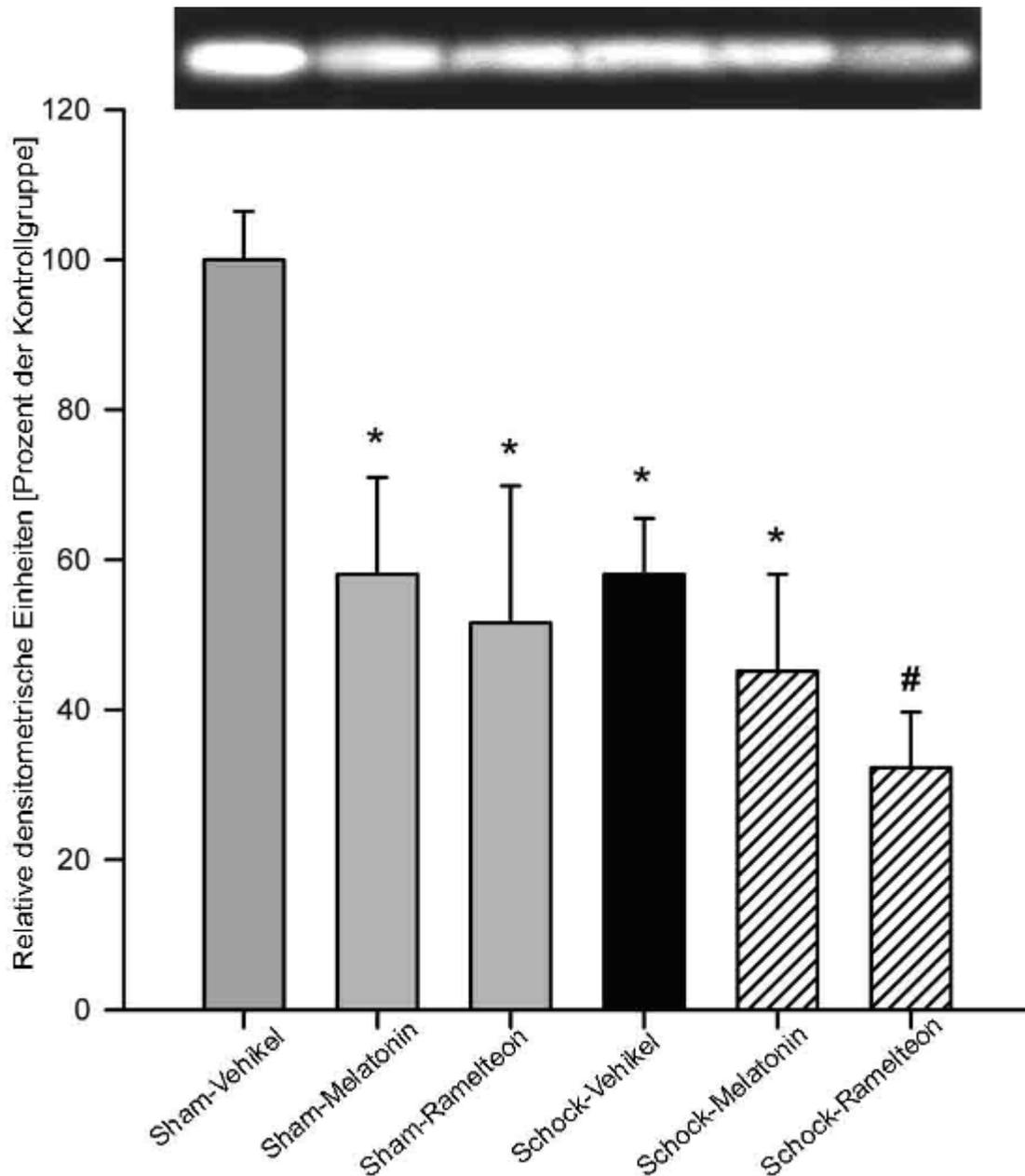
Mit Hilfe der Westernimmunoblotanalyse wurde die hepatische Expression von MT-1-Protein quantitativ erfasst. Wie bei der MT-1-mRNA-Analyse schon beschrieben, verwendete man auch hier die Sham/Vehikel-Gruppe als Standard und definierte die hier erfasste Menge an MT-1-Protein als 100 % (siehe Abbildung 7).

Für alle Gruppen konnte gezeigt werden, dass das MT-1-Rezeptorprotein in der Leber exprimiert wird. In keiner Gruppe wurde das MT-2-Rezeptorprotein nachgewiesen.

Im Vergleich der Sham-Gruppen untereinander war die Reduktion des MT-1-Proteins in der Sham/Melatonin- und in der Sham/Ramelteon-Gruppe im Vergleich zur Sham/Vehikel-Gruppe mit einem p-Wert  $< 0,01$  signifikant.

Ebenfalls war die Abnahme an MT-1-Protein in der Schock/Vehikel-Gruppe und in der Schock/Melatonin-Gruppe im Vergleich zur Sham/Vehikel-Gruppe signifikant (p-Wert  $< 0,01$ ).

Die deutlichste Reduktion von MT-1-Protein mit fast 50 % war in der Schock/Ramelteon-Gruppe zu finden und mit  $p < 0,01$  in Bezug auf die Sham/Vehikel-Gruppe hochsignifikant. Der p-Wert war im Vergleich sowohl mit der Schock/Vehikel-Gruppe mit 0,02 als auch in Bezug auf die Sham/Melatonin-Gruppe mit 0,42 signifikant.



**Abbildung 7:** Westernimmunoblotanalyse von MT-1 Protein

Der obere Teil der Abbildung zeigt einen Röntgenfilm des Westernblots von MT-1 Protein korrespondierend zu dem Histogramm darunter. Die Helligkeit des Signals korreliert direkt mit dem Gehalt an MT-1 Protein in der jeweiligen Gruppe.

Ein Stern (\*) kennzeichnet eine Signifikanz mit einem p-Wert < 0,01 im Vergleich mit der scheinoperierten Vehikelgruppe (Sham/Vehikel-Gruppe).

Eine Raute (#) steht für eine Signifikanz mit einem p-Wert < 0.05 im Vergleich mit der Schock-Vehikel Gruppe und allen scheinoperierten Gruppen (Sham-Gruppen).

#### 4.6. Räumliches Expressionsmuster von Melatoninrezeptoren

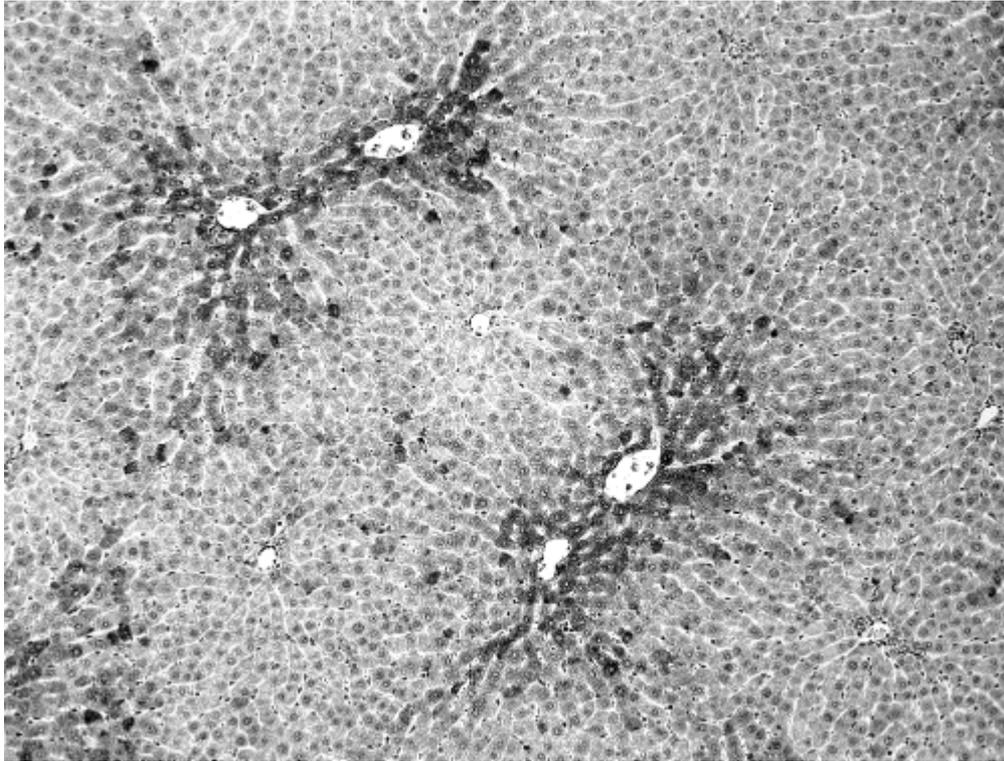
Wie auch bei der RTq-PCR der Nachweis von MT-2-mRNA und beim Westernimmunoblot der Nachweis von MT-2-Protein nicht gelang, konnten bei der

immunhistochemischen Färbung ebenfalls nur MT-1-Rezeptoren und nicht MT-2-Rezeptoren im Paraffinschnitt angefärbt werden.

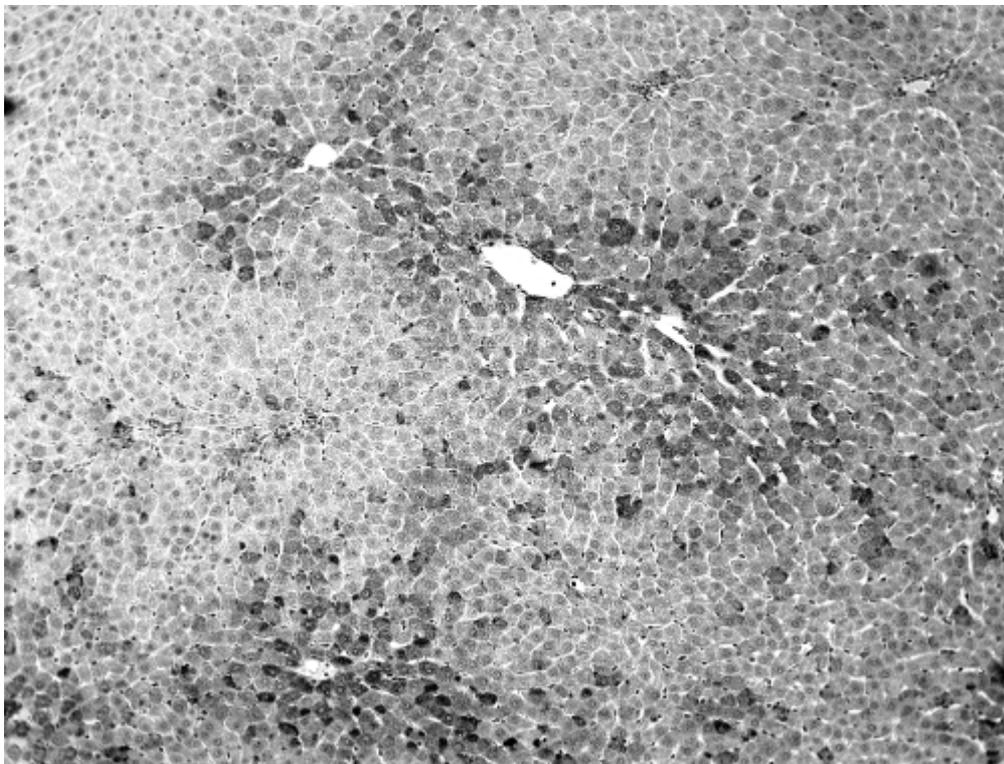
Bei Sham/Vehikel-Tieren zeigte sich eine dichte Anordnung von MT-1-Rezeptoren um die Zentralvene eines Leberläppchens. Im Gegensatz dazu waren in der Peripherie eines Azinus, sprich in den Regionen um die Periportalfelder, keine MT-1-Rezeptoren zu sehen (Abbildung 8 und 9).

Sowohl Melatoningabe (Abbildung 10) als auch Ramelteonapplikation (Abbildung 11) führten bei Sham-Tieren zu einer deutlichen Abnahme der MT-1-Rezeptordichte in der perizentralen Region. Ähnliche Veränderungen in der zentrolobulären MT-1-Rezeptordichte wurden bei allen Schockgruppen (Abbildung 12-14) beobachtet, unabhängig davon, ob sie die Vehikel-Substanz, Melatonin oder Ramelteon erhielten. In all diesen Gruppen zeigte sich das immunhistochemische Bild einer verminderten und vereinzelter Expression von perizentralen MT-1-Rezeptoren.

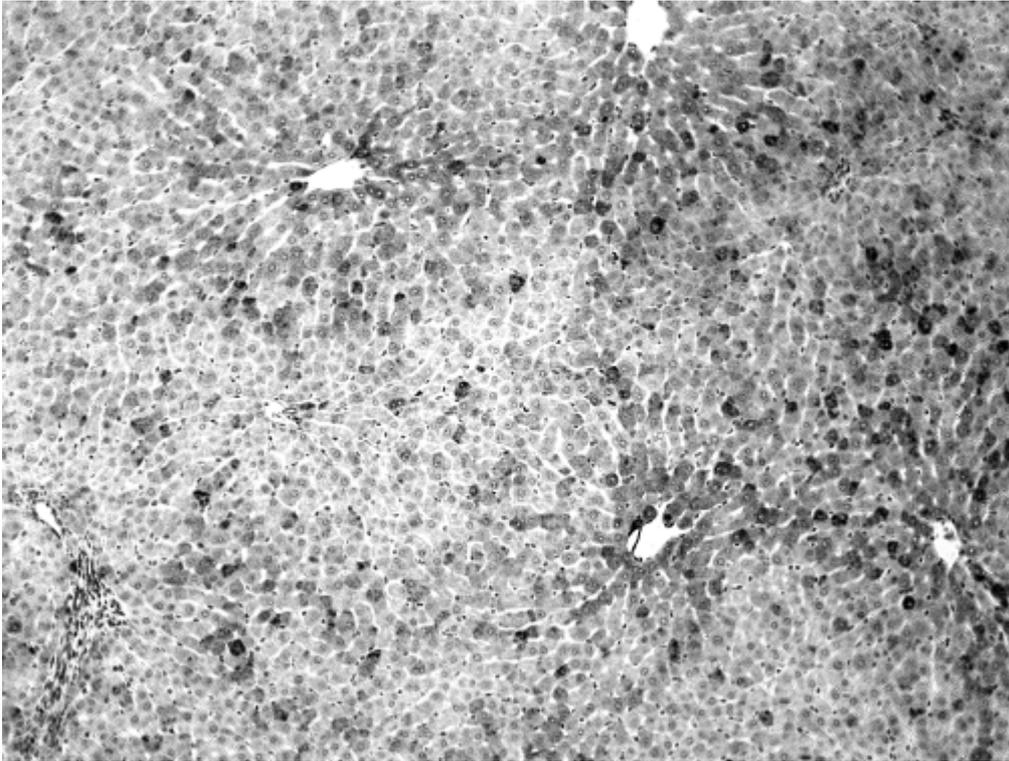
Alle nachfolgenden histologischen Abbildungen sind mit Hämatoxylin gefärbt und mit einer 100x Vergrößerung fotografiert worden.



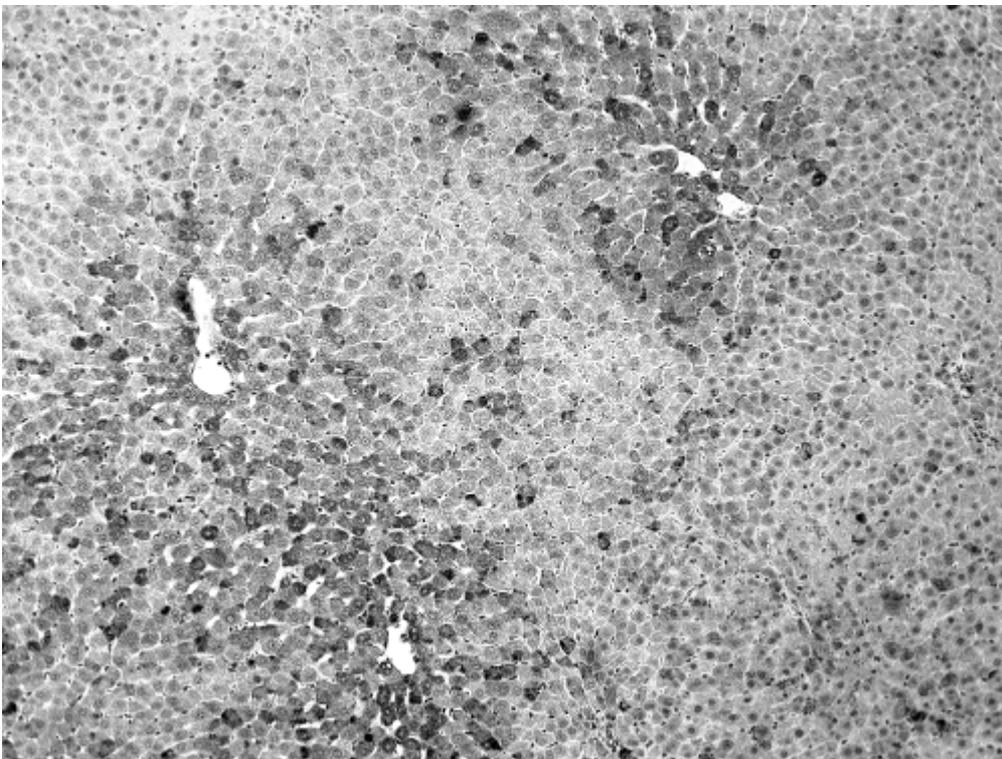
**Abbildung 8:** histologischer Schnitt der Leber eines Sham/Vehikel-Tieres  
Immunhistochemische Färbung von MT-1-Rezeptoren, Gegenfärbung mit Hämatoxylin, 100x  
Vergrößerung



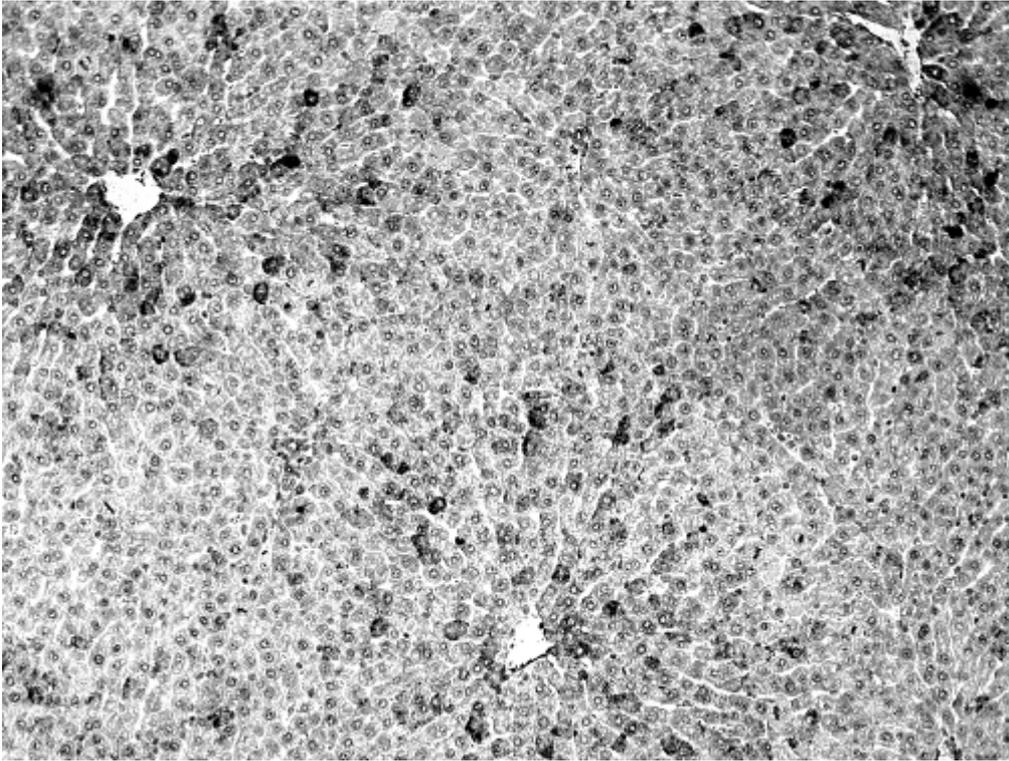
**Abbildung 9:** histologischer Schnitt der Leber eines Sham/Melatonin-Tieres  
Immunhistochemische Färbung von MT-1-Rezeptoren, Gegenfärbung mit Hämatoxylin, 100x  
Vergrößerung



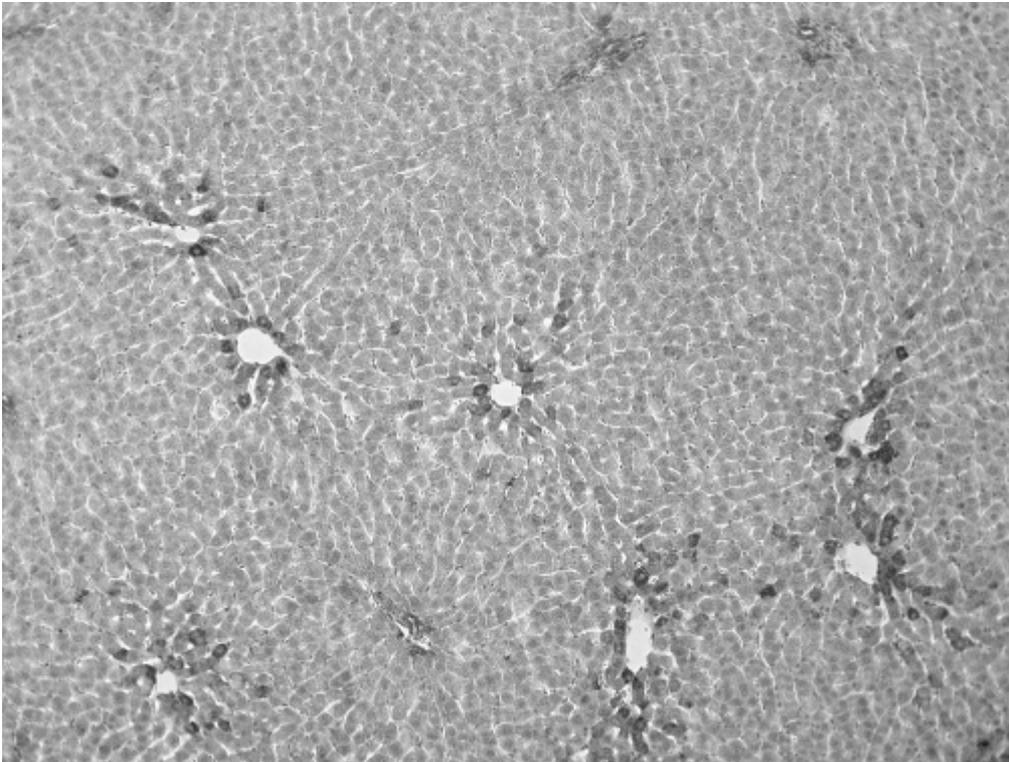
**Abbildung 10:** histologischer Schnitt der Leber eines Sham/Ramelteon-Tieres  
Immunhistochemische Färbung von MT-1-Rezeptoren, Gegenfärbung mit Hämatoxylin, 100x  
Vergrößerung



**Abbildung 11:** histologischer Schnitt der Leber eines Schock/Vehikel-Tieres  
Immunhistochemische Färbung von MT-1-Rezeptoren, Gegenfärbung mit Hämatoxylin, 100x  
Vergrößerung



**Abbildung 12:** histologischer Schnitt der Leber eines Schock/Melatonin-Tieres  
Immunhistochemische Färbung von MT-1-Rezeptoren, Gegenfärbung mit Hämatoxylin, 100x  
Vergrößerung



**Abbildung 13:** histologischer Schnitt der Leber eines Schock/Ramelteon-Tieres  
Immunhistochemische Färbung von MT-1-Rezeptoren, Gegenfärbung mit Hämatoxylin, 100x  
Vergrößerung

## 5. Kapitel: Diskussion

### 5.1. Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Leber der männlichen Sprague-Dawley-Ratte MT-1-Rezeptoren in einem bestimmten räumlichen Verteilungsmuster exprimiert. Diese hepatische Expression ist sowohl nach hämorrhagischem Schock alleine als auch in Kombination mit darauffolgender Melatonin- oder Ramelteongabe vermindert.

Die Bestimmung der Plasmamelatoninkonzentration mittels ELISA ergab eine einmalig erhöhte Konzentration während der Reperfusionsphase bei Schocktieren, denen entweder Ramelteon oder Vehikelsubstanz appliziert wurde. Im Gegensatz dazu war nach exogener Melatoningabe der Melatoninspiegel im Blut über den gesamten Zeitraum der Reperfusionsphase erhöht, um dann bis zum Versuchsende kontinuierlich abzufallen. Dies galt gleichermaßen für Schock- als auch für Sham-Tiere.

Mit Hilfe der RTq-PCR konnte nur MT-1-mRNA und nicht MT-2-mRNA in der Rattenleber detektiert werden. Es wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Höhe der MT-1-mRNA-Menge zwischen den einzelnen Tiergruppen beobachtet.

Mit Westernimmunoblot konnte nur MT-1-Protein, nicht aber MT-2-Protein in der Leber nachgewiesen werden. Hämorrhagischer Schock alleine oder in Kombination mit Melatonin oder Ramelteongabe führte zu einer signifikanten Reduktion des MT-1-Proteins in der Rattenleber. Am deutlichsten war dies bei Schocktieren mit Ramelteontherapie zu erkennen (bis zu 50 %).

In der Leberhistologie imponierte bei scheinoperierten Tieren ohne Medikamentengabe eine relativ dichte Anordnung der MT-1-Rezeptoren um die Zentralvene eines Leberazinus, mit nur vereinzelter MT-1-Rezeptorexpression periportal. Sowohl der hämorrhagische Schock alleine als auch zusammen mit Melatonin- oder Ramelteongabe führte zu einer deutlichen Abnahme der zentrolobulären MT-1-Rezeptordichte.

## 5.2. Plasmamelatonin Spiegel

Es konnte bereits gezeigt werden, dass der hämorrhagische Schock die Konzentrationen zahlreicher Hormone im Blut wie zum Beispiel die von ACTH, Kortikosteroiden und  $\beta$ -Endorphinen erhöht (O'Benar 1987). Des Weiteren wurde der Nachweis im Tiermodell erbracht, dass große Blutverluste zu erhöhten Melatoninspiegeln führen (Wichmann 1996). Jedoch ist nicht nur der hämorrhagische Schock ein möglicher Auslöser für erhöhte Melatoninkonzentrationen. Experimentell wurden außerdem erhöhte Spiegel des epiphysären Hormons bei folgenden Stressmodellen erkannt: im Rahmen des hypoglykämischen Schocks, der Immobilisation (Lynch 1973) und des erzwungenen Schwimmens (Tannenbaum 1989).

Bei männlichen Mäusen wurden, in Übereinstimmung mit dieser Arbeit, erhöhte Melatoninkonzentrationen direkt nach hämorrhagischem Schock gemessen (Wichmann 1996). Dieser Sachverhalt wurde auch in der hier vorliegenden Arbeit deutlich, da der Gipfel der Melatoninkonzentration mit fünf Minuten nach Beginn der Reperfusion ähnlich früh auftrat.

Auch konnte durch Wichmann und Kollegen nach 2 Stunden Reperfusion kein weiterer Anstieg erfasst werden. Vielmehr wurde eine Normalisierung des Spiegels auf Konzentrationen, wie sie bei scheinoperierten Tieren gemessen wurden, beobachtet. Dies findet Übereinstimmung bei der Betrachtung des Kurvenverlaufs des in dieser Arbeit gemessenen Melatoninspiegels. Dieser war nur einmalig erhöht und stieg bis zum Versuchsende nicht weiter an.

Ob nun das im Plasma gemessene Melatonin epiphysären Ursprungs ist oder ob es vielleicht extrapineal, wie zum Beispiel im Gastrointestinaltrakt synthetisiert worden ist, bleibt zu klären.

Nach Melatonintherapie war die gemessene Serumkonzentration über den gesamten Zeitraum der Reperfusion bis zum Ende des Versuchs signifikant erhöht.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das hier verwendete Tiermodell des hämorrhagischen Schocks zuverlässig sowohl einen kurzen endogenen Anstieg der Serummelatoninkonzentration nach hämorrhagischem Schock hervorruft, als auch eine längerfristige Melatoninexposition nach exogener Gabe.

### **5.3. RTq-PCR der MT-1-Rezeptor mRNA**

In allen untersuchten Geweben konnte MT-1-, aber keine MT-2-mRNA nachgewiesen werden. Im Vergleich der Schock- und der scheinoperierten Gruppen mit der als Standard gesetzten scheinoperierten Vehikel-Gruppe konnte keine signifikante Hoch- oder Runterregulation der MT-1-Rezeptor-mRNA beobachtet werden. Stattdessen lässt sich ein Trend erkennen mit zunehmender Expression derselben in den Schockgruppen mit Melatonin- oder Ramelteontherapie.

Darüber hinaus ist einzuräumen, dass die MT-1-mRNA möglicherweise zwischen den einzelnen Gruppen variiert, dies aber in den hier durchgeführten Versuchen mit den zur Verfügung stehenden Mitteln nicht erfasst werden konnte. Als mögliche Gründe wären die extrem kleinen Mengen an MT-1-mRNA zu nennen, sowie eine erhebliche Schwankungsbreite der mRNA-Menge zwischen den Tieren innerhalb der gleichen Gruppe.

Der Nachweis von hepatischer MT-1-mRNA bei der Ratte findet Übereinstimmung mit Arbeiten von Sánchez-Hildago (2009), der im Gegensatz zu dieser Arbeit auch MT-2-mRNA nachweisen konnte. Sallinen (2005) wiederum detektierte nur hepatische MT-2-mRNA, aber keine MT-1-mRNA.

Bestätigung finden die vorliegenden Ergebnisse durch die Forschungsgruppe um Mühlbauer, der am Modell der Maus hepatische mRNA für MT-1 detektierte, aber nicht für MT-2.

### **5.4. Westernimmunoblotanalyse des MT-1-Rezeptorproteins**

Die quantitative Bestimmung des MT-1-Rezeptorproteins machte deutlich, dass eine Agonistenexposition in Form von Melatonin oder Ramelteon die Menge an hepatischem MT-1-Protein bei scheinoperierten Tieren signifikant reduzierte. Interessanterweise führte der hämorrhagische Schock ohne Therapie zu einer ähnlich signifikanten Reduktion des zellulären MT-1-Proteingehaltes.

Da der hämorrhagische Schock zu einem Anstieg der Plasmamelatoninkonzentration führt, könnte der endogen bedingt erhöhte Melatoninspiegel eine MT-1-Rezeptoraktivierung hervorrufen und den konsekutiv verringerten Gehalt an MT-1-Protein möglicherweise durch einen Internalisierungsprozess erklären.

Die ähnliche Reduktion von hepatischem MT-1-Protein in scheinoperierten Gruppen mit exogener Melatoninexposition könnte auf dem gleichen Mechanismus der Rezeptordesensibilisierung beruhen.

Die tendenziell stärkere Abnahme von MT-1-Protein in den Schockgruppen mit Melatonintherapie im Vergleich zu Schockgruppen ohne Therapie lässt sich möglicherweise durch die unterschiedliche Höhe der Serumkonzentration von Melatonin erklären. Bei Melatonintherapie ist die entsprechende Konzentration im Serum um ein Vielfaches höher ist als beim hämorrhagischen Schock ohne entsprechende Therapie.

Einen weiteren Hinweis für die rezeptorabhängige Reduktion von hepatischem MT-1-Protein durch endogene oder exogene Melatoninexposition lieferten die Versuche mit dem selektiven MT-1-Agonisten Ramelteon. Dass Ramelteon ebenfalls in der Lage war die zellulären MT-1-Spiegel zu senken, macht eine Erklärung der beobachteten Ergebnisse durch selektive MT-1-Rezeptoraktivierung wahrscheinlich.

## **5.5. Expressionsmuster der MT-1-Rezeptoren bei Sham/Vehikel-Tieren**

In der Immunhistochemie lässt sich eine deutliche Heterogenität in der Verteilung von MT-1-Rezeptoren bei der histologischen Betrachtung des Leberazinus beschreiben. Bei scheinoperierten Vehikeltieren (siehe Abbildung 8 und 9) zeigte sich, dass vor allem die zentrolobulären Hepatozyten MT-1-Rezeptoren exprimierten, während die Expression in Richtung Periportalfelder deutlich abnahm. Periportal konnten nur solitär bzw. sporadisch Rezeptoren nachgewiesen werden.

Es lassen sich zahlreiche Beispiele in der Literatur zur zonalen Gliederung des Leberläppchens in Bezug auf die Vulnerabilität gegenüber ischämischem Stress finden. In diesen Arbeiten wird beschrieben, dass es vor allem die zentrolobulären Bereiche im Vergleich zu den besser oxygenierten Arealen der Periportalregion sind, in denen es zu Nekrosen bei Minderperfusion unterschiedlichster Genese kommt.

So wurde in einer retrospektiven Patientenstudie von Bynum (1979) zur ischämischen Hepatitis deutlich, dass bei herabgesetzter hepatischer Perfusion mit oder ohne vorangehender Hypotension vorwiegend Nekrosen in zentrolobulären Arealen auftreten.

Auch Cohen und Kaplan (1978) vermuteten einen Zusammenhang zwischen Minderperfusion und dem Auftreten eines zentrolobulären Leberschadens. Sie zeigten, dass bei Patienten mit Linksherzinsuffizienz zentrolobuläre Nekrosen in der Leberbiopsie auftraten. Die Funktion des rechten Herzens als mögliche Ursache einer venösen Stauung wurde als unauffällig beschrieben. Sie postulierten daher, dass die Nekrosen auf dem Boden einer arteriellen Perfusionsminderung im Rahmen einer Linksherzinsuffizienz und nicht auf Grund einer venösen Stauung bei Rechtsherzinsuffizienz entstanden sind.

Eine ähnliche These wurde bereits früher von Nunes (1970) vertreten, der postulierte, dass Hypoxie und Hypovolämie nach Schock und Trauma dieses Nekrosemuster des Leberazinus produzieren.

Diesen drei vorgestellten Arbeiten ist gemeinsam, dass sie die höhere Empfindlichkeit zentrolobulärer Felder im Vergleich zu den periportalen Abschnitten eines Leberläppchens für eine Minderperfusion unterschiedlicher Genese zeigen.

Da nun die MT-1-Rezeptoren, wie in dieser Arbeit gezeigt, vorwiegend in der Nähe einer Zentralvene lokalisiert sind, könnte ihre Aktivierung eine mögliche Erklärung für eine rezeptortriggerter Organprotektion durch Melatonin darstellen. Es würden so vorwiegend die gegen oxidativen Stress empfindlicheren perizentralen Areale geschützt und zentrolobuläre Nekrosen verhindert werden, weil gerade diese Zonen den MT-1-Rezeptor exprimieren.

## **5.6. Expressionsmuster der MT-1-Rezeptoren nach Melatonin- oder Ramelteongabe**

Die bei scheinoperierten Tieren beobachtete, hauptsächlich perizentrale MT-1-Rezeptorexpression veränderte sich bei allen Tiergruppen, die gegenüber Melatonin oder Ramelteon exponiert wurden. Man konnte nun sowohl bei scheinoperierten Gruppen (siehe Abb. 10 und 11) als auch bei Schockgruppen (siehe Abb. 12,13 und 14) ein disseminiertes Muster der MT-1-Rezeptor im Leberazinus feststellen. Es stellte sich ein Bild mit vereinzelt auftretenden Rezeptoren in perizentralen sowie in midzonalen Arealen dar.

Diese Reduktion der azinären MT-1-Rezeptorexpression, wie sie bei allen Schockgruppen auftrat, ist wahrscheinlich nicht durch das Schockgeschehen

verursacht, weil die Schockwirkung auf das Leberläppchen eine typische zonale Gliederung aufweist. Für dieses Phänomen lassen sich in der Literatur zahlreiche Beispiele finden.

Die Veränderungen der verschiedenen Leberzonen zeigte zum Beispiel Kato (2001) experimentell *in vivo*, der bei Ischämie-Reperfusionen die Empfindlichkeit parenchymaler Zellen gegen oxidativen Stress als zonenspezifisch und damit im Leberazinus als heterogen verteilt beschrieb. Er führte dabei den periportalen und midzonalen parenchymalen Zelltod auf einen durch die Xanthinoxidase verursachten oxidativen Stress zurück.

Ebenfalls tierexperimentell wurde von Paxian (2003) beschrieben, dass Schock mit anschließender Reperfusion zur gesteigerten Expression der Glutaminsynthetase 1 perizentral führt. Dieses durch Stress induzierbare Enzym wurde in den radiär um die Zentralvene gelegenen Zonen abgestuft stark exprimiert mit einem Maximum in den ersten perizentralen Hepatozytenschichten, als Zeichen der erhöhten Vulnerabilität dieses Bereiches.

Bereits 2002 gelang Paxian in einem ähnlichen Versuchsaufbau der Nachweis, dass die Aktivierung von redoxsensitiven Transkriptionsfaktoren wie dem Aktivator Protein-1 (AP-1) ein heterogenes zonales Muster ausgehend von den besonders gegen oxidativen Stress empfindlichen zentrolobulären Hepatozyten zeigt.

Neben der Glutaminsynthetase-1 als Beispiel für ein durch oxidativen Stress induzierbares Enzym zeigte Rensing (1999), dass auch die Expression des Stressproteins Hämoxygenase-1 nach Ischämie und Reperfusion diesem zonalen Muster unterliegt. Das Expressionsmaximum in den unmittelbaren perizentralen Schichten könnte so einen möglichen Schutzmechanismus des Organismus für besonders vulnerable Hepatozyten vor zentrolobulären Nekrosen darstellen.

Darauf aufbauende Arbeiten (Rensing 2004) machten deutlich, dass es durch eine  $\beta$ -Rezeptoraktivierung perizentral zu Hämoxygenaseinduktion in perizentralen und midzonalen Arealen kommt.

Daher lässt sich feststellen, dass die beobachteten Veränderungen in der Anordnung der MT-1-Rezeptoren wahrscheinlich nicht durch einen ischämischen Schaden im Rahmen des hämorrhagischen Schocks verursacht worden sind. Dieser hätte, dem zonalen Muster seiner schädigenden Wirkung auf das Leberläppchen gemäß, durch zentrolobuläre Nekrosen die MT-1-Rezeptoren vornehmlich um die Zentralvene vermindert. Dies entspricht aber nicht den hier beschriebenen Ergebnissen eines

disseminierten Musters der Rezeptoren nach Therapie des Schocks mit Melatonin oder Ramelteon. Folglich ist es wahrscheinlicher, dass das hier beschriebene Muster der MT-1-Rezeptoren auf einer putativen Desensibilisierung/Internalisierung als Folge der Exposition gegenüber Melatonin oder Ramelteon beruht, als durch Schock bedingte perizentrale Nekrosen.

Eine mögliche Erklärung für den Widerspruch zwischen auf der einen Seite verringerter MT-1-Rezeptorexpression in der Histologie und vermindertem MT-1-Protein im Westernblot und auf der anderen Seite nicht signifikant veränderter MT-1 mRNA Menge in der RTq-PCR könnte eine posttranskriptionelle Modifikation in Form eines Cappings, Splicings oder einer Polyadenylierung sein.

### **5.7. Verminderung der membranären MT-1-Rezeptordichte nach Agonistenexposition**

Die beobachtete Verminderung der membranären MT-1-Rezeptordichte der Hepatozyten nach Agonistenapplikation in Form von Melatonin oder Ramelteon stimmt mit bereits veröffentlichten Arbeiten zu dem Thema der MT-1-Rezeptordesensibilisierung und Internalisierung nach Melatoninexposition *in vitro* teilweise überein.

Übereinstimmung finden diese Ergebnisse beispielsweise mit Arbeiten von Kokkola (2007), der die Auswirkung einer Melatoninexposition auf chinesische ovarielle Hamsterzellen (CHO-Zellen), die den MT-1-Rezeptor konstitutiv exprimierten, untersuchte. Eine einstündige Inkubation einer solchen Zellkultur mit Melatonin führte zu einer Internalisierung von MT-1-Rezeptoren mit einer zu beobachtenden signifikanten Abnahme der membranären Rezeptordichte. Im Vergleich dazu konnte bei 72-stündiger Inkubation dieser Effekt nicht festgestellt werden. Interessanterweise konnte eine Affinitätsabnahme von MT-1-Rezeptoren für die Bindung von 2-[125J]-Iodomelatonin nur nach 72-stündiger und nicht nach einstündiger Melatoninexposition beobachtet werden.

Ebenfalls mit CHO-Zellen, die entweder den MT-1- oder den MT-2-Rezeptor exprimierten, zeigte Gerdin (2003), dass eine relative kurze Melatoninexposition von zehn Minuten das Verhalten dieser beiden Rezeptortypen unterschiedlich regulierte. Beiden Rezeptorklassen war aber gemeinsam, dass eine Exposition mit dem

epiphysären Hormon die nachfolgende Bindung von 2-[125J]-Iodomelatonin signifikant verminderte. Es konnte eine Desensibilisierung und Internalisierung für den MT-2-Rezeptor gezeigt werden und nicht, wie in dieser Arbeit postuliert, für den MT-1-Rezeptor. Die funktionelle Desensibilisierung wurde vom Autor durch Messung der intrazellulären cAMP-Spiegel dargestellt und die MT-2-Rezeptorinternalisierung über einen  $\beta$ -Arrestin abhängigen Mechanismus erklärt.

In darauf aufbauenden Arbeiten publizierte dieselbe Arbeitsgruppe 2004, dass supraphysiologische Melatoninkonzentrationen die MT-1-Rezeptordichte sogar erhöhen, jedoch zu einer Desensibilisierung des MT-1-Rezeptors auf der Ebene der nachgeschalteten Signalkaskade führen. Erneut konnte keine Internalisierung des MT-1-Rezeptors beobachtet werden. Es wurde daher von Gerdin Schluss gefolgert, dass physiologische Melatoninkonzentrationen die funktionelle Sensitivität von MT-1-Rezeptoren wahrscheinlich nicht beeinflussen. Bei pharmakologischen Konzentrationen, wie sie in dieser Arbeit Verwendung fanden, könnte jedoch eine Desensibilisierung möglicherweise auftreten.

Ein weiteres Beispiel für den Verlust der funktionellen Sensitivität und der Ligandenbindung von MT-1-Rezeptoren nach Melatoninexposition lieferte Jones (2000). Er exponierte Fibroblasten für zwei Wochen mit pharmakologischen Melatonindosen im mikromolaren Bereich und detektierte einen Totalausfall der Ligandenbindung und Rezeptoraktivierung.

Im Gegensatz zu den Publikationen von Gerdin 2003 und 2004, dem der Nachweis der MT-1-Rezeptorinternalisierung nicht gelang, konnte Roy (2001) dies mit Hilfe von GnRH sezernierenden Neuronen zeigen. Die bei supraphysiologischen Melatoninkonzentrationen im nanomolaren Bereich beobachtete MT-1-Rezeptorinternalisierung führt er in Übereinstimmung mit Kokkola (2007) auf einen  $\beta$ -Arrestin-1-abhängigen Mechanismus zurück. Diese Hypothese könnte auch das in dieser Arbeit beobachtete disseminierte Muster der MT-1-Rezeptoren in der Immunhistochemie nach Agonistenexposition erklären.

Die Diskrepanz der Ergebnisse in der Literatur in Bezug auf die MT-1-Rezeptorinternalisierung, die von uns in dieser Arbeit postuliert wird, von Kokkola (2007) und Roy (2001) beobachtet worden ist, aber nicht von Gerdin (2003 und 2004), lässt sich vielleicht durch speziesspezifische Unterschiede in Rezeptoren und Zellkulturen erklären.

Roy benutzte Mäuse-MT-1-Rezeptoren für seine neuronale Zelllinie, in dieser Arbeit wurden Ratten-MT-1-Rezeptoren *in vivo* untersucht, während Gerdin und Kokkola humane rekombinante MT-1-Rezeptoren für CHO-Zellen verwendeten.

Dass eine Rezeptorinternalisierung speziesspezifisch unterschiedlich sein kann, wurde von Li (1999) bereits für Opioidrezeptoren gezeigt. Er beobachtete, dass humane  $\kappa$ -Opiod-Rezeptoren internalisieren, Ratten  $\kappa$ -Opiod-Rezeptoren jedoch nicht. Ähnliche Differenzen könnten also auch bei MT-1-Rezeptoren von Maus, Ratte und Mensch auftreten.

Aber nicht nur die Spezies, aus der der untersuchte Rezeptor stammt, ist eine Einflussgröße, sondern auch die Art des Gewebes, die ihn exprimiert. So wurde für Melatoninrezeptoren bei Ratten gezeigt, dass Melatonininjektionen die Rezeptordichte in der Area postrema und in den SCN (Laitinen 1992) nicht beeinflussen, aber eine Melatoninbehandlung bei Ratten die MT-1-mRNA-Menge in der Pars tuberalis der Hypophyse supprimiert (Guerrero 2000).

Folglich könnten die geweblichen Unterschiede zwischen *in vitro* Kulturen aus ovariellen (Kokkola) und neuronalen Zellen (Roy) und unsere *in vivo* Versuche mit Leberzellen der Ratte eine mögliche Erklärung liefern, warum eine MT-1-Rezeptorinternalisierung nicht in allen Untersuchungen beobachtet wird.

## 5.8. MT-2-Rezeptorprotein

In der immunhistochemischen Färbung gelang der Nachweis von MT-2-Rezeptoren in der Rattenleber nicht. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass momentan noch kein rattenspezifischer MT-2-Antikörper auf dem Markt verfügbar ist. In dieser Arbeit wurde ein Anti-Maus-MT-2-Antikörper verwendet, der eine nachgewiesene hohe Kreuzreaktivität für Ratten MT-2-Rezeptoren besitzt. Es ist daher nicht auszuschließen, dass die Leber der Ratte MT-2-Rezeptoren exprimiert, da eine hepatische MT-2-mRNA-Expression von Sánchez-Hildago (2009) und Sallinen (2005) bereits gezeigt worden ist.

Der fehlende Nachweis der MT-2-Rezeptoren in der histologischen Begutachtung findet allerdings gute Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen der RTq-PCR Analyse, in der wir auch keine MT-2-mRNA detektieren konnten. Dies wiederum

entspricht den Ergebnissen von Mühlbauer und Kollegen, der bei der Maus ebenfalls nur MT-1-, aber keine MT-2-mRNA demonstrieren konnte (Mühlbauer 2009).

### **5.9. Molekulare Erklärung für die MT-1-Rezeptorinternalisierung**

Welche Rezeptoranteile nach Melatoninexposition bei der Rezeptorinternalisierung involviert sind, versuchte Sethi (2008) anhand von mutierten MT-1- und MT-2-Rezeptoren *in vitro* zu klären. Das zytoplasmatische (C-terminale) Ende der beiden Rezeptorsubtypen wurde gekürzt, was zum einen zu einer funktionellen Entkopplung und zum anderen zu einer Unterbindung der Internalisierung führte. Diese Beobachtung könnte seiner Meinung nach auf dem Fehlen einer potentiellen Phosphorylierungs- und  $\beta$ -Arrestinbindungsstelle der Mutanten beruhen. Dieser Mechanismus der Internalisierung von GPCR-Rezeptoren unter Beteiligung des C-terminalen Endes wurde zudem auch schon von anderen Arbeitsgruppen postuliert (Ferguson 2001).

In neueren Untersuchungen konnte Bondi (2008) zeigen, dass eine MT-1-Rezeptorinternalisierung nach Melatoninexposition zu morphologischen Veränderungen bei CHO-Zellen führt. Er macht hierfür eine Umverteilung von membranären MT-1-Rezeptoren in endozytotisch mit Clathrin bedeckte Vesikel verantwortlich. Diese würden dann zusammen mit  $\beta$ -Arrestin als Signalkomplex die zellulären MAP-Kinasen ERK und MEK aktivieren, denen eine zentrale Rolle in der zellulären Differenzierung zugeschrieben wird (Vaudry 2002).

Somit könnte eine MT-1-Rezeptorinternalisierung wie sie von Bondi an CHO-Zellen *in vitro* gezeigt und in dieser Arbeit für Hepatozyten *in vivo* postuliert wird, vielleicht auch die Morphologie und Struktur von hepatischen Zellen beeinflussen ähnlich wie bei CHO-Zellen.

Mit Blick auf diese Arbeit lässt sich feststellen, dass die Verminderung der hepatischen MT-1-Rezeptoren keineswegs nur durch Melatonin alleine, sondern auch durch den selektiven Rezeptoragonisten Ramelteon hervorgerufen wird. Welcher molekulare Mechanismus auf zellulärer Ebene der hepatischen MT-1-Rezeptorregulation nach Agonistenexposition zugrunde liegt, ist noch nicht abschließend geklärt und Gegenstand der momentanen Forschung.

## 5.10. Schlussfolgerung

Zusammenfassend deuten die vorliegenden Ergebnisse auf folgendes hin:

1. In der Leber der männlichen Sprague-Dawley Ratte wird offenbar nur MT-1-mRNA und Protein exprimiert, aber kein MT-2.
2. In dieser Spezies sind MT-1-Rezeptoren in der Leber vorwiegend perizentral lokalisiert, und schützen so möglicherweise die gegen oxidativen Stress besonders vulnerablen perizentralen Hepatozyten.
3. Die Exposition gegenüber den Melatoninrezeptoragonisten Melatonin oder Ramelteon führt zu einer signifikanten Abnahme an MT-1-Rezeptorprotein in der Leber. Parallel dazu lässt sich eine Abnahme der zentrolobulären MT-1-Rezeptordichte in der Histologie beobachten.
4. Da Melatonin oder Ramelteon die MT-1-mRNA in der Leber nicht signifikant verändern, könnte es nach Agonistenexposition der Rezeptoren zu einer Desensibilisierung der Rezeptoren kommen, was die verminderte hepatische Rezeptordichte und die Abnahme an MT-1-Rezeptorprotein in der Leber erklären könnte.

## 6. Kapitel: Literaturverzeichnis

1. Al-Ghoul WM, Herman MD, Dubocovich ML (1998) Melatonin receptor subtype expression in human cerebellum. *Neuroreport* 9(18):4063-4068
2. Aust S, Thalhammer T, Humpeler S, Jäger W, Klimpfinger M, Tucek G, Obrist P, Marktl W, Penner E, Ekmekcioglu C (2004) The melatonin receptor subtype MT1 is expressed in human gallbladder epithelia. *J Pineal Res* 36:43-48
3. Benitez-King GL, Huerto-Delgadillo F, Anton-Tay F (1993) Binding of 3H-melatonin to calmodulin. *Life Sci* 53:201-207
4. Bondi CD, McKeon RM, Bennett JM, Ignatius PF, Brydon L, Jockers R, Melan MA, Witt-Enderby PA (2008) MT1 melatonin receptor internalization underlies melatonin-induced morphologic changes in Chinese hamster ovary cells and these processes are dependent on Gi proteins, MEK 1/2 and microtubule modulation. *J Pineal Res* 44:288-298
5. Boutin JA (1997) Myristoylation. *Cell Signal* 9:15-35
6. Boutin JA, Audinot V, Ferry G, Delagrangre P (2005) Molecular tools to study melatonin pathways and actions. *Trends Pharmacol Sci* 26:412-419
7. Brunner P, Sozer-Topcular N, Jockers R, Ravid R, Angeloni D, Fraschini F, Eckert A, Muller-Spahn F, Savaskan E (2006) Pineal and cortical melatonin receptors MT1 and MT2 are decreased in Alzheimer's disease. *Euro J Histochem* 50:311-316
8. Brzozowski T, Konturek PC, Zwirska-Korczala K, Konturek SJ, Brzozowska I, Drozdowicz D, Sliwowski Z, Pawlik M, Pawlik WW, Hahn EG (2005) Importance of the pineal gland, endogenous prostaglandins and sensory

- nerves in the gastroprotective actions of central and peripheral melatonin against stress-induced damage. *J Pineal Res* 39:375-385
9. Bubenik GA (2002) Gastrointestinal melatonin: localisation, function, and clinical relevance. *Dig Dis Sci* 47:2336-2348
  10. Bubis M, Zisapel N (1999) Involvement of cGMP in cellular melatonin responses. *Biol Cell* 91:45-49
  11. Buijs RM, Hermes MH, Kalsbeek A (1998) The suprachiasmatic nucleus-paraventricular nucleus interactions: a bridge to the neuroendocrine and automatic nervous system. *Pro Brain Res* 119:365-382
  12. Bynum TE, Boitnott JK, Maddrey WC (1979) Ischemic hepatitis. *Dig Dis Sci* 24(2):129-135
  13. Cajochen C (2005) TAK-375 Takeda. *Curr Opin Investg Drugs* 6:114-121
  14. Cardinali DP, Pevet P (1998) Basic aspects of melatonin action. *Sleep Med Rev* 2:175-190
  15. Carrillo-Vico A, Calvo JR, Alreu P, Lardone PJ, García-Maurino S, Reiter RJ, Guerrero JM (2004) Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and its physiological significance: possible role as intracrine, autocrine and/or paracrine substance. *FASEB J* 18:537-539
  16. Carrillo-Vico A, Reiter RJ, Lardone PJ, Herrera JL, Fernandez-Montesinos R, Guerrero JM, Pozo D (2006) The modulatory role of melatonin on immune responsiveness. *Curr Opin Investig Drugs* 7:423-431
  17. Carrillo-Vico A, Reiter RJ, Lardone PJ, Herrera JL, Fernández-Montesinos R, Guerrero JM, Pozo D (2006) The modulatory role of melatonin on immune responsiveness. *Curr Opin Investing Drugs* 7:423-31

18. Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162(1):156-9
19. Claustrat B, Brun J, Chazot G (2005) The basic physiology and pathophysiology of melatonin. *Sleep Med Rev* 9:11-24
20. Clemens JW, Jarzynka MJ, Witt-Enderby PA (2001) Down-regulation of mt1 melatonin receptors in rat ovary following estrogen exposure. *Life Sci* 69:27-35
21. Cohen JA, Kaplan MM (1978) Left-sided heart failure presenting as hepatitis. *Gastroenterology* 74:583-587
22. Conti A, Conconi S, Hertens E, Skwarlo-Sonta K, Markowska M, Maestroni JM (2000) Evidence of melatonin synthesis in mouse and human bone marrow cells. *J Pineal Res* 28:193-202
23. Dubocovich ML, Markowska M (2005) Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. *Endocrine* 27(2):101-10
24. Duncan MJ, Takahashi JS, Dubocovich ML (1988) 2-[125I]iodomelatonin binding sites in hamster brain membranes: pharmacological characteristics and regional distribution. *Endocrinology* 122:1825-1833
25. Eison AS, Mullins UL (1993) Melatonin binding sites are functionally coupled to phosphoinositide hydrolysis in Syrian hamster RPMI 1846 melanoma cells. *Life Sci* 53:393-398.
26. Ekmekcioglu C, Haslmayer P, Philipp C, Mehrabi MR, Glogar HD, Grimm M, Leibetseder VJ, Thalhammer T, Marktl W (2001) Expression of the MT1 melatonin receptor subtype in human coronary arteries. *J Recept Signal Transduct Res* 21:85-91

27. Ferguson SS (2001) Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev* 53:1-24
28. Frungieri MB, Mayerhofer A, Zitta K, Pignataro OP, Calandra RS, Gonzalez-Calvar SI (2005) Direct effect of melatonin on Syrian hamster testes: melatonin subtype 1a receptors, inhibition of androgen production, and interaction with the local corticotropin-releasing hormone system. *Endocrinology* 146:1541-1552
29. Gastel JA, Roseboom PH, Rinaldi PA, Weiler JL, Klein DC (1998) Melatonin production. Proteasomal proteolysis in serotonin N-acetyltransferase regulation. *Science* 279:1358-1360
30. Gauer F, Masson-Pévet M, Pévet P (1992) Pinealectomy and constant illumination increase the density of melatonin binding sites in the pars tuberalis of rodents. *Brain Res* 575:32-38
31. Gauer F, Masson-Pévet M, Pévet P (1993) Melatonin receptor density is regulated in rat pars tuberalis and suprachiasmatic nuclei by melatonin itself. *Brain Res* 602(1):153-6
32. Genade S, Genis A, Ytrehus K, Huisamen B, Lochner A (2008) Melatonin receptor-mediated protection against myocardial ischaemia/reperfusion injury: role of its anti-adrenergic actions. *J Pineal Res.* 45(4):449-58
33. Gerdin MJ, Masana MI, Ren D, Miller RJ, Dubocovich ML (2003) Short-term exposure to melatonin differentially affects the functional sensitivity and trafficking of the hMT1 and hMT2 melatonin receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 304:931-939

34. Gerdin MJ, Masana MI, Dubocovich ML (2004) Melatonin-mediated regulation of human MT(1) melatonin receptors expressed in mammalian cells. *Biochem Pharmacol* 67:2023-2030
35. Gilad E, Matzkin H, Zisapel N (1997) Inactivation of melatonin receptors by protein kinase C in human prostate epithelial cells. *Endocrinology* 138:4255-4261
36. Gilad E, Wong HR, Zingarelli B, Virág L, O'Connor M, Salzman AL, Szabó C (1998) Melatonin inhibits expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase in murine macrophages: role of NfκB activation. *FASEB J* 12(9):685-93
37. Godson C, Reppert SM (1997) The Mel1a melatonin receptor is coupled to parallel signal transduction pathway. *Endocrinology* 138:397-404
38. Goldman BD (2001) Mammalian photoperiodic system: formal properties and neuroendocrine mechanisms of photoperiodic time measurement. *J of Biol Rhythms* 16:283-301
39. Grossman E, Laudon M, Yalcin R, Zengil H, Peleg E, Sharabi Y, Kamari Y, Shen-Orr Z, Zisapel N (2006) Melatonin reduces night blood pressure in patients with nocturnal hypertension. *Am J M* 119:898-902
40. Guerrero JM, Pablos MI, Ortiz GG, Agapito MT, Reiter RJ (1996) Nocturnal decreases in nitric oxide and cyclic GMP contents in the chick brain and their prevention by light. *Neurochem Int* 29:417-421
41. Guerrero HY, Gauer F, Schuster C, Pévet P, Masson-Pévet M (2000) Melatonin regulates the mRNA expression of the mt(1) melatonin receptor in the rat Pars tuberalis. *Neuroendocrinology* 71(3):163-169

42. Guha M, Marity P, Choubey V, Mitra K, Reiter RJ, Bandyopadhyay U (2007) Melatonin inhibits free radical-mediated mitochondrial dependent hepatocyte apoptosis and liver damage induced during malarial infection. *J Pineal Res* 43:372-381
43. Hardeland R (2005) Antioxidative protection by melatonin: multiplicity of mechanisms from radical detoxification to radical avoidance. *Endocrine* 27:119-130
44. Hastings MH, Herbert J, Martensz ND, Roberts AC (1985) Annual reproductive rhythms in mammals of light synchronization. *Ann N Y Acad Sci* 453:182-204
45. Ho AK, Klein DC (1987) Activation of alpha 1-adrenoreceptors, protein kinase C, or treatment with intracellular free Ca<sup>2+</sup> elevating agents increases pineal phospholipase A2 activity. Evidence that protein kinase C may participate in Ca<sup>2+</sup> dependent alpha 1-adrenergic stimulation of pineal phospholipase A2 activity. *J Biol Chem* 262:11764-11770
46. Huan C, Zhou M, Wu M, Zhang Z, Mei Y (2001) Activation of melatonin receptor increases a delayed rectifier K<sup>+</sup> current in rat cerebellar granule cells. *Brain Res* 917:182-190
47. Husson I, Mesplès B, Bac P, Vamecq J, Evrard P, Gressens P (2002) Melatonergic neuroprotection of the murine periventricular white matter against neonatal excitotoxic challenge. *Ann Neurol* 51:82-92
48. Jones MP, Melan MA, Witt-Enderby PA (2000) Melatonin decreases cell proliferation and transformation in a melatonin receptor-dependent manner. *Cancer Lett* 151(2):133-43
49. Karasek M (2004) Melatonin, human aging, and age-related diseases. *Exp Gerontol* 39:1723-1729

50. Kato K, Hirai K, Nishiyama K, Uchikawa O, Fukatsu K, Ohkawa S, Kawamata Y, Hinuma S, Miyamoto M (2005) Neurochemical properties of ramelteon (TAK-375), a selective MT1/MT2 receptor agonist. *Neuropharmacology* 48:301-310
51. Kato Y, Tanaka J, Koyama K (2001) Intralobular heterogeneity of oxidative stress and cell death in ischemia-reperfused rat liver. *J Surg Res* 95(2):99-106
52. Klein DC, Moore RY (1979) Pineal N-acetyltransferase and hydroxyindole-O-methyltransferase: control by the retinohypothalamic tract and the suprachiasmatic nucleus. *Brain Res* 174:245-262
53. Kofuji P, Davidson N, Lester HA (1995) Evidence that neuronal G-protein-gated inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels are activated by G beta gamma subunits and function as heteromultimers. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:6542-6546
54. Kokkola T, Vaitinen M, Laitinen JT (2007) Inverse agonist exposure enhances ligand binding and G protein activation of the human MT1 melatonin receptor, but leads to receptor down-regulation. *J Pineal Res* 43:255-262
55. Krause DN, Dubocovich ML (1990) Regulatory sites in the melatonin system of mammals. *Trends Neurosci* 13:464-470
56. Laitinen JT, Viswanathan M, Vakkuri O, Saavedra JM (1992) Differential regulation of the rat melatonin receptors: selective age-associated decline and lack of melatonin-induced changes. *Endocrinology* 130(4):2139-44
57. Laudon M, Nir I, Zisapel N (1988) Melatonin receptors in discrete brain areas of the male rat. Impact of aging on density and on circadian rhythmicity. *Neuroendocrinology* 48:577-583

58. Lew MJ, Flanders S (1999) Mechanisms of melatonin-induced vasoconstriction in the rat tail artery: a paradigm of weak vasoconstriction. *Br J Pharmacol* 126:1408-1418
59. Li JG, Luo LY, Krupnick JG, Benovic JL, Liu-Chen LY (1999) U50,488H-induced internalization of the human kappa opioid receptor involves a beta-arrestin- and dynamin-dependent mechanism. Kappa receptor internalization is not required for mitogen-activated protein kinase activation. *J Biol Chem* 274(17):12087-94
60. Lincoln GA (2006) Melatonin entrainment of circannual rhythms. *Chronobiol Int* 23:301-306
61. 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
62. Liu F, Ng TB (2000) Effect of pineal indoles on activities of the antioxidant defense enzymes superoxid dismutase, catalase, and glutathione reductase, and levels of reduced and oxidized glutathione in rat tissues. *Biochem Cell Biol* 78(4):447-53
63. Lochner A, Genade S, Davids A, Ytrehus K, Moolman JA (2006) Short- and long-term effects of melatonin on myocardial post-ischemic recovery. *J Pineal Res* 40:56-63
64. Lopez-Gonzalez MA, Calvo JR, Osuno C, Rubio A, Guerrero JM (1992) Synergistic action of melatonin and vasoactive intestinal peptide in stimulating cyclic AMP production in human lymphocytes. *J Pineal Res* 12:174-180

65. Lotufo CM, Lopes C, Dubocovich ML, Farsky SH, Markus RP (2001) Melatonin and N-acetylserotonin inhibit leukocyte rolling and adhesion to rat microcirculation. *Eur J Pharmacol* 430(2-3):351-357
66. 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(6):1704-7
67. Mailliet F, Ferry G, Vella F, Berger S, Coge F, Chomarat P (2005) Characterization of the melatonergic MT3 binding site on the NRH: quinone oxidoreductase 2 enzyme. *Biochem Pharmacol* 71:74-88
68. Martinuzzo M, Del Zar MM, Cardinali DP, Carreras LO, Vacas MI (1991) Melatonin effect on arachidonic acid metabolism to cyclooxygenase derivatives in human platelets. *J Pineal Res* 11:111-115
69. Mathes A, Kubulus D, Pradarutti S, Bentley A, Weiler J, Wolf B, Ziegeler S, Bauer I, Rensing H (2008) Melatonin pretreatment improves liver function and hepatic perfusion after hemorrhagic shock. *Melatonin pretreatment improves liver function and hepatic perfusion after hemorrhagic shock. Shock* 29(1):112-8.
70. Mathes A, Kubulus D, Waibel L, Weiler J, Heymann P, Wolf B, Rensing H (2008) Selective activation of melatonin receptors with ramelteon improves liver function and hepatic perfusion after hemorrhagic shock in rat. *Crit Care Med* 36(10):2863-70
71. Mayo JC, Sainz RM, Tan DX, Hardeland R, Leon J, Rodriguez C, Reiter RJ (2005) Anti-inflammatory actions of melatonin and its metabolites, N-acetyl-N-formyl-5-methoxykynuramine (AFMK) and N-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK), in macrophages. *J Neuroimmunol* 165:139-149

72. 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
73. McGechan A, Wellington K (2005) Ramelteon. *CNS Drugs* 19(12):1057-65
74. McNulty S, Ross AW, Barrett P, Hastings MH, Morgan PJ (1994) Melatonin regulates the phosphorylation of CREB in ovine pars tuberalis. *J Neuroendocrinol* 6:523-32
75. Mei YA, Lee PP, Wei H, Zhang ZH, Pang SF (1999) Melatonin and its analogs potentiate the nifedipine-sensitive high-voltage-activated calcium current in the chick embryonic heart cells. *J Pineal Res* 30:13-21
76. Mekki AR, Esmail E, Hussein AA, Hassanein HM (2004) Caspase-3 and heat shock protein-70 in rat liver treated with aflatoxin B1: effect of melatonin. *Toxicol* 43:93-100
77. Molpeceres V, Mauriz JL, García-Mediavilla MV, González P, Barrio JP, González-Gallego J (2007) Melatonin is able to reduce the apoptotic liver changes induced by aging via inhibition of the intrinsic pathway of apoptosis. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 62:687-695
78. Mühlbauer E, Gross E, Labucay K, Wolgast S, Peschke E (2009) Loss of melatonin signalling and its impact on circadian rhythms in mouse organs regulating blood glucose. *Eur J Pharmacol* 606(1-3):61-71
79. Murawska-Cialowicz E, Jethon Z, Magdalan J, Januszewska L, Podhorska-Okolów M, Zawadzki M, Sozanski T, Dziegiel P (2009) Effects of melatonin on lipid peroxidation and antioxidative enzyme activities in the liver, kidneys and brain of rats administered with benzo(a)pyrene. *Exp Toxicol Pathol* [epub ahead of print]

80. Naji L, Carrillo-Vico A, Guerrero JM, Calvo JR (2004) Expression of membrane and nuclear melatonin receptors in mouse peripheral organs. *Life Sci* 74:2227-2236
81. Nelson CS, Marino JL, Allen CN (1996) Melatonin receptors activate heteromeric G-protein coupled Kir3 channels. *Neuroreport* 7:717-720
82. New DC, Tsim ST, Wong YH (2003) G Protein-linked effector and second messenger systems involved in melatonin signal transduction. *Neurosign* 12:59-70
83. Nosejean O, Ferro M, Cogé F, Beauverger P, Henlin JM, Lefoulon F (2000) Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinon reductase 2. *J Biol Chem* 275:31311-31317
84. Nosjean O, Nicolas JP, Klupsch F, Delagrance P, Canet E, Boutin JA. (2001) Comparative pharmacological studies of melatonin receptors: MT1, MT2 and MT3/QR2. Tissue distribution of MT3/QR2. *Biochem Pharmacol.* 61(11):1369-79
85. Nunes G, Blaisdell FW, Margaretten W (1970) Mechanism of hepatic dysfunction following shock and trauma. *Arch Surg* 100:546-566
86. Okatani Y, Wakatsuki A, Reiter RJ, Miyahara Y (2002) Hepatic mitochondrial dysfunction in senescence-accelerated mice: correction by long-term, orally administered physiological levels of melatonin. *J Pineal Res* 33(3):127-33
87. O'Benar JD, Hannon JP, Peterson JL, Bossone CA (1987) Beta-endorphin, ACTH, and cortisol response to hemorrhage in conscious pigs. *Am J Physiol.* 252(5 Pt 2):R953-8

88. Olcese J, Majora C, Stephan A, Muller D (2002) Nocturnal accumulation of cyclic 3',5'-guanosine monophosphate (cGMP) in the chick pineal organ is dependent on activation of guanylyl cyclase-B. *J Neuroendocrinol* 14:14-18
89. Pan M, Song YL, Xu JM, Gan HZ (2006) Melatonin ameliorates nonalcoholic fatty liver induced by high-fat diet in rats. *J Pineal Res* 41:79-84
90. Pandi-Perumal SR, Srinivasan V, Spence DW, Moscovitch A, Hardeland R, Brown GM, Cardinali DP (2009) Ramelteon: a review of its therapeutic potential in sleep disorders. *Adv Ther* 26(6):613-26
91. Paredes SD, Marchera AM, Bejarano I, Espino J, Barriga C, Rial RV, Reiter RJ, Rodríguez AB (2009) Melatonin and tryptophan affect the activity-rest rhythm, core and peripheral temperatures, and interleukin levels in the ringdove: changes with age. *J Gerontol Series A Biol Med Sciences* 64:340-350
92. Paxian M, Bauer I, Kaplan D, Bauer M, Rensing H (2002) Hepatic redox regulation of transcription factors activator protein-1 and nuclear factor-kappaB after hemorrhagic shock in vivo. *Antioxid Redox Signal* 4(5):711-720
93. Paxian M, Rensing H, Geckeis K, Bauer I, Kubulus D, Spahn DR, Bauer M. (2003) Perflubron emulsion in prolonged hemorrhagic shock: influence on hepatocellular energy metabolism and oxygen-dependent gene expression. *Anesthesiology* 98(6):1391-1399
94. Pevet P (1998) Melatonin and biological rhythms. *Thérapie* 53:411-420
95. Pintor J, Pelaez T, Hoyle CH, Peral A (2003) Ocular hypotensive effects of melatonin receptor agonists in the rabbit: further evidence for an MT3 receptor. *Br J Pharmacol* 138:831-836

96. Poirel VJ, Cailotto C, Streicher D, Pevet P, Masson-Pevet M, Gauer F(2003) MT-1 melatonin receptor mRNA tissular localisation by PCR amplification. *Neuroendocrinology Letters* 24 (1/2), 33-38
97. Poon AM, Choy EH, Pang SF (2001) Modulation of blood glucose by melatonin: a direct action on melatonin receptors in mouse hepatocytes. *Biol Signals Recept* 10:367-379
98. Pozo D, Reiter RJ, Calvo JR, Guerrero JM (1994) Physiological concentrations of melatonin inhibit nitric oxide synthase in rat cerebellum. *Life Sci* 55(24):455-60
99. Pozo D, García-Mauriño S, Guerrero JM, Calvo JR (2004) mRNA expression of nuclear receptor RZR/RORalpha, melatonin membrane receptor MT, and hydroxindole-O-methyltransferase in different populations of human immune cells. *J Pineal Res* 37:48-54
100. Ram PT, Dai J, Yuan L, Dong C, Kiefer TL, Lai L, Hill SM (2002) Melatonin inhibits estrogen receptor transactivation and cAMP levels in breast cancer cells. *Cancer Lett* 179:141-150
101. Reiter RJ (1980) The pineal and its hormones in the control of reproduction in mammals. *Endocr Rev* 1:109-131
102. Rensing H, Bauer I, Datene V, Patau C, Pannen BH, Bauer M (1999) Differential expression pattern of heme oxygenase-1/heat shock protein 32 and nitric oxide synthase-II and their impact on liver injury in a rat model of hemorrhage and resuscitation. *Crit Care Med* 27:2766-75
103. Rensing H, Bauer I, Kubulus D, Wolf B, Winning J, Ziegeler S, Bauer M (2004) Heme oxygenase-1 gene expression in pericentral hepatocytes through beta1-adrenoceptor stimulation. *Shock* 21(4):376-87

104. Rezzani R, Rodella LF, Bonomini F, Tengattini S, Bianchi R, Reiter RJ (2006) Beneficial effects of melatonin in protecting against cyclosporine A-induced cardiotoxicity are receptor mediated. *J Pineal Res* 41:288-295
105. Ross AW, Barrett P, Mercer JG, Morgan PJ (1996) Melatonin suppresses the induction of AP-1 transcription factor components in the pars tuberalis of the pituitary. *Mol Cell Endocrinol* 123:71-80
106. Roy D, Angelini NL, Fujieda H, Brown GM, Belsham DD (2001) Cyclical regulation of GnRH gene expression in GT1-7 GnRH-secreting neurons by melatonin. *Endocrinology* 142(11):4711-20
107. Sallinen P, Saarela S, Ilves M, Vakkuri O, Leppaluoto J (2005) The expression of MT1 and MT2 melatonin receptor mRNA in several rat tissues. *Life Sci* 76:1123-1134
108. Salti R, Galluzzi F, Bindi G, Perfetto F, Tarquini R, Halberg F, Cornelissen G (2000) Nocturnal melatonin patterns in children. *J Clin Endocrinol Metab* 85:2137-2144
109. Sánchez-Hildago M, Montávez JMG, del Pilar Carrascosa-Salmoral M, del Carmen Naranjo Gutierrez M, de la Lastra Romero PJI und CA (2009) Decreased MT-1 and MT-2 melatonin receptor expression in extrapineal tissues of the rat during physiological aging. *J. Pineal Res.* 46:29-35
110. Savaskan E, Olivieri G, Meier F, Brydon L, Jockers R, Ravid R, Wirz-Justice A, Müller-Spahn F (2002) Increased melatonin 1a-receptor immunoreactivity in the hippocampus of Alzheimer's disease patients. *J Pineal Res* 32(1):59-62
111. Schneider T, Igelmund P, Hescheler J (1997) G protein interaction with K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> channels. *Trends Pharmacol Sci* 18:8-11

112. Schomerus C, Korf HW (2005) Mechanisms regulating melatonin synthesis in the mammalian pineal organ. *Ann N Y Acad Sci* 1057:372-383
113. Schreibmayer W, Dessauer CW, Vorobiov D, Gilman AG, Lester HA, Davidson N, Dascal N (1996) Inhibition of an inwardly rectifying K<sup>+</sup>channel by G-protein  $\alpha$ -subunits. *Nature* 380:624-627
114. Schuster C, Gauer F, Malan A, Recio J, Pevet P, Masson-Pevet M (2001) The circadian clock, light/dark cycle and melatonin are differentially involved in the expression of daily and photoperiodic variations in mt(1) melatonin receptors in the Siberian and Syrian hamsters. *Neuroendocrinology* 74:55-68
115. Sethi S, Adams W, Pollock J, Witt-Enderby PA (2008) C-terminal domains within human MT1 and MT2 melatonin receptors are involved in internalization processes. *J Pineal Res* 45(2):212-218
116. Shibata S, Cassone VM, Moore RY (1989) Effects of melatonin on neuronal activity in the rat suprachiasmatic nucleus in vitro. *Neurosci Lett* 97:140-144
117. Slominski A, Pisarchik A, Zbytek B, Tobin DJ, Kauser S, Wortsman J (2003) Functional activity of serotonergic and melatonergic systems expressed in the skin. *J Cell Physiol* 196:144-153
118. Shochat T, Luboshitzky R, Lavie P (1997) Nocturnal melatonin onset is phase locked to the primary sleep gate. *Am J Physiol* 273:364-370
119. Spessert R, Layes E, Vollrath L (1993) Adrenergic stimulation of cyclic GMP formation requires NO-dependent activation of cytosolic guanylate cyclase in rat pinealocytes. *J Neurochem* 61:138-143

120. Srinivasan W, Spence DW, Pandi-Perumal SK, Trakht I, Cardinali DP (2008) Jet lag: therapeutic use of melatonin and possible application of melatonin analogs. *Travel Med Infect Dis* 6:17-28
121. Steinhilber D, Brunge M, Werz O, Wiesenberg I, Danielsson C, Kahlen JP, Nayer S, Schrader M, Carlberg C (1995) The nuclear receptor for melatonin represses 5-lipoxygenase gene expression in human B lymphocytes. *J Biol Chem* 270:7037-7040
122. Tan DX, Manchester LC, Burkhardt S, Sainz RM, Mayo JC, Kohen R, Shohami E, Huo YS, Hardeland R, Reiter RJ (2001) N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine, a biogenic amine and melatonin metabolite, functions as a potent antioxidant. *FASEB J* 15(12):2294-6
123. Tan DX, Reiter RJ, Manchester LC, Yan MT, El-Sawi M, Sainz RM, Mayo JC, Kohen R, Allegra M, Hardeland R (2002) Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger. *Curr Top Med Chem* 2:181-197
124. Tan DX, Manchester LC, Terron MP, Flores LJ, Reiter RJ (2007) One molecule, many derivatives: A never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? *J Pineal Res* 42:28-42
125. Tannenbaum MG, Reiter RJ, Hurlbut EC, Vaughan MK, Gonzalez-Brito A, Troiani ME. (1989) Pineal sensitivity to nighttime swimming stress changes during the active season in Richardson's ground squirrels (*Spermophilus richardsonii*) *J Exp Zool* 250(3):298-303
126. Taussig R, Zimmerman G (1998) Type-specific regulation of mammalian adenylyl cyclases by G protein pathways. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 32:81-98

127. Taussig R, Gilman AG (1995) Mammalian membrane-bound adenylate cyclases. *J Biol Chem* 270:1-4
128. Tesoriere L, Avellone G, Ceraulo L, D'Arpa D, Allegra M, Livrea MA (2001) Oxidation of melatonin by oxoferryl hemoglobin: a mechanistic study. *Free Radic Res* 35:633-642
129. Tijmes M, Pedraza R, Valladras L (1996) Melatonin in the rat testis: evidence of local synthesis. *Steroids* 61:65-68
130. Tosini G, Menaker M (1998) The clock in the mouse retina: melatonin synthesis and photoreceptor degeneration. *Brain Res* 789:221-228
131. Tsu RC, Wong YH (1996) Gi-mediated stimulation of type II adenylyl cyclase is augmented by Gq-coupled receptor activation and phorbol ester treatment. *J Neurosci* 16:1317-1323
132. Uz T, Arslan AD, Kurtuncu M, Imbesi M, Akhisaroglu M, Dwivedi Y, Pandey GN, Manev H (2005) The regional and cellular expression profile of the melatonin receptor MT1 in the central dopaminergic system. *Brain Res MOL Brain Res* 136:45-53
133. Vacas MI, Lowenstein P, Cardinali DP (1980) Dihydroergocryptine binding sites in bovine and rat pineal glands. *J Auton Nerv Syst* 2:305-313
134. Vacas MI, Berria MI, Cardinali DP, Lascano EF (1984) Melatonin inhibits  $\beta$ -adrenoreceptor-stimulated cyclic AMP accumulation in rat astroglial cell cultures. *Neuroendocrinol* 38:176-181
135. Vaudry D, Stork PJ, Lazarovici P, Eiden LE (2002) Signaling pathways for PC12 cell differentiation: making the right connections. *Science* 296:1648-1649

136. Vesely DL (1981) Melatonin enhances guanylate cyclase activity in a variety of tissues. *Mol Cell Biochem* 35:55-58
137. von Gall C, Garabette ML, Kell CA, Frenzel S, Dehghani F, Schumm-Draeger PM, Weaver DR, Korf HW, Hastings MH, Stehle JH (2002) Rhythmic gene expression in pituitary depends on heterologous sensitization by the neurohormone melatonin. *Nat Neurosci* 5:234-238
138. Wakatsuki A, Okatani Y, Shinohara K, Ikenoue N, Kaneda C, Fukaya T (2001) Melatonin protects fetal brain against oxidative mitochondrial damage. *J Pineal Res* 30(1):22-8
139. Whichmann MW, Zellweger R, DeMaso CM, Ayala A, Chaudry IH (1996) Increased melatonin levels after hemorrhagic shock in male and female C3H/HeN mice. *Experientia* 52:587-590
140. Wiggers HC, Ingraham RC (1946) Hemorrhagic shock: definition and criteria for its diagnosis. *J Clin Invest* 25(1):30-6
141. Yalcin A, Kilinc E, Kocturk S, Resmi H, Sozem EY (2004) Effect of melatonin cotreatment against kainic acid on coenzyme Q10, lipid peroxidation and Trx mRNA in rat hippocampus. *Int J Neurosci* 114(9):1085-97
142. Yung LY, Tsim ST, Wong YH (1995) Stimulation of cAMP accumulation by the cloned *Xenopus* melatonin receptor through Gi and Gz proteins. *FEBS Lett* 372:99-102
143. Zammit G, Ermann M, Wag-Weigand S, Sainati S, Zhang J, Roth T (2007) Evaluation of the efficacy and safety of ramelteon in subjects with chronic insomnia. *J Clin Sleep Med* 3:495-504

144. Zhang H, Akbar M, Kim HY (1999) Melatonin: an endogenous negative modulator of 12-lipoxygenation in the rat pineal gland. *Biochem J* 344 Pt 2:487-93
  
145. Zisapel N, Shaharabani M, Laudon M (1987) Regulation of melatonin's activity in the female rat brain by estradiol: effects on neurotransmitter release and on iodomelatonin binding sites. *Neuroendocrinology* 46:207-216

## 7. Kapitel: Danksagung

Herrn Univ. Prof. Dr. Larsen danke ich für die Ermöglichung der Durchführung dieser Arbeit in seiner Abteilung für Anästhesiologie und Intensivmedizin des Universitäts-Klinikum des Saarlandes, Homburg.

Herrn Univ. Prof. Dr. H. Rensing (ehemals Abteilung für Anästhesie und Intensivmedizin der Universitätskliniken des Saarlandes, derzeit akademisches Lehrkrankenhaus Schweinfurt) danke ich für die Idee des interessanten Themas und die lehrreichen Diskussionen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. Alexander Mathes für seine Betreuung und Unterstützung dieser Arbeit, für die Durchführung der Versuche im Tierlabor und für die Analyse der Daten, sowie für die Einarbeitung und Assistenz im Labor und nicht zuletzt für Anregungen zum Schreiben und für die intensiven Korrekturarbeiten.

Bei Herrn Reus und bei Herrn Fink möchte ich mich für die gemeinsame Zeit im Labor und für die Möglichkeit weiter an wissenschaftlichen Projekten mitgewirkt haben zu können bedanken.

Frau Beate Wolf danke ich für die exzellente Anleitung und tatkräftige Unterstützung bei laborchemischen Analysen.

## Publikationen:

### Originalarbeiten:

- Mathes A, Kubulus D, Waibel L, Weiler J, **Heymann P**, Wolf B, Rensing H (2008) Selective activation of melatonin receptors with ramelteon improves liver function and hepatic perfusion after hemorrhagic shock in rat. *Critical Care Medicine* 36: 2863-2870 (IF 2008: 6,59; Zitate: 3)

### Abstracts:

- Fink T, **Heymann P**, Taha-Mehlitz S, Rensing H, Mathes A (2010) Die Präkonditionierung mit Dobutamin verbessert die hepatische Mikrozirkulation nach Sepsis bei der Ratte. Abstract-CD, Deutscher Anästhesiekongress 2010 (PO-3.7.8)
- Fink T, **Heymann P**, Mehlitz S, Rensing H, Mathes A (2010) Dobutamine pretreatment improves hepatic microcirculation after polymicrobial sepsis in rat. *European Journal of Anaesthesiology* 27, Supplement 47: 171-172 (12AP2-3)
- Reus E, **Heymann P**, Schneider S, Rensing H, Mathes A (2008) Die selektive Aktivierung von Melatoninrezeptoren mit Ramelteon verlängert die Überlebenszeit nach polymikrobieller Sepsis bei der Ratte. *Intensivmedizin und Notfallmedizin* 45, Supplement 1: 55 (P/06/04)
- Mathes A, Kubulus D, Waibel L, **Heymann P**, Rensing H (2008) Die selektive Aktivierung von Melatoninrezeptoren mit Ramelteon verbessert die Leberfunktion und die Leberperfusion nach hämorrhagischem Schock bei der Ratte. *Anästhesiologie & Intensivmedizin* 49: 390-391