

Aus der Klinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie  
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg / Saar  
(Direktor: Prof. Dr. med. Thomas Volk)

**Melatonin verringert dosisabhängig die Letalität nach polymikrobieller Sepsis  
bei der Ratte**

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin*

*der Medizinischen Fakultät*

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2013

vorgelegt von: Daniel Kiefer

geb. am: 29. April 1987 in Ottweiler

Meiner Familie  
gewidmet

## Inhaltsverzeichnis

I.	Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen .....	6
II.	Verzeichnis der Abkürzungen .....	7
1.	Zusammenfassung / Abstract .....	13
1.1	Zusammenfassung .....	13
1.2	Abstract .....	15
2.	Einleitung .....	17
2.1	Sepsis und septischer Schock .....	17
2.1.1	Grundlagen .....	17
2.1.2	Pathophysiologie der Sepsis .....	18
2.1.3	Der septische Schock bei Peritonitis .....	19
2.1.4	Sepsistherapie heute .....	20
2.2	Melatonin .....	23
2.2.1	Physiologische und pharmakologische Eigenschaften .....	23
2.2.2	Melatonin in der Sepsisforschung .....	25
2.2.3	Problem der Melatoninindosierung / Dosisfindung .....	27
2.2.4	Protektive Mechanismen und Signalwege von Melatonin .....	28
2.2.4.1	Rezeptorabhängige Signalwege .....	29
2.2.4.2	Rezeptorunabhängige Signalwege .....	29
2.2.4.3	Signaleffekte der antioxidativen Melatoninwirkung .....	30
2.2.4.4	Kandidatengene .....	32
2.2.4.5	ATF3 .....	32
2.2.4.6	Ppp1r15a / GADD34 .....	34
2.3	Ziele der Arbeit .....	36
3.	Material und Methoden .....	37
3.1	Tierexperimenteller Teil .....	37
3.1.1	Versuchstiere .....	37
3.1.2	Narkoseeinleitung und intraoperative Lagerung der Tiere .....	37
3.1.3	Chirurgische Präparation .....	38
3.1.4	Versuchsgruppen .....	41
3.1.5	Versuchsprotokoll .....	41

---

3.1.6	Medikamente und Medikamentenapplikation .....	42
3.2	Molekularbiologischer Teil .....	43
3.2.1	DNA-Amplifikation mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) .....	43
3.2.2	Agarose-Gelelektrophorese von Nukleotiden .....	43
3.2.3	RNA-Isolierung und -Aufbereitung .....	44
3.2.3.1	RNA-Isolierung .....	44
3.2.3.2	Qualitätskontrolle der RNA .....	46
3.2.3.3	Umschreibung der RNA in cDNA (Reverse Transkription) .....	47
3.2.4	Quantitative Real-Time-PCR (RT-qPCR) .....	48
3.2.5	Auswertung der RT-qPCR .....	52
3.2.6	Verwendete Puffer und Medien .....	54
3.3	Software und Statistik .....	56
3.3.1	Verwendete Computerprogramme .....	56
3.3.2	Web-Quellen .....	56
3.3.3	Statistische Auswertung .....	56
4.	Ergebnisse .....	58
4.1	Letalitätsversuche .....	58
4.2	Qualitätskontrollen der molekularbiologischen Experimente .....	60
4.2.1	Qualitätskontrolle der RNA .....	60
4.2.2	Effizienzbestimmung der RT-qPCR Primer .....	61
4.2.3	Qualitätskontrolle der RT-qPCR-Reaktion .....	61
4.2.4	Prüfung der Referenzgene .....	64
4.3	Genexpressionsanalysen .....	65
4.3.1	Expressionsanalysen von ATF3 .....	65
4.3.2	Expressionsanalysen von Ppp1r15a .....	68
5.	Diskussion .....	71
5.1	Wertung der Methodik .....	71
5.1.1	Tiermodell .....	71
5.1.2	Genexpressionsanalyse mittels RT-qPCR .....	73
5.2	Diskussion der Ergebnisse .....	75
5.2.1	Letalitätsstudie .....	75
5.2.2	Genexpressionsanalysen .....	77

---

5.2.2.1	Expressionsanalysen von ATF3 .....	77
5.2.2.2	Expressionsanalysen von Ppp1r15a .....	79
5.3	Schlussfolgerung.....	81
6.	Literaturverzeichnis .....	82
7.	Publikationen / Dank .....	101
7.1	Publikationen.....	101
7.2	Dank.....	102

## I. Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

### Abbildungen:

Abb. 1: Molekülstruktur von Melatonin .....	23
Abb. 2: Tageszeitlicher Verlauf der Melatoninserumspiegel .....	24
Abb. 3: Versuchstier nach Gefäßpräparation .....	39
Abb. 4: Mobilisiertes Coecum beim Versuchstier .....	40
Abb. 5: Zeitlicher Ablauf der Tierversuche .....	42
Abb. 6: Kumulative Sterberate der Therapiegruppen nach CLI.....	59
Abb. 7: Nicht-lineare Regressionsanalyse Melatoninindosis - Überlebenszeit.....	59
Abb. 8: RNA-Gelelektrophorese .....	60
Abb. 9: Schmelzkurven nach RT-qPCR .....	62
Abb. 10: Kontrollgelelektrophoresen nach RT-qPCR.....	63
Abb. 11: $C_{y_0}$ -Werte der Referenzgene .....	64
Abb. 12: Hepatische rel. Expression von ATF3 in den Therapiegruppen .....	66
Abb. 13: Regressionsanalyse: Expression von ATF3 und Überlebenszeit .....	67
Abb. 14: Hepatische rel. Expression von Ppp1r15a in den Therapiegruppen.....	69
Abb. 15: Regressionsanalyse: Expression von Ppp1r15a und Überlebenszeit.....	70

### Tabellen:

Tab. 1: Versuchsgruppen .....	41
Tab. 2: Medikamentenansätze .....	42
Tab. 3: Primer für die RT-qPCR .....	50
Tab. 4: Überlebenszeiten der Tiere nach CLI .....	58
Tab. 5: Effizienzen der Primer der RT-qPCR.....	61

## II. Verzeichnis der Abkürzungen

°C	Grad Celsius
A.	Arteria, Arterie
Abb.	Abbildung
ACCP	American College of Chest Physicians
AP-1	Aktivierendes Protein 1
Aqua dest.	Aqua destillata (deutsch: destilliertes Wasser)
ATF	Activating transcription factor (aktivierender Transkriptionsfaktor)
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
Ca	Kalzium
ca.	circa
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate (deutsch: zyklisches Adenosinmonophosphat)
CASP	Colon ascendens Stent Peritonitis
cDNA	complementary DNA (deutsch: komplementäre DNA)
CLI	Coecumligatur und -inzision
CMV	Cytomegalievirus
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
Cp	crossing point (deutsch: Kreuzungspunkt) Abkürzung für Cq-Wert, der über die Methode der zweiten Ableitung bestimmt wurde.
Cq	cycle of quantitation (deutsch: Quantifizierungszyklus)
CREB	ATF / cAMP response element binding proteins (deutsch: an ATF / cAMP-anprechende Elemente bindendes Protein)
Ct	cycle of threshold (deutsch: Schwellenwertzyklus) Abkürzung für Cq-Wert, der über die Methode der Punktfestsetzung mittels einer Geraden parallel zur x-Achse bestimmt wurde.

---

Cy <sub>0</sub>	Abkürzung für C <sub>q</sub> -Wert, der über die Methode nicht-linearen Regression nach Richards-Funktion bestimmt wurde.
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DIC	disseminated intravascular coagulation (deutsch: disseminierte intravasale Gerinnung)
DNA	Desoxyribonucleinacid (deutsch: Desoxyribonukleinsäure)
dt.	deutsch
e.V.	eingetragener Verein
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eIF2 $\alpha$	eukaryotischer Initiationsfaktor 2 alpha
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERK	extracellular-signal regulated kinase (deutsch: über extrazelluläres Signal regulierte Kinase)
ESICM	European Society of Intensive Care Medicine
<i>et al.</i>	<i>et alii / et aliae</i>
etc.	et cetera
EtOH	Ethanol
g	Gramm / Erdbeschleunigungsfaktor
G	Gauge (Maßeinheit für die Größe von Kanülen)
GADD34	growth arrest and DNA damage inducible protein 34 (deutsch: Wachstumsstopp und DNA Schaden induzierbares Protein 34)
GIRK	G protein-coupled inwardly-rectifying potassium channel (deutsch: G-Protein gekoppelte einwärts-gleichrichtende Kaliumkanäle)
Gld. / Gldd.	Glandula / Glandulae (deutsch: Drüse / Drüsen)
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
GSH	Glutathion
h	hora / horae (deutsch: Stunde / Stunden)
H <sub>2</sub> O	Wasser
Hb	Hämoglobin

---

Hif2 $\alpha$	hypoxia inducible factor 2 alpha (deutsch: Hypoxie-induzierbarer Faktor 2 alpha)
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
IFN	Interferon
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare Isoform der Stickstoffmonoxid-Synthase
JNK	c-Jun N-terminale Kinasen, Synonym für SAPK
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
l	Liter
LDH	Laktatdehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar (entspricht mol/l)
MAP	mean arterial pressure (deutsch: mittlerer arterieller Blutdruck)
MAPK	mitogen activated protein kinase (deutsch: mitogen aktivierte Proteinkinase)
mg	Milligramm
min	Minute
mm <sup>3</sup>	Kubikmillimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MOF	multiple organ failure (deutsch: Multiorganversagen)
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
MW	Mittelwert
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ l	Mikroliter
n	Anzahl
NF $\kappa$ B	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells (deutsch: Kernfaktor 'kappa-light-chain-enhancer' aktivierter B-Zellen)

---

ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
Nrf2	nuclear respiratory factor 2 (deutsch: „Kernatmungsfaktor“ 2)
NTC	no template control (deutsch: Kontrolle ohne Matrix)
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
OD	optische Dichte
p.a.	pro analysi
p38 MAPK	phospho 38 MAPK
p53	Zellprotein 53
Pa	Partialdruck
PCR	polymerase-chain-reaction (deutsch: Polymerasekettenreaktion)
PKA	Proteinkinase A
PKB	Proteinkinase B
PKG	Proteinkinase G
PLA2	Phospholipase A2
PLC	Phospholipase C
PP1 / Ppp1	Proteinphosphatase 1
PP2 / Ppp2	Proteinphosphatase 2
Ppp1r15a	Proteinphosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 15A (deutsch: regulatorische (inhibitorische) Untereinheit 15A)
R <sup>2</sup>	Regressionskoeffizient
RAR	retinoic acid receptor (deutsch: Retinsäure-Rezeptor)
rel.	relativ / relative / relativer
RFU	relative fluorescence units (deutsch: relative Fluoreszenzeinheiten)
RNA	Ribonucleinacid (deutsch: Ribonukleinsäure)
ROR	RAR-related orphan receptor (deutsch: RAR-verwandter „verwaister“ Rezeptoren)
ROS	reactive oxygen species (deutsch: reaktive Sauerstoffspezies)

---

Rps16	ribosomales Protein S16
Rps21	ribosomales Protein S21
rRNA	ribosomale RNA
RT-qPCR	reverse transcriptase quantitative Real-Time PCR (deutsch: reverse Transkriptase quantitative Real-Time PCR)
RZR	retinoid Z receptor (deutsch: Retinoid-Z-Rezeptor)
S	Svedberg (Maßeinheit des Sedimentationskoeffizienten)
s	Sekunde
s.c.	subcutan
SAGE	serial analysis of gene expression (deutsch: serielle Analyse der Genexpression)
SAPK	stress activated protein kinase (deutsch: stressaktivierte Proteinkinase); Synonym für JNK
SCCM	Society of Critical Care Medicine
SD	standard deviation (deutsch: Standardabweichung)
SEM	standard error of the mean (deutsch: Standardfehler)
SIRS	systemic inflammatory response syndrome (deutsch: Syndrom der systemischen inflammatorischen Antwort)
SSC	Surviving Sepsis Campaign
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	Thermus aquaticus
TLR	Toll-like Receptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAIL10	tumor necrosis factor ligand family, member 10 (deutsch: Mitglied 10 der Tumor Nekrose Faktor Ligandenfamilie)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	unit / units (deutsch: Einheit / Einheiten)
u.a.	unter anderem
UV	ultraviolett
V	Volt
V.	Vena, Vene

vgl.	vergleiche
W	Watt
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
ZVD	zentraler Venendruck
ZVK	Zentralvenenkatheter

## 1. Zusammenfassung / Abstract

### 1.1 Zusammenfassung

Die Applikation von Melatonin führt im Tierversuch sowohl beim hämorrhagischen als auch beim septischen Schock zu organprotektiven Effekten und einer Verlängerung der Überlebenszeit. Bisherige Studien zur Therapie mit Melatonin im Tiermodell geben jedoch einen breiten Dosierungsbereich zwischen 100 µg und 100 mg/kg Körpergewicht (KG) an, ein optimaler Dosisbereich ist unbekannt. Bei der Untersuchung der protektiven Mechanismen einer Melatonintherapie demonstrierte unsere Arbeitsgruppe in der Vergangenheit im Rahmen einer Microarray-Analyse die Veränderungen des hepatischen Genexpressionsprofils nach hämorrhagischem Schock im Tiermodell, wobei insbesondere die Expression der Gene ATF3 und Ppp1r15a signifikant verändert war. In der vorliegenden Arbeit wurden basierend auf diesen Microarray-Analysen zwei Gene ausgewählt (ATF3 und Ppp1r15a) und deren Expression in der Leber in den unterschiedlichen Therapiegruppen im Rahmen des septischen Schocks untersucht. Ziel der vorliegenden Arbeit war daher zum Einen die Untersuchung einer Dosisabhängigkeit der Verringerung der Letalität durch Melatonin nach polymikrobieller Sepsis bei der Ratte und die Evaluation eines optimalen Dosisbereiches; zum Anderen wurden ein möglicher Einfluss von Melatonin in verschiedenen Dosierungen auf die Transkription der Gene ATF3 und Ppp1r15a in der Leber und ein Zusammenhang zwischen der Expression dieser Gene und der Überlebenszeit der Tiere überprüft.

Bei männlichen Sprague-Dawley Ratten wurde in Allgemeinanästhesie eine polymikrobielle Sepsis mittels Coecumligatur und -inzision (CLI) induziert (n=15/Gruppe). Anschließend erfolgte die einmalige intravenöse Gabe von Vehikellösung oder Melatonin in verschiedenen Dosierungen (0,01; 0,1; 1,0; 10 mg/kg KG). Die Tiere verblieben für einen Beobachtungszeitraum von maximal 720 min in Narkose, der Sterbezeitpunkt wurde dokumentiert. Zur molekularbiologischen Untersuchung wurde den Versuchstieren nach Todeseintritt die Leber entnommen, aufgearbeitet und der Genexpressionsanalyse mittels RT-qPCR zugeführt.

Während sich in der Melatonin 0,01 mg/kg KG-Gruppe keine signifikante Veränderung der Überlebenszeit gegenüber der Vehikel-Gruppe zeigte, führte die Applikation von Melatonin in den Therapiegruppen ab 0,1 mg/kg KG zu einem signifikant verlängerten Überleben nach CLI. Eine Analyse der Überlebenszeit mittels Methode der kleinsten

Fehlerquadrate (least square best-fit) zeigte ein Maximum bei 576 min und keine weitere Steigerung der Überlebenszeit über einer Dosierung von 1,0 mg/kg KG Melatonin.

Für ATF3 zeigte sich in allen Sepsisgruppen ein Anstieg der hepatischen relativen Expression gegenüber der scheinoperierten Kontrollgruppe; dieser Expressionsanstieg war signifikant zwischen Vehikel-Gruppe und scheinoperierter Kontrolle, sowie der Melatonin 0,01 mg/kg KG-Gruppe und der scheinoperierten Kontrolle. Zwischen allen Sepsisgruppen bestanden keine signifikanten Unterschiede in der relativen Expression von ATF3, unabhängig von der Therapie. Die Korrelationsanalyse zwischen hepatischer ATF3-Expression und Überlebenszeit der Versuchstiere ergab eine Regression von  $R^2 = 0,157$ .

Die Expression von Ppp1r15a zeigte geringe Unterschiede in der hepatischen Expression zwischen den untersuchten Gruppen. Signifikant unterschieden sich die scheinoperierte Gruppe von der Melatonin 0,01 mg/kg KG-Gruppe, und die Melatonin 0,01 mg/kg KG-Gruppe von der Melatonin 1 mg/kg KG-Gruppe. Die Korrelationsanalyse ergab hier eine Regression von  $R^2 = 0,268$ .

Die vorliegende Studie demonstriert, dass die Therapie mit Melatonin nach polymikrobieller Sepsis zu einer dosisabhängig signifikant verlängerten Überlebenszeit bei der Ratte führen kann. Die Ergebnisse zeigen den günstigsten Effekt auf das Überleben bei einer Melatoninindosis von 1,0 mg/kg KG.

Eine Beeinflussung der Genexpression von ATF3 und Ppp1r15a durch Melatonin, wie sie im hämorrhagischen Schockmodell in der Rattenleber in früheren Studien gezeigt werden konnte, konnte in dieser Untersuchung des septischen Schocks nicht dargestellt werden. Die Relevanz der ausgewählten Gene für die hepatoprotektive Wirkung von Melatonin kann daher an dieser Stelle noch nicht abschließend beurteilt werden.

## 1.2 Abstract

Application of melatonin in animal experiments leads to beneficial effects with respect to organ function and prolonged survival both after hemorrhagic and septic shock. Previous animal studies with melatonin therapy were carried out using a wide dose range between 100 µg and 100 mg/kg bodyweight, and the optimal dose of melatonin is unknown. In an earlier microarray analysis, our working group was able to show the influence of melatonin therapy on hepatic gene expression profiles after hemorrhagic shock in rat, with significant changes regarding the transcription of ATF3 and Ppp1r15a.

The aim of this study was thus to evaluate a dose dependency of the decline of lethality by melatonin application after polymicrobial sepsis and the evaluation of an optimal dose range. Furthermore, a possible influence of melatonin in different doses on the transcription of the two selected genes in liver and a correlation between gene expression and survival of the animals was studied.

In male Sprague Dawley rats was a polymicrobial sepsis induced by cecal ligation and incision (CLI) under general anesthesia (n=15/group). Afterwards, an intravenous bolus of vehicle or melatonin in different doses (0.01; 0.1; 1.0; 10.0 mg/kg bodyweight) was applied. Animals remained under general anesthesia for a maximum observation period of 720 min, and time of death was documented. After exitus, the livers were extracted, and gene expression analysis of ATF3 and Ppp1r15a was performed by means of RT-qPCR.

With respect to survival, in the group of melatonin 0.01 mg/kg bodyweight was no significant change in survival time observed, compared to the vehicle group. The application of melatonin at 0.1 mg/kg body weight or more lead to a significant prolongation of survival after CLI. Interpolation of a non-linear regression curve according to the least square best-fit method revealed a maximum at 576 min, and no further increase at doses higher than 1.0 mg/kg melatonin.

Regarding ATF3, an increase of hepatic relative expression was noted in all sepsis groups compared with sham-operated controls. No significant differences in relative expressions were found between the different sepsis groups. Compared with the sham operated group, hepatic ATF3 expression was significantly increased in both the vehicle group and the melatonin 0.01 mg/kg group. The correlation analysis between ATF3 expression and survival time of the animals revealed a regression with  $R^2 = 0.157$ .

Regarding hepatic Ppp1r15a expression, there were only small differences between the groups. Differences in Ppp1r15a expression were significant for the sham operated group

versus melatonin 0.01 mg/kg as well as for melatonin 0.01 mg/kg versus melatonin 1 mg/kg. Correlation analysis revealed a regression with  $R^2 = 0.268$ .

This study shows that administration of melatonin may significantly improve survival after polymicrobial sepsis in rats. The present findings show the dose dependency of this effect and present an optimal dose of melatonin at 1.0 mg/kg body weight.

For ATF3 and Ppp1r15a, melatonin did not significantly alter gene expression in rat liver, such as observed in hemorrhagic shock model in earlier trials. Further evaluation is necessary to assess the relevance of these two selected genes for hepatoprotective effects of melatonin.

## 2. Einleitung

### 2.1 Sepsis und septischer Schock

#### 2.1.1 Grundlagen

Die Sepsis im Sinne einer komplexen systemischen Reaktion auf eine Infektion ist weltweit eine der Hauptursachen für Morbidität und Mortalität, deren Inzidenzrate weiter zunimmt. So erkrankten allein in Deutschland jährlich ca. 79.000 Patienten an einer Sepsis und 75.000 an einer schweren Sepsis oder einem septischen Schock [24]. Aufgrund der demographischen Veränderungen in unserer Gesellschaft im Sinne einer Überalterung ist zukünftig auch mit einer Zunahme der Letalität bei Sepsis zu rechnen [158]. Pro Jahr versterben in Deutschland an septischen Erkrankungen, die oft mit schwerem Organversagen einhergehen, trotz der heute möglichen intensivmedizinischen Maßnahmen noch ca. 60.000 Menschen [24]; Überlebende haben noch über Jahre eine verminderte Lebensqualität [158].

Eine erste Definition der Sepsis lieferte Bone 1989 mit der Beschreibung der Sepsis als „Invasion von Mikroorganismen und / oder ihrer Toxine in den Blutstrom zusammen mit der Reaktion des Organismus auf diese Invasion“ [17].

Der Begriff der Sepsis hat im Laufe der Zeit einige Veränderungen durchlaufen, bis 1992 nach einer jahrelangen Konsensuskonferenz des American College of Chest Physicians (ACCP) und der Society of Critical Care Medicine (SCCM) erstmals genauere Kriterien und Definitionen zur Sepsis erstellt wurden [132, 181]. Nach einer Modifikation durch die European Society of Intensive Care Medicine (ESICM) etablierten sich ein Kriterienkatalog für die Sepsis-Diagnose sowie die Einteilung in Schweregrade, wie sie heute Gültigkeit haben.

Die Diagnose „Sepsis“ ist demnach bei Patienten mit gesicherter oder aber auch vermuteter Infektion zu stellen, die mindestens zwei von vier Parametern des Systemischen Inflammatorischen Response-Syndroms (SIRS) aufweisen. Diese Kriterien sind (nach [190]):

- Fieber ( $\geq 38\text{ °C}$ ) oder Hypothermie ( $\leq 36\text{ °C}$ ) bestätigt durch eine rektale oder intravasale oder intravesikale Messung
- Tachykardie: Herzfrequenz  $\geq 90/\text{min}$
- Tachypnoe (Atemfrequenz  $\geq 20/\text{min}$ ) oder Hyperventilation ( $\text{PaCO}_2 \leq 4,3\text{ kPa} / \leq 33\text{ mmHg}$ )

- Leukozytose ( $\geq 12.000/\text{mm}^3$ ) oder Leukopenie ( $\leq 4000/\text{mm}^3$ ) oder  $\geq 10\%$  unreife Neutrophile im Differentialblutbild

Kommt zusätzlich noch eine infektionsbezogene Dysfunktion mindestens eines Organs oder Organsystems dazu, spricht man von schwerer Sepsis. Ein septischer Schock liegt dann vor, wenn zusätzlich zur schweren Sepsis noch eine arterielle Hypotension trotz adäquater Volumentherapie auftritt. Beim septischen Schock handelt es sich um eine fulminante Erkrankung mit einer Letalität von über 50 % [55]. Unbehandelt führt die Sepsis regelhaft zum Tod durch Multiorganversagen (MOF).

Trotz intensiver Forschung sind die exakten pathophysiologischen Mechanismen, die zum MOF führen, nicht genau bekannt, weshalb kausale Ansätze zur Prävention und Therapie des MOF weiterhin fehlen [160, 168].

### 2.1.2 Pathophysiologie der Sepsis

Obwohl die Pathophysiologie der Sepsis bis heute nicht restlos geklärt ist [168], gibt es Anhaltspunkte, an denen sich auch die derzeitige Therapie orientiert. Eine zentrale These besteht hier dahingehend, dass Kreislaufstörungen in der Sepsis über Störungen der Mikrozirkulation zu einem Missverhältnis von Sauerstoffangebot und Sauerstoffnachfrage im Gewebe führen, was in einer globalen Ischämie mündet [98]. Diese Gewebischämie führt zu fortschreitendem Organversagen und unbehandelt letztlich zum Tod.

Weiterhin kommt es zu einem globalen Anstieg von Entzündungsmediatoren wie z. B. der proinflammatorischen Zytokine IL-6, IL-12, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ . Diese führen zur Aktivierung vieler Zellpopulationen (T-Zellen, Makrophagen) und zu einer peripheren Vasodilatation und verstärken so das Problem der Mikrozirkulationsstörung. Die Zytokine führen außerdem zu einer Aktivierung des Endothels, was letztlich in Störungen der Blutgerinnung (disseminierte intravasale Gerinnung, DIC) sowie Endothelschäden mit Permeabilitätsstörungen endet [112].

Auf molekularbiologischer Ebene gilt als gesichert, dass die Sepsis mit einer Stimulation des NF $\kappa$ B-Signalwegs und - über diesen vermittelt - u.a. einer vermehrten Expression der induzierbaren Isoform der Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) einhergeht [66]. Dies wiederum führt zu einer vermehrten Bildung von NO, das aufgrund des Mangels an Antioxidantien nicht mehr ausreichend verstoffwechselt werden kann und damit zu einem Redox-Ungleichgewicht führt [76]. Im Tiermodell zeigte sich, dass es auch über andere

Stoffwechselwege zu einem Anstieg von freien oxidativen Substanzen kommt, wie z. B. dem Superoxidradikal, das vermehrt in der Aorta gebildet wird [247, 249]. Speziell in Leber und Hirn sind darüber hinaus auch erhöhte Spiegel der Lipidperoxidase bei Sepsis beschrieben [32]. Diese Faktoren führen insgesamt zu einem Mangel an antioxidativen Substanzen, der zu einer fortwährenden Anhäufung von Radikalen führt, was im Zellkulturmodell nachgewiesen werden konnte [76, 225].

Auch wenn es diesbezüglich Erklärungsansätze gibt, beispielsweise im Hinblick auf die Störung der oxidativen Phosphorylierung in Mitochondrien mit der Folge der Unfähigkeit der Zelle zur oxidativen ATP-Bildung [31, 47], so ist die Pathophysiologie des Multiorganversagens (MOF) bei der Sepsis heute trotz vieler Studien immer noch nicht restlos geklärt [160, 168]. Im Zuge der Erforschung der pathophysiologischen Grundlagen der Sepsis scheint die mitochondriale Dysfunktion einen großen Stellenwert zu haben.

### **2.1.3 Der septische Schock bei Peritonitis**

Bei der Peritonitis handelt es sich um eine akute oder chronische Entzündung des Bauchfells, die nur örtlich begrenzt (lokale Peritonitis) oder über das ganze Bauchfell diffus verteilt (diffuse Peritonitis oder Vierquadrantenperitonitis) auftreten kann [55]. Sie wird gemäß ihrer Ätiologie in drei Formen unterteilt: Primär durch hämatogene oder lymphogene Keime verursacht, sekundär durch Perforation intraabdomineller Hohlgänge und tertiär als persistierende Form [147].

Während die anderen Peritonitisformen eine eher untergeordnete Rolle spielen, ist die häufigste Form die sekundäre Peritonitis durch intraabdominelle Hohlorganperforation [18]. Hier steht die infektiös bakterielle endogene Kontamination im Vordergrund, wie sie z.B. bei perforierter Appendizitis oder Darmperforation aus anderer Ursache auftritt [55].

Auch die Durchwanderung von Bakterien durch die Darmwand (Durchwanderungsperitonitis) bei Cholezystitis, Strangulationsileus oder bei Mesenterialarterienverschluss findet man als Ursachen einer Peritonitis [55].

Die Peritonitis nach diesen oben genannten Ursachen ist eine häufig schwer verlaufende Erkrankung, die bei dem vorliegenden polymikrobiellem Erregerspektrum [52] schwierig zu therapieren ist. Als Komplikation entwickelt sich deshalb hieraus oft eine Sepsis bis hin zum lebensbedrohlichen septischen Schock. Die Häufigkeit abdomineller Infektionen als Fokus einer schweren Sepsis wird in Studien zwischen 25 % [24] und 38 % [175]

angegeben. Die Peritonitis weist in Abhängigkeit vom Erregerspektrum und der Abwehrlage des Patienten eine Gesamtlealität von 5-30 % auf [55].

Die derzeitige Therapiestrategie beinhaltet die operative Versorgung mit Sanierung des Herdes, Spülung und Drainage sowie die parallele chemotherapeutische Therapie mit Antibiotika nach (vermutetem) Erregerspektrum [147].

#### **2.1.4 Sepsistherapie heute**

Die Therapie der Sepsis hat ebenso wie Diagnostik und Einteilung im Laufe der Zeit Änderungen und Umstrukturierungen erfahren. Trotzdem gelang es bei über mehrere Dekaden ansteigender Inzidenz des Krankheitsbildes „Septischer Schock“ lange Zeit nicht, die damit assoziierte Mortalitätsrate relevant zu senken [62].

Früheren Studien zur Therapie mittels hämodynamischer Optimierung [65, 87] (z.B. auch durch Einsatz des Pulmonalarterienkatheters [43]) oder Immuntherapie [172] war gemeinsam, dass Patienten auch sehr spät (bis zu 72 h nach Aufnahme auf die Intensivstation) in das Studienprotokoll eingeschlossen und nach diesem therapiert wurden. Hier konnte keine Studie einen großen Nutzen bzw. herausragenden Effekt eines neuen Therapieansatzes zeigen [172, 199].

Dies änderte sich, als Emanuel Rivers *et al.* 2001 die schon vorher beschriebene Vorstellung einer zielgerichteten hämodynamischen Therapie um das Konzept der frühen Therapie noch in den ersten Stunden nach Diagnosestellung ergänzten [199]. Hier konnten erstmals überzeugende Ergebnisse in Form einer signifikanten Senkung der Mortalität präsentiert werden. Dies war der erste wirkliche Durchbruch in der Therapie der Sepsis. Diese Studie stellt noch heute die Basis für die Therapierichtlinien dar und basiert zum großen Teil auf einer frühen, zielgerichteten Kreislauftherapie. Diese frühe zielgerichtete Therapie fokussiert auf die Beeinflussung von kardialer Vorlast, Nachlast und myokardialer Kontraktilität mit dem Ziel einer verbesserten Sauerstoffgewebeversorgung. Diagnostische Zielparameter zur Überprüfung des Therapieverlaufs sind ZVD, MAP, Diurese, zentralvenöse Sauerstoffsättigung und arterielle Laktatkonzentration [190, 199]. Auch die direkte Überwachung der Mikrozirkulation über die Bildgebung der Zungen-Mikrozirkulation wurde beschrieben [123]. Die Erkenntnis der Relevanz des Zeitfaktors führt auch dazu, dass die Patienten durch gezielte Diagnostik schon frühzeitig erkannt und einer Therapie zugeführt werden. Wird die Gewebeischämie rechtzeitig eingedämmt, können weitreichende Komplikationen wie DIC, Gefäßpermeabilitätsstörungen

(Endotheldefekt) und Störungen des peripheren Gefäßwiderstandes [112] vermieden werden. Rivers *et al.* postulierten, dass „auch eine aggressive hämodynamische Therapie nicht mehr den kompletten Erfolg zeigen kann [...] wenn eine frühe, umfassende Therapie nicht durchgeführt wird“ [199]. Konkret beinhaltet die Sepsistherapie in der heutigen Form (nach den S-2k Leitlinien der Deutschen Sepsis-Gesellschaft e.V.) vier Säulen [190]:

- **Kausale Therapie**

- Chirurgische Fokussanierung (falls möglich)
- Frühe antimikrobielle Therapie (innerhalb der ersten Stunde beginnend): Anfangs kalkuliert mit Breitband-Antibiotikatherapie, dann nach möglichst zeitnaher Keim- und Resistenzbestimmung Umstellung auf gezielte Antibiotikatherapie; Neuevaluation der Therapie alle 48-72 h.

- **Supportive Maßnahmen:**

- Volumentherapie zur Kreislaufstabilisierung unter Beachtung verschiedener hämodynamischer Zielkriterien (ZVD, MAP, Diurese, zentralvenöse / gemischtvenöse Sauerstoffsättigung, Laktatkonzentration)
- Therapie mit Vasopressoren und Inotropika
- Nierenersatzverfahren
- Atemwegsmanagement und Beatmung

- **Adjunktive Therapie (Auswahl)**

- Glukokortikosteroide
- Insulintherapie
- Immunglobuline
- Selen

- **Andere supportive Maßnahmen (Auswahl)**

- Thromboseprophylaxe
- Ernährung und metabolische Kontrolle
- Immunonutrition (Glutamin)
- Blutprodukte
- Erythropoetin

Um die Umsetzung dieser Maßnahmen zu vereinfachen, hat die Surviving Sepsis Campaign (SSC) die Maßnahmen zu sogenannten „Sepsisbündeln“ zusammengefasst, die auf Grundlage der aktuellen Leitlinien die wichtigsten Maßnahmen zusammenfassen und so eine zeitnahe Umsetzung ermöglichen sollen [133]. Dieser Ansatz „stellt die Kombination und die zeitliche Abfolge diagnostischer und therapeutischer Maßnahmen in den Mittelpunkt und konzentriert sich auf die Verbesserung von Prozessen“ [133]. Eine aktuelle Studie von Barochia *et al.* zeigt, dass die Patienten, die nach standardisierten Maßnahmenbündeln behandelt wurden, einen Überlebensvorteil gegenüber den konventionell behandelten Patienten hatten [12]. Die Sepsisbündel beinhalten, orientierend an den Leitlinien, zwei Bündel von Maßnahmen („resuscitation bundle“ = Sofortmaßnahmen und „management bundle“ = therapeutische Schritte), die essentiell zur Verbesserung des Therapieerfolges sind [229]. Sie sind überschaubar und auf jeder Intensivstation umsetzbar [229].

## 2.2 Melatonin

### 2.2.1 Physiologische und pharmakologische Eigenschaften

Melatonin (N-[2-(5-Methoxyindol-3-yl)ethyl]acetamid) ist ein körpereigenes neurosekretorisches Peptidhormon (Abb. 1), das nach heutigem Erkenntnisstand bei allen Vertebraten hauptsächlich von den Pinealozysten der Epiphyse (Zirbeldrüse, Glandula pinealis) sezerniert wird [55, 124].

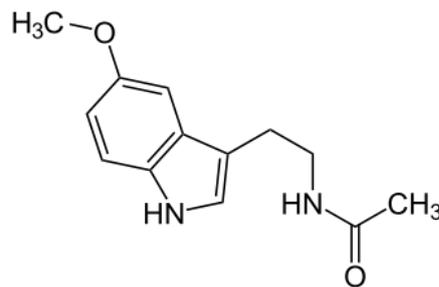
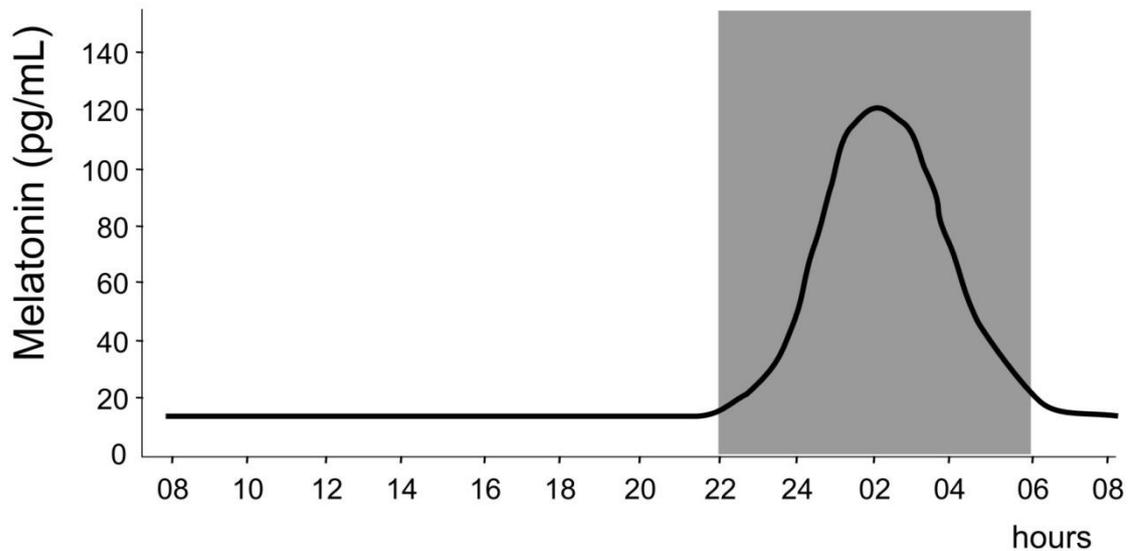


Abb. 1: Molekülstruktur von Melatonin

Es dient im Körper als „Signal der Dunkelheit“ der Steuerung der zirkadianen Rhythmik, indem es tageszeit- und tageslichtabhängig sezerniert wird und so beispielsweise das Müdigkeitsempfinden des Menschen mitreguliert [7, 8]. Die tageslichtabhängige Sezernierung ist durch eine Vernetzung von optischem System (retinale Ganglienzellen) mit dem *Nucleus suprachiasmaticus* im Hypothalamus, dem „zentralen Zeitgeber“ des menschlichen Körpers möglich [194]. Der Hypothalamus wirkt als Signalgeber auf die Hypophyse und damit letztlich auch die Zirbeldrüse, von der Melatonin während der Dunkelheit aus Tryptophan *de-novo* synthetisiert und sezerniert wird (Abb. 2) [49, 111, 121, 217, 220, 246].

Aber auch andere physiologische Funktionen werden im Rahmen tierexperimenteller Studien diskutiert, so zum Beispiel die Beeinflussung des Gefäßtonus [54, 227] und thermoregulatorische Eigenschaften [233].



**Abb. 2: Tageszeitlicher Verlauf der Melatoninserumspiegel**

Dargestellt ist ein zirkadianes Profil der physiologischen Melatoninkonzentration im Serum beim Menschen. Grauer Bereich = Dunkelperiode (nach [111])

Der therapeutische Einsatz von Melatonin beim Menschen beschränkt sich derzeit hauptsächlich auf die Behandlung und Vermeidung von Jetlag-Symptomen oder anderen Schlafstörungen, die auf einen gestörten Tag-Nacht-Rhythmus zurückzuführen sind [104, 176]. So ist das einzige derzeit in Deutschland gelistete Melatonin-Präparat Circadin® zugelassen als „Monotherapie für die kurzzeitige Behandlung der primären, durch schlechte Schlafqualität gekennzeichneten Insomnie bei Patienten ab 55 Jahren“ (Fachinformation, FachInfo-Service Stand Februar 2013). Die klinische Relevanz von Melatonin gewinnt allerdings durch neue Erkenntnisse der Forschung zunehmend an Bedeutung [192]. So liegen beispielsweise Ergebnisse aus der molekularbiologischen Tumorforschung vor, die Melatonin einen onkostatistischen Effekt zuschreiben, insbesondere bei Leiomyosarkom und Brustkrebs [50, 125]. Ebenso gibt es aus dem Bereich der Epilepsieforschung beim Menschen bereits Ergebnisse bezüglich der Melatoninbehandlung im Sinne einer Milderung von Krampfanfällen [10]. Weiterhin sind aus der Anästhesiologie positive Effekte einer perioperativen Melatoningabe sowohl im Bereich der Prämedikation als auch der Sedierung und der Analgesie beschrieben [105]. Weitere Untersuchungen beschäftigen sich mit dem therapeutischen Einsatz von Melatonin bei sexueller Dysfunktion, Gallensteinen und Obstipation [3].

Auch in der Intensivmedizin findet Melatonin zunehmende Beachtung. So wurde das Problem der Schlafstörungen bei Intensivpatienten schon in früheren Studien beschrieben [126, 237]. Mistraretti *et al.* konnten 2008 zeigen, dass diese Schlafstörungen nicht nur durch die Umgebungsbedingungen auf Intensivstationen, sondern auch durch einen

Mangel an Melatonin verursacht sind, der bei vielen Intensivpatienten aufgrund eines vermehrten Verbrauchs von Antioxidantien und einer verminderten Ausschüttung von Melatonin auftritt [155]. Dieser Melatoninmangel bei Intensivpatienten [157, 164, 171, 214] mit einer Abschwächung bzw. dem Fehlen nächtlicher Spitzenkonzentrationen sowie einer ebenso verminderten Basalkonzentration am Tag [215], wurde als neuer Ansatzpunkt der intensivmedizinischen Therapie diskutiert [155, 156].

### 2.2.2 Melatonin in der Sepsisforschung

Schon 1996 wurden von Wichmann *et al.* und Maestroni *et al.* tierexperimentelle Ergebnisse veröffentlicht, die positive Effekte von Melatonin in der Behandlung der Sepsis beziehungsweise des septischen Schocks zeigen [143, 241]. Inzwischen gibt es zunehmende Hinweise für eine protektive Rolle von Melatonin auf die zelluläre Funktion und Gewebemöostase unter stressabhängigen Bedingungen [140].

Der positive Einfluss von Melatonin auf die Überlebenszeit nach Sepsis im Tiermodell wurde inzwischen mehrfach untersucht und beschrieben [196, 241, 247, 249, 253].

Bezüglich des Einflusses von Melatonin auf inflammatorische Zytokine in Sepsismodellen ist die Datenlage derzeit kontrovers. Einerseits gibt es Anhalte dafür, dass Melatonin im Tiermodell die in der Sepsis erhöhten TNF- $\alpha$  Spiegel reduziert [13, 247, 253], andererseits gelang es nicht in Monozyten oder Makrophagen die Reduktion der LPS-stimulierten Freisetzung von TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-1 $\beta$  oder IL-6 *in vitro* nachzuweisen [11, 212, 243]. Carrillo-Vico *et al.* fanden bei LPS-induzierter Sepsis bei Mäusen lediglich einen signifikanten Anstieg von IL-10 durch Melatoninbehandlung, aber keine signifikante Änderung von IL-1, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 und IFN $\gamma$  durch Melatonin [32].

Ein weiterer Effekt wird den antioxidativen Eigenschaften von Melatonin zugeschrieben. Bei Sepsis liegt eine exzessive Produktion reaktiver Sauerstoffspezies vor, woraus ein relativer Mangel endogener Antioxidantien resultiert, was als „oxidativer Stress“ bezeichnet wird [48, 151]. Die freien Radikale entfalten ihre toxische Wirkung über eine Induktion von Lipidperoxidation und Degradation von Proteinen, Kohlenhydraten und DNA-Molekülen [48]. Dem vermag Melatonin über eine Reihe von Mechanismen entgegenzuwirken. So wirkt es *in vitro* einerseits selbst als Elektronendonator [81, 183] und interagiert direkt mit Peroxyl-Radikalen [182], einzelnen Sauerstoff-Spezies [30] und Wasserstoffperoxid [223] und wirkt so diesen freien Radikalen direkt entgegen. Andererseits sind auch einige der Melatonin-Metabolite in der Lage, Radikale zu

deoxigenieren [73, 223, 224]. Außerdem konnte auch eine direkte Minderung der Radikalbildung, wie zum Beispiel des Superoxid-Anions, belegt werden [247, 249]. Des Weiteren ist Melatonin auch in der Lage, seinerseits Antioxidantien und antioxidativ wirksame Enzyme hochzuregulieren [200, 228] sowie prooxidative Enzyme zu hemmen, wie zum Beispiel Lipidperoxidase [58, 213] und Myeloperoxidase [15, 185, 213] bei Mäusen und Ratten.

Darüber hinaus wird der antioxidative Effekt von Melatonin im Tiermodell der Expressionsminderung der iNOS (vermittelt über die Inhibition des NFκB-Stoffwechselweges) zugeschrieben [66, 221]), was zu einem Absinken der Nitrit- und Nitratkonzentration führt [66, 143, 193, 213, 247, 249] und die ATP-Bildung normalisiert [135].

Weiterhin wurde die günstige Beeinflussung des mitochondrialen Glutathion-Haushaltes und der mitochondrialen Elektronentransportkette bei der Maus nachgewiesen [58]. Diese Effekte auf die mitochondrialen Funktionen können die in der Sepsis gestörte ATP-Bildung begünstigen, welche als mögliche Ursache des MOF diskutiert wird [31]. Hinsichtlich der mitochondrialen Funktion unter Sepsisbedingungen führten Lowes *et al.* Experimente mit LPS behandelten Endothelzellen durch, wobei sich zeigte, dass die Behandlung mit Melatonin das verminderte mitochondriale Membranpotential und den Verlust von Glutathion *in vitro* zumindest teilweise ausgleichen konnten [136]. Ebenso wurde die angestiegene metabolische Aktivität und die erhöhte Zytokin-Expression in den LPS-stimulierten Endothelzellen durch Melatonin vermindert [136].

Diskutiert wird, dass dieses große Feld des antioxidativen Effekts von Melatonin auch bei der Verbesserung der Überlebenszeit nach Sepsis im Tiermodell eine Rolle spielt, zumal wie oben beschrieben, mehrfach bei Schwerkranken ein Melatonindefizit nachgewiesen wurde [156, 157, 164, 171, 215], was mithin eine Ursache des oxidativen Stresses und infolgedessen auch der Sterblichkeit sein könnte [76]. Perras *et al.* zeigten eine negative Korrelation von nächtlicher Melatoninkonzentration und Krankheitsschwere der Sepsis [179]. Auch bei Neugeborenen, die vermehrtem „oxidativem Stress“ ausgesetzt sind, wurden positive Effekte von Melatonin gezeigt [70]. Allerdings weisen Kinder mit Sepsis – im Gegensatz zu Erwachsenen – nicht den reduzierten Melatoninspiegel im Vergleich zu Gesunden auf [9].

Aber auch weitere Wirkungsmechanismen von Melatonin in der Sepsis sind Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. So konnte in Tiermodellen gezeigt werden, dass Melatonin einen antiapoptotischen Effekt hat [32, 193, 249]. Darüber hinaus zeigten Untersuchungen

bei der Ratte auch Effekte von Melatonin in der Sepsis in Form einer Reduktion der Neutrophileninfiltration in Leber- und Lungengewebe [247, 249], reduzierter Hyporeaktivität gegenüber Katecholaminen [249], Senkung der Prostaglandinproduktion in Makrophagen [66] und günstiger Beeinflussung des Lungenödems [213]. Auch eine Reduktion der Serumparameter für Leber- (GPT und GOT), Nieren- (Kreatinin, Harnstoff) und Zellschaden (LDH) wurde festgestellt [249].

Zusammenfassend ist an dieser Stelle zu sagen, dass Melatonin positive Effekte bei septischen Krankheitsbildern unterschiedlicher Genese hat, was unter anderem durch verschiedene Mechanismen wie Immunmodulation oder direkte / indirekte antioxidative Effekte vermittelt wird.

### **2.2.3 Problem der Melatoninindosierung / Dosisfindung**

In den zahlreichen Studien zur Untersuchung der Melatoninwirkung wurde die Applikation der Substanz z.T. sehr unterschiedlich durchgeführt. Dies betrifft sowohl die Applikationswege (intravenös, intraperitoneal, subcutan, oral), die Applikationszeitpunkte und –dauer sowie die verwendeten Konzentrationen. So bewegen sich die applizierten körperrgewichtbezogenen Mengen von Melatonin in verschiedenen tierexperimentellen Studien im Bereich von mehreren Zehnerpotenzen (zwischen 100 µg/kg KG [145, 222] und 100 mg/kg KG [216]). Fraglich ist, ob hohe Melatoninindosierungen auch schädlich sein können. Hierzu wurden bereits toxische Effekte einer Melatoninindosis von 10 mg/kg KG (orale Applikation bei der Ratte) auf peritoneale Makrophagen beschrieben, dies allerdings bei einer Kombinationstherapie von Melatonin oral und Dehydroepiandrosteron (DHEA) s.c. [128]. Darüber hinaus sind bislang keine bedeutsamen schädlichen Effekte von Melatonin bekannt.

Wenige pharmakologische Studien haben sich bisher mit der Optimierung der Melatoninindosierung beschäftigt. So wurde schon 1984 von Waldhauser *et al.* die Plasmakonzentration nach oraler Einmalgabe von 80 mg Melatonin beim Menschen untersucht. Diese lag mit großen interindividuellen Unterschieden bei den Probanden 60-150 min nach Einnahme im Bereich der 350- bis 10.000-fachen physiologischen Konzentration bei Nacht [234].

Von DeMuro *et al.* wurde die Bioverfügbarkeit von Melatonin nach Applikation von 2 mg i.v. und von 2 mg oral beim Menschen untersucht. Es zeigte sich, dass die Bioverfügbarkeit des oral verabreichten Melatonins bei nur 15 % liegt, als Ursache dafür wird ein hoher

First-Pass-Effekt der Leber diskutiert [53]. Mistraletti *et al.* zeigten 2010, dass oral verabreichtes Melatonin bei Intensivpatienten eine zufriedenstellende Bioverfügbarkeit bei unveränderter intestinaler Resorption zeigt, während die Plasmaverschwinderate bei Intensivpatienten geringer war als bei Gesunden [156]. Es wurden bei diesen Patienten nach oraler Gabe von 3 mg maximale Plasmakonzentrationen festgestellt, die um das zehnfache höher waren als bei Patienten der gesunden Kontrollgruppe [156].

Bourne *et al.* beschrieben, dass Melatonin in Dosen zwischen 1-2 mg oral ausreicht, um therapeutische Effekte bei Schlafstörungen von Intensivpatienten zu erreichen und dass 10 mg oral zu supraphysiologischen Plasmaleveln bei Intensivpatienten führen [19]. Brzezinski beschrieb, dass orale Gaben von 3-5 mg bei gesunden Probanden zu Plasmakonzentrationen bis zu 100 nM führen, was etwa dem hundertfachen der physiologischen Plasmakonzentration bei Nacht entspricht [27]. Auch er postuliert, dass die Plasmaspiegel zum Erreichen antioxidativer Effekte wohl höher sein müssten, als dies zur Behandlung von Schlafstörungen nötig ist [27].

Bezüglich des Wirkungsbereiches von Melatonin bei intravenöser Applikation gibt es bisher nur wenige verlässliche Daten. Ebenso ist weitgehend unbekannt, ob die vielfach gezeigten therapeutischen Effekte von Melatonin überhaupt eine wesentliche Dosisabhängigkeit aufweisen. Maestroni *et al.* konnten 1996 bei LPS-stimulierten Mäusen zeigen, dass die subcutane Injektion von Melatonin das Überleben verbessert und hierzu eine Dosisabhängigkeit nachweisen, die eine optimale Dosis von 5 mg/kg KG zur Verbesserung des Überlebens der Tiere zeigte [143].

Auf molekularbiologischer Ebene wurde lediglich in einer aktuellen Studie in einem Zellkulturmodell mit LPS-stimulierten humanen Endothelzellen eine Dosisabhängigkeit des Effekts von Melatonin auf die NFκB-Aktivierung gezeigt [136]. Die Einflüsse von Melatonin auf IL-6 und IL-8 Produktion, auf den Glutathionhaushalt, auf das mitochondriale Membranpotential sowie auf die metabolische Aktivität der Zellen zeigten hier keine Dosisabhängigkeit [136].

#### **2.2.4 Protektive Mechanismen und Signalwege von Melatonin**

Die protektiven Mechanismen der Melatoninwirkung und die Signalwege von Melatonin sind Gegenstand zahlreicher Studien (vgl. hierzu auch Kapitel 2.2.2). Es werden hier sowohl rezeptorabhängige und rezeptorunabhängige Signalwege des Melatonins diskutiert, wobei die antioxidative Wirkung oft getrennt davon betrachtet wird. Gezeigt werden konnte,

dass Melatonin seine Wirkungen auch über membranständige, G-Protein-gekoppelte Rezeptoren vermittelt [107, 162]. Mehrfach postuliert wurde, dass die Wirkung über diese Rezeptoren günstige Effekte des Hormons auf periphere Organe zu vermitteln scheint [151]. Außerdem vermittelt Melatonin seine Wirkungen über die Beeinflussung der Proteinkinase A, Phospholipase C, verschiedene mit NFκB-assoziierte Transkriptionsfaktoren und den ERK-MAPK-Signalweg [140]. Darüber hinaus vermag es auch *in vitro*, nicht rezeptorvermittelt, einige Zielstrukturen wie beispielsweise die Proteinkinase C direkt zu beeinflussen [6].

Allerdings hängen die zellspezifischen Signalwege auch von der Expression und lokalen Verteilung der Rezeptoren ab, die wiederum von dem lokalen Metabolismus beeinflusst werden [82].

#### **2.2.4.1 Rezeptorabhängige Signalwege**

Bei den rezeptorabhängigen Signalwegen des Melatonins wird dem CREB-Signalweg eine Funktion zugeschrieben, da hier über einen Pertussistoxin sensitiven Weg die Funktion der PKA und verschiedener Phosphatasen inhibiert wird, was sich sowohl *in vivo* als auch *in vitro* zeigte [64, 71]. Auch die Aktivierung des PLC-Signalwegs scheint hier bezüglich der Melatonineffekte beteiligt, da diese die Phosphatase-Aktivität (bei der Ratte) von Calcineurin beeinflusst [63]. Aber nicht nur G-Protein abhängige Rezeptoren, auch Mitglieder der MAPK-Familie scheinen für die funktionelle Pleiotropie von Melatonin eine Rolle zu spielen. Hier repräsentiert der ERK-MAPK-Signalweg bei diversen Zellkulturmodellen wichtige Komponenten des Melatoninsignalwegs bei oxidativem Stress [119, 139, 255], ebenso wie die stressaktivierte Proteinkinase JNKs [34].

Darüber hinaus werden weitere intrazelluläre Signalwege diskutiert, so zum Beispiel über die Proteinkinase B [38], oder den spannungsgesteuerten Kaliumkanal GIRK [165]. Auch eine Beeinflussung des Melatoninsignals durch Interaktion der Rezeptoren untereinander wurde beschrieben [51].

#### **2.2.4.2 Rezeptorunabhängige Signalwege**

Neben der Interaktion von Melatonin mit membranständigen Rezeptoren kann das Pinealhormon auch frei mit und durch Zellmembranen interagieren [44], um subzelluläre Strukturen und den Zellkern zu erreichen [154], was *in vitro* und bei der Ratte gezeigt wurde. Hieran beteiligt ist die Bindung zu nukleären Rezeptoren der Familie der RORs und RZR. So schützt beispielsweise die Bindung an einen ROR vor Apoptose durch Inhibition der Fas-Ligand Expression [88]. Darüber hinaus liegt hier ebenso ein Angriffspunkt der

Beeinflussung von NFκB durch Melatonin, da NFκB u.a. von ROS gesteuert wird [46]. ROS, wie beispielsweise RORα, können *in vitro* die metabolische Adaptation unterstützen und das Zellüberleben günstig beeinflussen [116].

Weiterhin ist eine Beeinflussung der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) durch Melatonin sowohl bei der Ratte als auch *in vitro* einerseits über Ca-Calmodulin abhängige Mechanismen [169, 186], andererseits *in vitro* über PLA2 / Lipoxygenase-Signalwege [186, 187] beschrieben. Diese ROS-Produktion wird allerdings nicht im Sinne einer pathologischen Wirkung als Radikal, sondern im Sinne einer physiologischen ROS-Konzentration in der Funktion eines *second messengers* beschrieben [46]. Nachgewiesen wurde in Zellkulturmodellen, dass Melatonin zumindest teilweise die stressabhängige mitochondriale ROS-Produktion unterbindet [139] und die physiologische Signalwirkung der ROS stärkt [187]. Die Beeinflussung des intrazellulären Redoxhaushaltes durch Melatonin scheint *in vitro* auch die Aktivität verschiedener Phosphatasen zu beeinflussen, die mit dem MAPK-Signal über ERK1/2 Signalwege [131], bzw. die mit dem JNK Signalweg [110] assoziiert sind. Unabhängig davon scheinen die physiologischen ROS in Zellkulturen diverse Phosphatasen, darunter auch Mitglieder der Ppp1- und Ppp2- Familie, zu beeinflussen [161, 202].

### 2.2.4.3 Signaleffekte der antioxidativen Melatoninwirkung

Bei den antioxidativen Fähigkeiten von Melatonin sind sowohl direkte als auch indirekte Effekte durch Expressionssteigerung antioxidativer Enzyme beschrieben. Hierzu wurden verschiedene *in vitro* Untersuchungen durchgeführt und auch in den gängigen *in vivo* Stressmodellen die antioxidativen Eigenschaften untersucht.

Auf intrazellulärer Ebene wurde gezeigt, dass Melatonin *in vivo* der Akkumulation von Markern für DNA-Schaden bei oxidativem Stress vorbeugt [146]. Wichtige Faktoren im Zusammenhang mit der oxidativen Funktion von Melatonin und der melatoninabhängigen, intrazellulären Signalwirkung sind im Zellkulturmodell oxidationsabhängige, posttranslationale Modifizierungen, und insbesondere die Bildung von Protein-Carbonylen und Addukten der reaktiven Lipoxidase [245]. So wurde beschrieben, dass die Bildung von Protein-Carbonylen durch Melatonin verhindert werden kann, was bei der Ratte und in der Zellkultur Folgen für die mitochondriale Protektion und NFκB Signalwege hat [23, 149, 189].

Unabhängig von mitochondrialen Mechanismen wird beispielsweise die melatonininduzierte Expression von Gamma-Glutamylcystein-Synthase, die in die

Biosynthese von GSH eingebunden ist [231], nach Ergebnissen aus Zellkulturuntersuchungen mit dem protektiven Effekt von Melatonin auf Zellen mit prooxidativem Stress in Verbindung gebracht [92]. Die Induktion der GSH-Produktion wird auch als Ursache für die potentere Wirkung von Melatonin im Vergleich mit anderen Antioxidantien (z.B. Vitamin C, Vitamin E) gesehen [148]. Im einem *in vivo* Modell bei der Ratte konnte gezeigt werden, dass Melatonin die Expression der antioxidativen Hämoxxygenase 1 verstärkt [236] und iNOS, MAPK und NFκB-Aktivierung inhibiert [174], denen auch eine Funktion in der Pathophysiologie der Sepsis zugerechnet wird (vgl. Kapitel 2.1.2).

Auch wenn trotz zahlreicher Studien die zellprotektiven Mechanismen von Melatonin noch weitestgehend unklar sind, so geben verschiedene Studien Hinweise darauf, dass diese Mechanismen die Hauptkomponenten der „Selbstverteidigungsmaschinerie“ der Zelle einzuschließen scheinen [140].

Als wichtige Komponente wird die Reduktion der NFκB-Bindung an die DNA angesehen, was *in vitro* der nukleären Translokation vorbeugt [159]. Dies führt dazu, dass dieser Transkriptionsfaktor seine regulatorische Wirkung nicht mehr entfalten kann. NFκB reguliert eine Vielzahl von Genen, die in die Immun- und Entzündungsantwort involviert sind, was in zahlreichen Studien gezeigt wurde (z.B. TNF-α, IL-2, IL-6, iNOS) [140]. Eine Inhibition der Expression solcher Gene wird deshalb als zentraler Faktor der Protektion gegen Entzündungsmediatoren und ROS diskutiert [191]. Auch antiapoptotische Signalwege von Melatonin *in vitro* werden mit einer veränderten ROS-Produktion und einer Beeinflussung von NFκB assoziiert [46]. Die Aktivierung von NFκB beeinflusst wohl auch die Entscheidung, ob in der Zelle ein anti- oder ein proapoptotischer Signalweg eingeschlagen wird [140]. Neben Melatonin selbst werden nach Untersuchungen im Tiermodell auch seine Metaboliten bezüglich der Auswirkung auf die zelluläre Protektion in Betracht gezogen [211].

Weiterhin werden in verschiedenen Studien zentrale Faktoren der Melatoninwirkung auch die Beeinflussung des intrazellulären Redoxhaushaltes, die protektive Wirkung auf Mitochondrien sowie die Beeinflussung von Kinasen und Phosphatasen diskutiert, die allesamt wohl eine wichtige Rolle in der Signalwirkung des Melatonins spielen. Insbesondere die speziellen intrahepatischen Mechanismen, die der mehrfach gezeigten Organprotektion der Leber zugrunde liegen, sind aber bisher weitestgehend ungeklärt, auch wenn hier ebenfalls eine Beteiligung von NFκB [109] oder des Glutathionsystems [41,

100, 152] vermutet wird. Bekannt ist allerdings die generelle Eigenschaft von Melatonin, in die Regulation zahlreicher intrahepatischer Stoffwechselwege einzugreifen, was diverse Studien sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zeigen konnten [56, 151]. Ebenso ist durch zahlreiche Studien belegt, dass das Hormon einen starken Einfluss auf die hepatische Genexpression hat [33, 45, 72, 153, 177, 197].

#### **2.2.4.4 Kandidatengene**

Zur Analyse möglicher Endpunkte der Melatoninrezeptor-vermittelten Organprotektion wurden Ergebnisse einer Whole-Genome-Microarray-Analyse herangezogen, die umfassende Expressionsänderungen in Lebergewebe von Ratten nach hämorrhagischem Schock und Melatonintherapie zeigen [150]. Obwohl sich die molekularen Mechanismen nach hämorrhagischem Schock möglicherweise von denen nach septischem Schock unterscheiden, besteht dennoch die Möglichkeit, dass die Aktivierung von Melatoninrezeptoren unabhängig vom Schockmodell ähnliche Expressionsänderungen zur Folge hat. Aus den Microarray-Ergebnissen, die bereits mittels RT-qPCR verifiziert waren, wurden zwei Gene ausgewählt (ATF3, Transkriptionsfaktor; Ppp1r15a, Proteinphosphatase), bei denen bereits ein modulierender Effekt durch eine Melatonintherapie nach hämorrhagischem Schock gezeigt werden konnte. Diese beiden Gene sollten im Rahmen dieser Arbeit auf ihre Expression im septischen Schockmodell untersucht werden.

#### **2.2.4.5 ATF3**

Der erstmals 1989 beschriebene aktivierende Transkriptionsfaktor 3 (ATF3) gehört zur Familie der „ATF / cAMP response element binding proteins (CREB)“ mit einer Leucin-Zipper Domäne, über die *in vitro* die Bindung an die „cAMP response sequences“ oder an andere CREB-Transkriptionsfaktoren erfolgt [79, 117]. Der Transkriptionsfaktor gilt als stressinduzierter Faktor [117, 138] bzw. als Teil der „adaptiven Antwort“ der Zelle auf extra- oder intrazelluläre Veränderungen [138]. Seine Regulation und Wirkungsweise ist sehr komplex und bis heute noch nicht restlos verstanden. Seine zumeist inhibitorische Wirkung beeinflusst bei der Maus unter anderem die Regulation von Apoptose / Zellzyklus und der Immunmodulation [256], wobei ATF3 seine Wirkung als Homo- oder Heterodimer (z.B. mit JunB, c-Jun oder c-FOS) entfalten kann. Auch eine Stabilisierung von inhibitorischen Co-Faktoren an der DNA durch ATF3 ist im Zellkulturmodell beschrieben [36].

Induziert wird ATF3 über verschiedene Stimuli, was sowohl *in vitro* als auch in verschiedenen Tiermodellen gezeigt wurde (Stresssignale [37, 84], Signale für Proliferation und Motilität [138], Zytokine [137], mechanische Beeinflussung [83] oder DNA-Schäden [59]), wobei die Aktivierung von Toll-like-Rezeptoren (TLR), zum Beispiel durch IFN- $\gamma$  eine große Rolle spielt [95, 184, 240]. Transkriptionell wird ATF3 unter anderem durch p38 MAPK [138], JNK und ERK-abhängige Signalwege reguliert [84, 102, 129, 252]. Schon 1994 wurde *in vitro* gezeigt, dass ATF3 einem alternativen Splicing unterliegt, woraus eine zweite Isoform hervorgehen kann (ATF3deltaZip2), der die Leucin-Zipper Domäne fehlt und die somit nicht an die DNA binden kann [36]. Diese zweite Isoform wird als physiologischer Regulator angesehen, da ATF3deltaZip2 sowohl die Aktivität des „full-length“ ATF3, aber auch anderer Transkriptionsfaktoren beeinflussen kann, indem es den Zugang von inhibitorischen Co-Faktoren zur DNA verhindert [36, 86]. Bezüglich der Autoregulation ist bekannt, dass ATF3 seinen eigenen Promotor zu reprimieren vermag [244].

Die immunmodulatorische Funktionsweise von ATF3 beinhaltet viele Faktoren, beispielsweise eine direkte Wirkung auf die Expression von Zytokinen oder inhibitorische Einflüsse auf die Interleukinproduktion [67, 240]. Aus der veränderten Expression von immunmodulatorischen Faktoren, wie TNF- $\alpha$  und diversen Chemokinen, resultiert darüber hinaus auch eine indirekte Regulation der Immunfunktion [115, 240]. Bezüglich der Immunmodulation wird auch eine protektive Wirkung von ATF3 bei akuten inflammatorischen Syndromen diskutiert [67].

Im Zusammenhang mit Apoptose und Zellzyklus werden verschiedene Mechanismen der Signalwirkung diskutiert: So ist die Regulation der Hif2 $\alpha$ -Expression nachgewiesen, die ihrerseits eine Induktion proapoptotischer Gene, wie Caspase7 oder TRAIL10 (tumor necrosis factor ligand family, member 10) bewirkt [230]. Weiterhin ist die Beeinflussung von p53-Signalwegen durch ATF3 sowohl *in vitro* als auch bei der Maus beschrieben [59, 235, 251, 254]. Aber auch die Interferon-abhängige Proteinkinase PKR spielt bei Apoptosewegen im Zusammenhang mit dem Transkriptionsfaktor eine Rolle [74]. Darüber hinaus ist bekannt, dass ATF3 diverse NF $\kappa$ B-abhängige Gene reguliert und hierüber neben der beschriebenen Immunmodulation in die Regulation von Zellzyklus und Apoptose involviert ist [59, 113, 117].

Von Relevanz bezüglich der Signalwirkungen von ATF3 im Zusammenhang mit oxidativem Stress ist die Beeinflussung von AP-1 [35]. Dieser Transkriptionsfaktor beeinflusst die Genexpression bei vielen Zell-Stimuli (z.B. durch Zytokine, Wachstumsfaktoren oder Stress)

und steuert so zelluläre Prozesse einschließlich Differenzierung, Proliferation und Apoptose, was in diversen Modellen gezeigt wurde [5, 91]. Ebenso wird die Beeinflussung (direkte Protein-Protein-Interaktion) des Transkriptionsfaktors Nrf2, der seinerseits viele „stress-response“-Gene induziert, als Mechanismus für stress-assoziierte Effekte von ATF3 diskutiert [22].

Im Zusammenhang mit der Expression und Funktion von ATF3 in der Leber liegen nur wenige Studienergebnisse vor, auch wenn bereits 1991 eine induzierte ATF3-Expression in regenerierender Rattenleber beschrieben wurde [99]. Chen *et al.* zeigten 1996, dass ATF3 bei mechanisch oder toxisch geschädigter Leber vermehrt exprimiert wird [37]. Auch eine hepatoprotektive Wirkung bei CMV-Infektion bei der Maus wurde nachgewiesen [201]. Weiterhin beschrieben Allan *et al.* 2001, dass die Expression von ATF3 in Hepatozyten während Zellwachstumsprozessen verstärkt ist und eine hepatozelluläre Proliferation stimuliert [1]; Ursache hierfür sei eine ATF3-abhängige Aktivierung der Zyklin D1 Expression [1]. Weiterhin wurde bei der Maus gezeigt, dass der Transkriptionsfaktor die hepatische Glukoneogenese blockiert [2].

Aufgrund der sehr unterschiedlichen und teilweise gegenteiligen Effekte der ATF3-Aktivierung auf Zellzyklus und Apoptose kam es in der Vergangenheit oft zu kontroversen Diskussionen bezüglich der genauen Funktion des Proteins. Inzwischen wird die These postuliert, dass der Transkriptionsfaktor keine einheitlich definierbare Funktion hat [77], sie vielmehr von der Präsenz bzw. Absenz von anderen ATF / CREB abhängt [226].

In vielen Szenarien sowohl im Tiermodell als auch in der Zellkultur scheinen insgesamt die vermeintlich proapoptotischen und somit negativen Eigenschaften (oxidativer Stress, allergische Reaktionen, Infektionen etc.) zu überwiegen [68, 78, 201, 230, 235, 239].

#### **2.2.4.6 Ppp1r15a / GADD34**

Die „Protein Phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 15A“ (Ppp1r15a), oder auch „Growth arrest and DNA damage inducible Protein 34“ (GADD34) ist ein Gen, dessen Induktion eine zelluläre Antwort auf Stress darstellt, die mit Apoptose korreliert [96, 210]. Diese Induktion erfolgt unabhängig vom p53-Signalweg [96, 210]. Seine Funktion ist in diversen Zellkulturmodellen untersucht, allerdings bislang kaum *in vivo*. Das Protein vermittelt einen Wachstumsstopp und Apoptoseeintritt bei DNA-Schaden, negativen Wachstumssignalen (zum Beispiel durch Hitzeschockproteine [85]), oxidativem Stress [120, 170] und Fehlfaltung von Proteinen („endoplasmatischer Retikulum-Stress“) [248]. Hierzu bindet Ppp1r15a im endoplasmatischen Retikulum (ER) an die katalytische

Untereinheit der Proteinphosphatase 1 (PP1) und vermittelt darüber eine Dephosphorylierung des „eukaryotischen Translations-Initiationsfaktors 2 alpha“ (eIF2 $\alpha$ ) und in Folge eine verminderte translationale Elongation von Schlüsseltranskriptionsfaktoren [25, 166, 248]. Die Phosphorylierung von eIF2 $\alpha$  führt somit zu einer globalen Inhibition der Proteinsynthese [118]. Darüber hinaus vermag Ppp1r15a auch an andere Proteine zu binden, die ihrerseits die PP1 beeinflussen [97]. Hierzu wurde beispielsweise ein Zusammenhang mit dem PKA-Signalweg beschrieben [42]. Weiterhin scheint das Protein auch in die p53-Signalkaskaden einzugreifen, da die Modulation von p53 durch die PP1 von GADD34 beeinflusst ist [80, 250]. Als Induktionsmechanismus für die Ppp1r15a selbst wurde der p38 MAPK Signalweg vermutet [170, 205]. Weiterhin ist der Transkriptionsfaktor ATF4 in diese Induktion involviert [120, 142]. Als Antwort auf zellulären Stress steigt die zelluläre Konzentration von Ppp1r15a schnell an, fällt aber bei Regeneration der Zelle auch rapide wieder ab [26]. In diesem Zusammenhang scheint das 26S Proteasom eine Rolle zu spielen [26]. Die Regulation des Proteins bei zellulärem Stress erfolgt nicht ausschließlich durch transkriptionelle Induktion, sondern auch durch translationale Regulation in Form einer bevorzugten Verbindung mit Polysomen [130]. Gezeigt wurde ebenfalls, dass eine selektive Inhibition des eIF2 $\alpha$  dephosphorylierenden Komplexes die Zelle vor den Folgen von ER-Stress bewahren kann [20, 167]. Insgesamt kontrolliert Ppp1r15a einen programmierten Umstieg von translationaler Repression zu stress-induzierter Genexpression [108, 167]. Allerdings hängen die Signale, die die GADD-Mitglieder der Zelle liefern, auch davon ab, in welchem Stadium des Zellzyklus sie sich zum Zeitpunkt des Schadens befindet [103].

Durch die Hochregulation von Ppp1r15a bei Ischämie (untersucht wurde ischämisches Hirngewebe von Menschen) und seinen Effekten auf DNA-Reparatur und Proteinsynthese wurde bereits ein Einfluss des Gens auf das Überleben der Zelle vermutet [238].

### 2.3 Ziele der Arbeit

Die polymikrobielle Sepsis nach sekundärer Vierquadrantenperitonitis ist eine der häufigsten Formen der Sepsis, und Melatonin zeigt in tierexperimentellen Studien einen positiven Effekt auf das Überleben im Rahmen septischer Krankheitsbilder. In der Literatur finden sich jedoch Melatoninindosierungen im Bereich mehrerer Zehnerpotenzen. Deshalb sollte im Rahmen dieser tierexperimentellen Studie zunächst ein optimaler Dosisbereich für die Therapie der polymikrobiellen Sepsis bzw. des septischen Schocks bei einer Einmalapplikation von Melatonin i.v. gefunden werden.

Um die transkriptionellen Endpunkte einer Melatonintherapie besser charakterisieren zu können, wurden zwei Kandidatengene (ATF3 und Ppp1r15a) ausgewählt, deren hepatische Expressionsänderung nach Melatonintherapie bereits für den hämorrhagischen Schock beschrieben wurde. Diesbezüglich sollten folgende Fragestellungen überprüft werden:

- 1) Ändert sich die Expression dieser Gene auch im Rahmen eines septischen Schocks,
- 2) kann eine Änderung durch Melatonin in verschiedenen Dosisbereichen erzielt werden und
- 3) besteht ein Zusammenhang zwischen der Überlebenszeit der Tiere und der hepatischen Expression der ausgewählten Gene?

Somit sollte eine mögliche Rolle der transkriptionellen Beeinflussung der Gene durch Melatonin in der günstigen Wirkung auf die Organfunktion der Leber und die Überlebenszeit der Tiere untersucht werden.

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1 Tierexperimenteller Teil**

##### **3.1.1 Versuchstiere**

Alle Tierversuche wurden nach Genehmigung durch die zuständige Tierschutzkommission (Nr. 42/2010) gemäß den Bestimmungen des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt. Als Versuchstiere wurden insgesamt 75 männliche Sprague-Dawley-Ratten eingeschlossen (Charles River (WIGA) GmbH, Sulzfeld), die zum Zeitpunkt der Präparation ca. zwölf Wochen alt waren und ein Körpergewicht von 200-350 g hatten. Bis zum Versuchsbeginn wurden die Tiere in der Abteilung für Klinisch-Experimentelle Chirurgie des Universitätsklinikum des Saarlandes (Direktor: Prof. Dr. med. Michael D. Menger), Homburg / Saar gehalten. Die Tiere waren auf einen Tag-Nacht-Rhythmus von Licht / Dunkelheit 12:12 Stunden eingestellt. Sie erhielten bis zum Vorabend der Versuche Nager-Standard-Diät sowie bis zum Präparationsbeginn Wasser ad libitum.

##### **3.1.2 Narkoseeinleitung und intraoperative Lagerung der Tiere**

Unter inhalativer Kurzarkose mit Sevofluran (Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim) erfolgte die intraperitoneale Gabe von Pentobarbital. Die Pentobarbitallösung (Pentobarbital-Natrium "Narcoren", 16 g/100 ml, Merial GmbH, Hallbergmoos) wurde hierfür 1:3 mit isotoner Kochsalzlösung (NaCl 0,9 %, B. Braun Melsungen AG, Melsungen) verdünnt und von dieser Verdünnung 1 ml/kg KG (entspricht ca. 53 mg/kg KG) verabreicht. Anschließend wurde der Wirkungseintritt der Pentobarbital-Narkose bei erhaltener Spontanatmung abgewartet.

In tiefer Sedierung wurden die Tiere gewogen (Waage Kern 470, Gottl Kern & Sohn GmbH, Albstadt), anschließend auf eine beheizte Aluminiumplatte gelegt und bei leicht rekliniertem Kopf in Rückenlage an Kopf, Schwanz und Extremitäten mittels Pflasterstreifen fixiert (Abb. 3).

Die Überwachung der Körpertemperatur erfolgte durch kontinuierliche rektale Messung. Mittels beheizter Unterlage und Lichtquelle (40 W, ca. 20 cm oberhalb des Tieres) konnte die Körpertemperatur der Tiere annähernd konstant bei 37 °C gehalten werden.

Die Aluminiumplatte wurde über eine direkt unterhalb angebrachte elektrische Heizmatte (Terra Plus Comfort Heat Mat, Eurozoo e.K., Geilenkirchen) erwärmt. Deren Temperatur

wurde mittels Temperaturfühler und Thermostat (Universal Thermostat, Conrad Electronic SE, Hirschau) konstant gehalten.

### 3.1.3 Chirurgische Präparation

Die chirurgische Präparation beinhaltete Tracheal- und Gefäßpräparation sowie mediane Laparotomie mit anschließender Coecumligatur und -inzision.

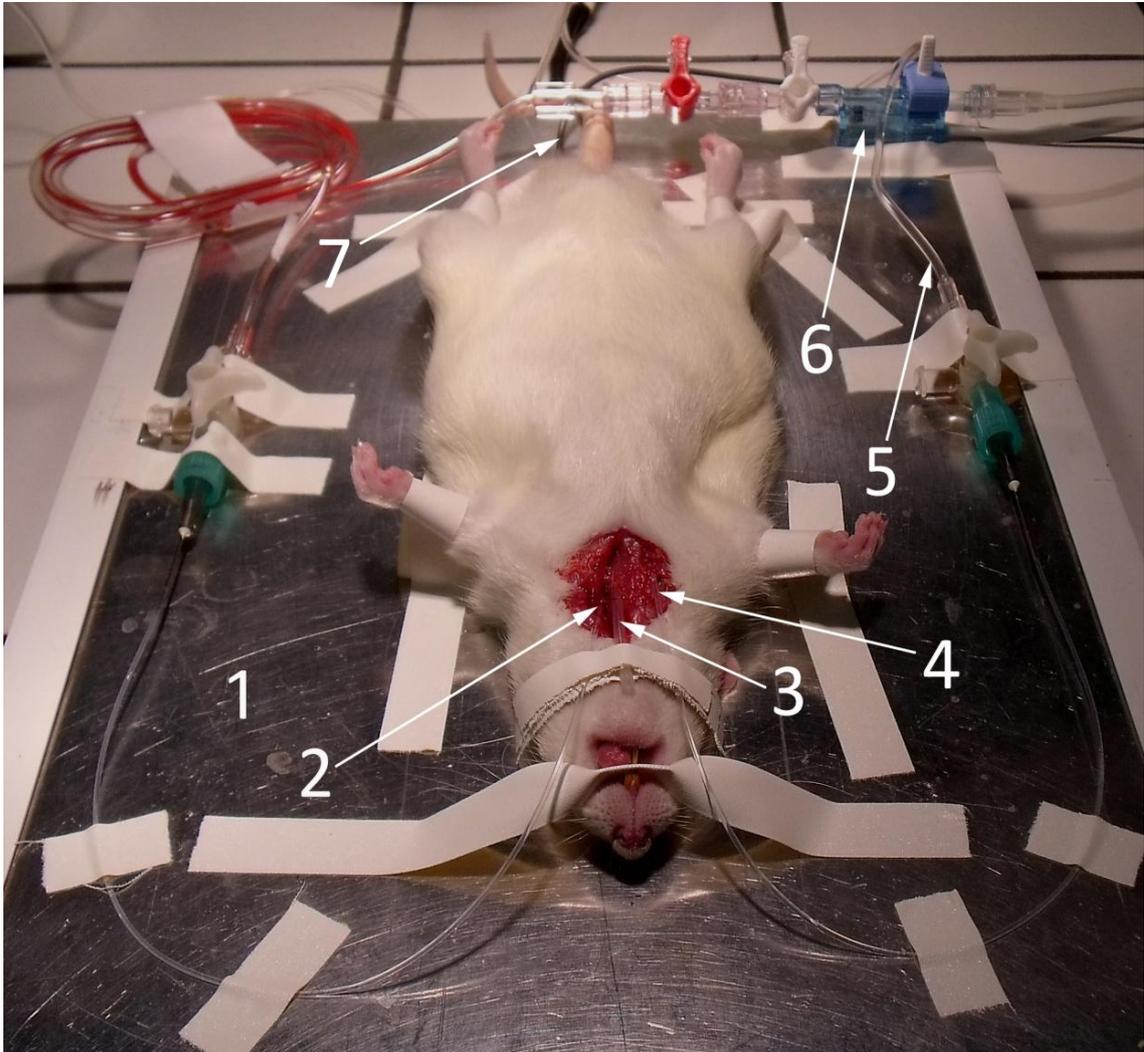
Zu Beginn der Präparation von Trachea und Gefäßen erfolgte ein ca. 1,5 cm langer, medianer Hautschnitt von *Mandibula* bis zum *Manubrium sterni*.

Die Trachea wurde nach Mobilisation der *Gl. submandibulares* und der prätrachealen Muskulatur stumpf frei präpariert und mit einer Querinzision eröffnet. Anschließend erfolgte zur Sicherung des Atemwegs die Platzierung eines Tracheostomas mittels eines ca. 4 cm langen Kunststoffkatheters (Fine-Bore Polythene Tubing, ID 1,67 mm OD 2,42 mm, Smith Medical ASD, Keene, New Hampshire, USA), der mit zwei Fäden cranial und caudal der Trachealinzision fixiert wurde.

Nun erfolgte die Darstellung der rechten *Vena jugularis interna*, in die nach cranialer Ligatur und Eröffnung des Gefäßes ein Kunststoffkatheter (Fine-Bore Polythene Tubing, ID 0,58 mm OD 0,96 mm, Smith Medical ASD, Keene, New Hampshire, USA) eingelegt wurde, der ebenfalls cranial und caudal der Einschnittstelle fixiert wurde. Nach Anlage des zentralen Venenkatheters (ZVK) wurde ein Perfusorsystem (Perfusor Secura FT, B. Braun Melsungen AG, Melsungen) angeschlossen, über das während des gesamten Versuchs kontinuierlich Vollelektrolytlösung (10 ml/kg KG/h Sterofundin ISO, B. Braun Melsungen AG, Melsungen) verabreicht und so der Flüssigkeitsbedarf des Tieres gedeckt wurde. Die Aufrechterhaltung der Allgemeinanästhesie erfolgte durch intermittierende, bedarfsadaptierte Bolusgaben von Pentobarbital über den zentralvenösen Zugang.

Anschließend wurde die *Arteria carotis communis sinistra* nach stumpfer Präparation und vorsichtiger Eröffnung der *Vagina carotica* dargestellt. Der *Nervus vagus* wurde schonend von der *A. carotis communis* separiert und anschließend ebenfalls ein Kunststoffkatheter (Fine-Bore Polythene Tubing, ID 0,58 mm OD 0,96 mm, Smith Medical ASD, Keene, New Hampshire, USA) in das Gefäß eingeführt, der mit zwei Fäden cranial und einem Faden caudal der Inzisionsstelle fixiert wurde. Über diesen Katheter, der über ein Druckabnehmersystem (BD DTXPlus™ Einfach-Druckwandler-Set, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey, USA) mit dem Überwachungsmonitor (Monitor Hewlett Packard M1166A, Model 66S, Hewlett-Packard Company, Palo Alto, Kalifornien,

USA) verbunden war, erfolgte nun die kontinuierliche Überwachung des mittleren arteriellen Drucks (MAP) und der Herzfrequenz.

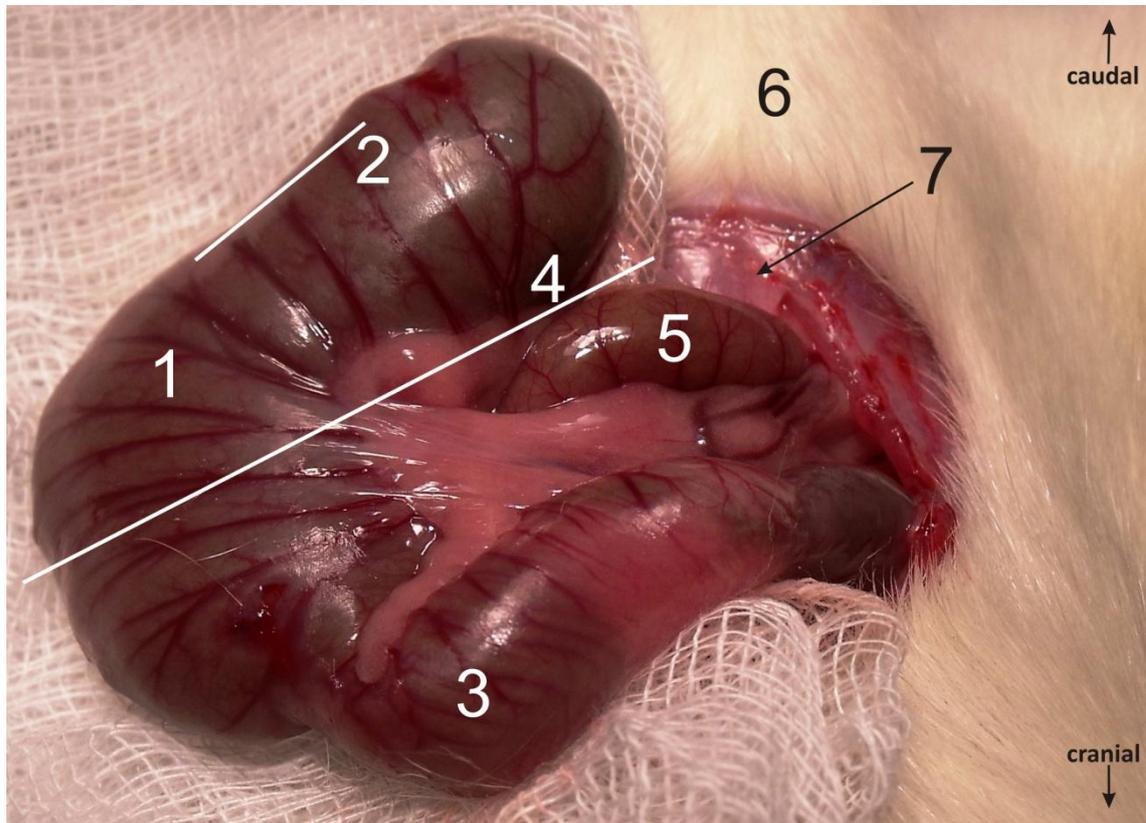


**Abb. 3: Versuchstier nach Gefäßpräparation**

Das Versuchstier wurde nach Wirkeintritt der Pentobarbital-Narkose in Rückenlage auf der Wärmeplatte (1) fixiert, der arterielle Katheter in der A. carotis communis (2) an den Druckabnehmer (6) angeschlossen, die Trachealkanüle (3) zur Atemwegssicherung fixiert, der ZVK in der V. jugularis (4) an die Perfusorleitung (5) angeschlossen. Die Temperatursonde (7) ist rektal eingeführt und ebenfalls mit dem Monitorsystem verbunden.

Nun folgte die Induktion der Sepsis durch CLI. Hierzu wurde das Abdomen über eine mediane Laparotomie eröffnet, das Coecum aufgesucht und vorsichtig mobilisiert (Abb. 4). Nach Ligation des Coecums aboral der Ileocoecalklappe unter Erhalt der Durchgängigkeit der Darmpassage und der Reposition des Darms ins Abdomen erfolgte ein ca. 1,5 cm langer Einschnitt abmesenterial im ligierten Teil des Coecums. Peritoneum und Fell

wurden anschließend schichtweise mit Einzelknopfnähten verschlossen. Die anschließende Medikamentenapplikation gemäß der zugewiesenen Studiengruppe erfolgte über den ZVK.



**Abb. 4: Mobilisiertes Coecum beim Versuchstier**

Das Abdomen wurde in der Linea alba eröffnet, hierzu wurden Fell (6) und Peritoneum (7) durchtrennt. Das Coecum (1) wurde aufgesucht und mobilisiert. Die Ligatur erfolgte entlang der eingezeichneten Geraden (4), die 1,5 cm lange Inzision etwa entlang der Geraden (2). Erkennbar sind hier auch terminales Ileum (5) und Colon ascendens (3).

### 3.1.4 Versuchsgruppen

Die Versuchstiere wurden zufällig in fünf unterschiedliche Versuchsgruppen eingeteilt (Tab. 1)

**Tab. 1: Versuchsgruppen**

Gruppeneinteilung zur Dosis-Wirkungs-Beziehung der Melatonintherapie nach Sepsis durch CLI.

<b>Bezeichnung</b>	<b>Medikation</b>	<b>Anzahl der Tiere</b>
V	Vehikel (EtOH p.a. in NaCl 0,9%)	n= 15
M-0,01	Melatonin 0,01 mg/kg KG	n= 15
M-0,1	Melatonin 0,1 mg/kg KG	n= 15
M-1	Melatonin 1,0 mg/kg KG	n= 15
M-10	Melatonin 10 mg/kg KG	n= 15
Gesamt		n = 75

### 3.1.5 Versuchsprotokoll

Die Therapiegruppen erhielten nach Verschluss des Peritoneums direkt eine gewichtsadaptierte Dosis Melatonin i.v. entsprechend ihrer Versuchsgruppe. Die Vehikel-Tiere hingegen erhielten zum gleichen Zeitpunkt Vehikellösung. Die einmalige Applikation erfolgte unmittelbar nach Verschluss der Peritonealnaht über einen Zeitraum von ca. drei Minuten. Dieser Zeitpunkt der Applikation wurde als Beginn des Beobachtungszeitraums definiert.

Zu Beginn der Sepsisinduktion und im weiteren Verlauf wurden alle 15 min MAP, Herzfrequenz und Körpertemperatur dokumentiert. Die Bestimmung des Hb-Wertes erfolgte zu Beginn der Sepsisinduktion und anschließend alle zwei Stunden. Dazu wurde mit Hilfe einer Kanüle (BD Microlance™ 22 G, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey, USA) die ventrale Schwanzvene der Tiere punktiert und ein Tropfen Blut für die photometrische Messung des Hb mittels Hemocue® B-Hemoglobin Photometer (Hemocue AB, Ängelholm, Schweden) eingesetzt. Der Beobachtungszeitraum umfasste zwölf Stunden. Tiere, die nach diesem Zeitraum noch lebten, wurden euthanasiert (Abb. 5). Festgelegter Todeszeitpunkt war Apnoe der Tiere oder hämodynamische Dekompensation (invasiver MAP nicht mehr messbar). Unmittelbar nach Todeseintritt

erfolgte bei den Versuchstieren eine mediane Laparotomie und die Entnahme der Leber, die in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -75 °C zur späteren molekularbiologischen Analyse aufbewahrt wurde.

Präparation	CLI-Sepsis	Beobachtungszeitraum: 720 min
<b>Narkoseeinleitung</b> mit Sevofluran inhalativ und Pentobarbital i.p.	<b>Sepsis-Induktion</b> durch Coecumligatur und -inzision (CLI)	<b>Therapie entsprechend der Versuchsgruppe:</b> - Vehikel (EtOH p.a. in NaCl 0,9 %) - Melatonin 0,01 mg/kg KG - Melatonin 0,1 mg/kg KG - Melatonin 1,0 mg/kg KG - Melatonin 10 mg/kg KG

**Abb. 5: Zeitlicher Ablauf der Tierversuche**

Zeitlicher Verlauf der Tierversuche zur Dosis-Wirkungs-Beziehung der Melatonintherapie nach Sepsis durch CLI.

### 3.1.6 Medikamente und Medikamentenapplikation

Melatonin wurde als Trockenreinsubstanz bezogen (Apotheke des Universitätsklinikums des Saarlandes, Homburg / Saar), als Stammlösung in EtOH p.a. gelöst und bei -20 °C gelagert (Tab. 2).

Diese Stammlösung wurde täglich entsprechend dem Versuchsplan mit isotoner Kochsalzlösung (NaCl 0,9 %) 1:20 verdünnt (Applikationslösung). Der Ansatz der Applikationslösung war so berechnet, dass 0,33 ml der Lösung pro 100 g KG appliziert wurden.

**Tab. 2: Medikamentenansätze**

Melatoninstammlösungen für die einzelnen Versuchsgruppen

Versuchsgruppe	Stammlösung (Melatonin in EtOH p.a.)
V	EtOH p.a.
M-0,01	0,06 mg/ml
M-0,1	0,6 mg/ml
M-1	6 mg/ml
M-10	60 mg/ml

## 3.2 Molekularbiologischer Teil

### 3.2.1 DNA-Amplifikation mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion wurde 1983 von Mullis entwickelt [163] und in der heutigen Form erstmals 1988 von Saiki beschrieben [204]. Es ist eine heute weit verbreitete und gängige Technik, um DNA-Fragmente *in vitro* zu vervielfältigen. Man benötigt die Sequenzinformation des DNA-Templates, um zwei Oligonukleotidprimer (Forward- und Reverse-Primer, dt. „Vorwärts- und Rückwärts“-Primer) zu synthetisieren, die jeweils komplementär zu den Enden des zu amplifizierenden Fragments sind. Es handelt sich hierbei um Oligonukleotide, die sequenzspezifisch an die DNA-Matrize binden und der DNA-Polymerase als Startpunkt dienen.

Das Verfahren beruht auf der Verwendung thermoresistenter DNA-Polymerasen, die in mehreren Zyklen DNA-Einzelstränge zu Doppelsträngen polymerisieren. Dabei laufen in jedem der 25-40 Amplifikationszyklen drei wichtige Schritte ab: Denaturierung des DNA-Doppelstranges, Anlagern des Primers (Annealing) und Synthese des Komplementärstranges durch Desoxyribonukleotide (Elongation). Die Steuerung der Schritte erfolgt dabei über die Temperatur des Reaktionsansatzes: Bei ca. 95 °C erfolgt die Aufspaltung des Doppelstranges; dann wird die Temperatur auf ca. 50-60 °C reduziert, sodass sich die spezifischen Primer an den Einzelstrang anlagern. Die Elongation, d.h. die Synthese des komplementären Nukleotidstranges durch eine hitzestabile Polymerase (z.B. Taq-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus*) erfolgt bei 72 °C, etwas unterhalb des Temperaturoptimums des Enzyms.

Es kommt im Idealfall zu einer Verdopplung der DNA-Menge nach jedem Zyklus, sodass eine exponentielle Amplifikation stattfindet. [127]

Um eine genaue Steuerung der Thermozyklen zu ermöglichen, wird die PCR in automatischen Thermocyclern durchgeführt. Für diese Arbeit wurden das PCR-Gerät GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer Corporate Headquarters, Massachusetts, USA) und das RT-qPCR-Gerät CFX 96 Real-Time PCR Detection Systems (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Kalifornien, USA) verwendet.

### 3.2.2 Agarose-Gelelektrophorese von Nukleotiden

Nukleinsäuren sind aufgrund ihres Zucker-Phosphat-Rückgrats bei allen pH-Werten negativ geladen. Sie wandern deshalb in einem Gleichspannungsfeld zur Anode, und zwar umso

langsamer, je größer ihr Molekulargewicht ist. Dies macht eine elektrophoretische Trennung bei Gleichspannung entsprechend des Molekulargewichts der verschiedenen Moleküle möglich. Als Lauf-Matrix wird hierfür ein elektrisch neutrales Gel aus Agarose verwendet. Die Agarosekonzentration des Gels ist hierbei nach der DNA-Molekülgröße der aufzutrennenden Fragmente zu wählen. In der vorliegenden Arbeit kamen zur DNA-Gelelektrophorese Gele mit 2 % Agarose in TAE-Puffer und zur RNA-Gelelektrophorese denaturierende Gele mit 1,2 % Agarose in MOPS-Puffer (3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure) mit Formaldehyd (Formaldehyd 37 % p.a., Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) zur Anwendung (vgl. Kapitel 3.2.6).

Nach der Elektrophorese können die Nukleotide unter ultraviolettem Licht (Wellenlänge 254 nm) mittels Fluoreszenzfarbstoff, der in die doppelsträngige DNA interkaliert, sichtbar gemacht werden. In den vorliegenden Versuchen wurde hierfür Ethidiumbromid verwendet. Nach Anregung mit UV-Licht der Wellenlänge 312 nm (Transilluminator TFX-20M 6 x 15 W 312 nm Tube, RS Rothhaar&Schroeder Laborgerätehandel, Heidelberg) wurden die Gele mit einer Polaroid-Kamera (DS 34 direct screen instant camera, Polaroid Corporation, Concord, Massachusetts, USA) mit Sofortfilmen (Fujifilm FP 3000 B sw, ISO 3000, 8,5 x 10,8 cm, Fujifilm Corporation, 7-3, Akasaka 9-chome, Minato-ku, Tokyo, Japan) fotografiert.

Die Größe der Amplifikate im Gel konnte mit Hilfe eines Größenmarkers abgeschätzt werden (z.B. GeneRuler™ 100bp DNA Ladder, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) (Abb. 10).

### **3.2.3 RNA-Isolierung und -Aufbereitung**

#### **3.2.3.1 RNA-Isolierung**

Die RNA-Isolierung aus dem Lebergewebe der Versuchstiere erfolgte mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Isolierungs-Kits (FastTri RNA Extraction Reagent, Axon Labortechnik GmbH, Kaiserslautern). Grundlage hierfür stellt die erstmals 1987 von Chomczynski beschriebene „Single-Step-Methode“ zur Isolierung von Total-RNA dar [39].

Die schockgefrorenen und bei -75 °C gelagerten Leberproben wurden in Flüssigstickstoff zerschlagen. Für die weitere Untersuchung von jedem Organ wurden ca. 10-15 mg gefrorenes Gewebe in FastTri Reagenz überführt. Die weitere RNA-Isolierung erfolgte orientierend am Herstellerprotokoll gemäß folgender Schritte:

- **Homogenisierung des Gewebes**

10-15 mg Gewebe wurden mit je 1 ml vorgekühlter FastTri-Reagenz homogenisiert. Zur Lyse des Gewebes wurde ein elektrischer Homogenisator (Ultra-Turrax T25, IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen) verwendet. Zur zusätzlichen RNase Inhibition wurden dem FastTri Reagenz 10 µl Mercaptoethanol p.a. (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) zugesetzt, das als mildes reduzierendes Reagenz eine Denaturierung von RNasen bewirkt.

- **Phasentrennung**

Die Proben wurden 5 min auf Eis inkubiert, um die Dissoziation der Nukleotidkomplexe zu gewährleisten. Je eingesetztem Milliliter FastTri wurden 0,2 ml Chloroform 99 % reinst (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) zugegeben und die Proben für 15 s kräftig geschüttelt. Danach wurden sie 3-10 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte zur Phasentrennung ein Zentrifugationsschritt (5 min, 12.000 x g, 4 °C).

Es bildeten sich drei Phasen: eine untere rote Phenol-Chloroform-Phase, eine Interphase und eine obere, farblose, wässrige Phase. Die RNA war ausschließlich in der wässrigen Phase angereichert, während sich DNA und Proteine in Interphase und Phenolphase befanden. Die wässrige Phase nahm dabei ca. 60 % des Probenvolumens ein.

Der Waschschrift mit Chloroform wurde zweimal durchgeführt, um eine hohe Reinheit der Probe zu erreichen. Beim ersten Schritt wurde die Probe für 10 min vor der Zentrifugation inkubiert, beim zweiten Schritt für 3 min.

- **RNA-Präzipitation**

Die wässrige Phase der Probe wurde in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Inter- und Phenolphase wurden verworfen. Die Präzipitation der RNA erfolgte mit 0,5 ml Isopropanol p.a. (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) pro eingesetztem Milliliter FastTri. Die Probe wurde mehrmals vorsichtig invertiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss folgte ein Zentrifugationsschritt für 10 min bei 12.000 x g und 4 °C. Das RNA-Präzipitat lag als gelartiges Pellet an der unteren Seite des Reaktionsgefäßes.

- **Waschen der RNA**

Der Isopropanolüberstand wurde vorsichtig abgenommen und das Pellet zweimal mit 1 ml Ethanol 75 % (Ethanol p.a. (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) in RNase-freiem Wasser (DEPC-Wasser)) durch Vortexen und Zentrifugation (10 min, 12.000 x g, 4 °C) gewaschen.

- **Lösen der RNA**

Das RNA-Pellet wurde bis zu einem leicht glasigen Aussehen an der Luft angetrocknet und anschließend in 30 µl RNase-freiem Wasser ( $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$ , 65 °C) gelöst. Nach 10 min Inkubation wurde die Probe gevortext.

### 3.2.3.2 Qualitätskontrolle der RNA

Die Qualitätskontrolle der isolierten RNA erfolgte mittels Photometrie und Gelelektrophorese:

- **Bestimmung von Reinheit und Konzentration der RNA-Probe**

Die Bestimmung von Reinheit und Konzentration der Proben erfolgte photometrisch. Hierzu wurden die Proben 1:100 mit Tris-HCl (pH 7,0) verdünnt. Nukleotide besitzen die Eigenschaft, in wässriger Lösung Licht der Wellenlänge 260 nm zu absorbieren. Proteine haben ihr Absorptionsmaximum bei 280 nm. Somit kann über die Ermittlung des Quotienten (Ratio) der optischen Dichten (OD) bei 260 nm und 280 nm eine Aussage über eine eventuelle Verunreinigung der Proben getroffen werden. Dieser Quotient sollte für die RNA-Proben über 1,8 liegen. Werte unter 1,8 sprechen für eine Verunreinigung der Probe.

Weiterhin kann über die OD bei 260 nm unter Zuhilfenahme des Lambert-Beerschen-Gesetzes die RNA-Konzentration bestimmt werden. RNA hat bei einem pH von 7,0, einer Konzentration von 40 µg/ml und einer Küvettenschichtdicke von 1 cm eine optische Dichte von 1.

Die Bestimmung der Konzentration ist Voraussetzung für die anschließende Verdünnung der Probe auf eine definierte Konzentration. Die Proben wurden für die weitere Verwendung mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$  auf eine Konzentration von 500 ng/µl verdünnt.

- **RNA-Analyse mittels Agarose-Gelelektrophorese**

Durch Agarose-Gelelektrophorese ist es möglich, die Integrität von RNA zu bestimmen. Eine Besonderheit der RNA-Gelelektrophorese ist, dass einzelsträngige RNA-Moleküle im Gegensatz zu doppelsträngiger DNA dazu neigen, Sekundärstrukturen auszubilden, die das Wanderungsverhalten im Gel beeinflussen. Um dies zu verhindern, wird die Elektrophorese mit denaturierenden Agenzien (in den vorliegenden Versuchen mit

Formaldehyd 37 % (Formaldehyd 37 % p.a., Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)), durchgeführt [127].

Das Agarosegel wurde zur RNA-Elektrophorese hergestellt und 3 µl der unverdünnten RNA (ca. 6-9 µg RNA) mit 9 µl RNA-Probenpuffer versetzt (vgl. Kapitel 3.2.6). Die entsprechende Probe wurde 15 min im Wasserbad bei 65 °C inkubiert, kurz auf Eis gekühlt, gevortext, zentrifugiert und anschließend das Gel beladen.

Die Auftrennung erfolgte bei 80-100 V Gleichspannung für 35 min in MOPS 1x Laufpuffer (pH 7,0, vgl. Kapitel 3.2.6). Anschließend wurden die Banden analysiert und zur Dokumentation fotografiert (vgl. Kapitel 3.2.2).

Bei nicht degradiert RNA konnten zwei deutlich getrennte Banden dargestellt werden. Diese entsprechen den ribosomalen Untereinheiten 28S und 18S, die bei isolierter Total-RNA den mengenmäßig größten Anteil darstellen. Bei guter Qualität und Integrität der RNA kann außerdem noch eine 5S-Bande dargestellt werden, die ebenfalls zytosolisch-ribosomaler RNA entspricht [122]. Bei einer RNA-Probe von hoher Qualität geht man von einem Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten der 28S / 18S-rRNA-Banden von 2:1 aus [14]. Dieses Intensitätsverhältnis zeigt, dass keine Degradation der Gesamt-RNA stattgefunden hat.

### **3.2.3.3 Umschreibung der RNA in cDNA (Reverse Transkription)**

Für die quantitative Real-Time-PCR (RT-qPCR) wurde die RNA mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Die cDNA stellt den komplementären Strang der bereits gespleißten mRNA dar und enthält somit keine Introns. Das Enzym Reverse Transkriptase ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, bei der als Primer Oligo-dT-Nukleotide (15-25 Desoxythymidine) zur Anwendung kommen, die komplementär zum Poly-Adenosin(A)-Schwanz der mRNA sind. Als Produkt der Reaktion entsteht ein Hybrid aus mRNA und cDNA, die cDNA kann dann der RT-qPCR zugeführt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde RNA mit einer Konzentration von 500 ng/µl eingesetzt. Sie wurde vor der Umschreibung 5 min bei 65 °C inkubiert und dann vor Zugabe zum Reaktionsansatz auf Eis gekühlt. Die Umschreibung erfolgte im GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer Corporate Headquarters, Massachusetts, USA). Es wurde nach folgendem Protokoll vorgegangen:

**Pro Ansatz:**

- 1 µl RNA (500 ng/µl)
- 4 µl Reaktionspuffer RT-Buffer 5x (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot)
- 2 µl dNTP-Mix je 10 mM (Axon Labortechnik GmbH, Kaiserslautern)
- 0,5 µl RiboLock™ RNase Inhibitor (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot)
- 1 µl RevertAid™ Reverse Transkriptase 200 U/µl (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot)
- 1 µl Oligo-dt-Primer (ABgene Ltd, Surrey, USA)
- 10,5 µl RNase-freies Wasser (DEPC-Wasser)

**Programm zur Umschreibung im GeneAmp PCR System 2400** (Perkin Elmer Corporate Headquarters, Massachusetts, USA):

1. 10 min 25°C
2. 60 min 42°C
3. 10 min 70°C
4. 10 min 10°C

Nach der Umschreibung wurden die Proben 1:10 mit Aqua dest. verdünnt und anschließend bei -20 °C aufbewahrt bzw. direkt für die RT-qPCR verwendet.

### 3.2.4 Quantitative Real-Time-PCR (RT-qPCR)

Die durch Reverse Transkription gewonnene cDNA wurde nun der RT-qPCR zugeführt. Grundlage hierfür ist die 1992 von Higuchi *et al.* beschriebene [93] und 1993 weiterentwickelte [94] Technik, die Zunahme der Amplifikationsprodukte in einer PCR während der PCR-Zyklen zu messen, ohne hierfür in die PCR einzugreifen. Dies gelang durch die Echtzeit-Messung von Fluoreszenzsignalen und führte zu der 1996 erstbeschriebenen Methode [89] der „Real time quantitative PCR“ in der heute angewandten Form.

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Durchführung der RT-qPCR das Reaktionskit (SSoFast™ EvaGreen® Supermix 2x, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Kalifornien, USA) verwendet. Der hier enthaltene Fluoreszenzfarbstoff (EvaGreen®) interkaliert in die DNA und führt mit zunehmender DNA-Menge zu einem ansteigenden Fluoreszenzsignal der Probe. Dieses Signal wird bei jedem PCR-Zyklus während des 60 °C Anlagerungsschrittes durch das RT-PCR-Gerät (CFX 96 Real-Time PCR Detection Systems, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Kalifornien, USA) detektiert, wodurch die relative Zunahme der DNA-Menge nach jedem Amplifikationsschritt bestimmt wird. Diese relative Zunahme erlaubt nun

Rückschlüsse auf die Expression der Zielgene, da sie der zuvor eingesetzten Menge an cDNA proportional ist und diese wiederum von der zuvor vorhandenen Menge mRNA abhängt.

Aufgrund der Schnelligkeit der Polymerase in dem verwendeten Reaktionskit wurde auf den Verlängerungsschritt in den PCR-Zyklen verzichtet.

Das Primerdesign erfolgte mit Hilfe von Clone Manager Suite 7 (Sci-Ed Software, Cary, NC, USA) nach Standard-Kriterien basierend auf den in NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) hinterlegten Sequenzen (Gene IDs vgl. Tab. 3). Die Primerpaare wurden so gewählt, dass bei genomischer DNA auch Intron-Bereiche amplifiziert würden, so dass eine Kontamination anhand der Größenunterschiede der Produkte im Agarose-Gel erkennbar wäre. Die Primerpaare wurden von der Firma Eurofins (Eurofins MWG GmbH, Ebersberg) bezogen. Für jedes Primerpaar wurde eine Effizienzbestimmung durchgeführt, da es sich etabliert hat, für die Livak-Auswertung eine Effizienz nahe 100 % anzustreben und eine Differenz zwischen den Ziel- und Referenzgenen von nicht mehr als 5 % zu erreichen. Hierzu wurde eine Verdünnungsreihe von cDNA in Zehnerschritten erstellt und diese mit jeweils gleichem Primerzusatz einer RT-qPCR zugeführt. Die hierbei erhaltenen Cq-Werte wurden grafisch aufgetragen (Logarithmus des Verdünnungsfaktors gegen Cq-Wert), wodurch die lineare Abhängigkeit von Cq-Wert und Verdünnung deutlich wird. Aus der Steigung der erhaltenen Gerade wurde die Effizienz der Primer nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Primereffizienz} = 10^{-1/\text{Steigung der Geraden}}$$

Im Rahmen dieser Arbeit wurden für jede Probe die Zielgene ATF3 und Ppp1r15a untersucht. Die Werte wurden gegen die Expression von Rps16 und Rps21 normalisiert (Referenzgene). Aus technischen Gründen wurde die Expression der Ziel- und Referenzgene in unterschiedlichen RT-qPCR-Läufen durchgeführt. Um dennoch die Vergleichbarkeit der Amplifikationen zu gewährleisten, wurden je 2 Proben mit Rps16 und Rps21 Primern in allen PCR-Läufen mitgeführt. Hier zeigten sich konstante Werte bei den Proben innerhalb der verschiedenen Läufe (C<sub>y0</sub>-Wert Differenz über alle RT-qPCR-Läufe maximal 1,48) und somit eine gute Vergleichbarkeit der verschiedenen RT-qPCR-Läufe.

**Tab. 3: Primer für die RT-qPCR**

<b>Gen</b>	<b>Gene ID</b>	<b>Primer</b>	<b>Primersequenz 5' → 3'</b>	<b>Größe cDNA</b>	<b>Größe gDNA</b>
<b>Rps16</b>	140655	RnRps16_RTf	ATATCCGGGTCCGTG TGAAGG	202 bp	384 bp
		RnRps16_RTr	CCGCCAAACTTCTTG GATTCGC		
<b>Rps21</b>	81775	RnRps21_RTf	TTTACTCAGCTCCGCG AGCAAC	190 bp	518 bp
		RnRps21_RTr	TCCATCAGCCTTAGCC AATC		
<b>ATF3</b>	25389	RnATF3_RTf	TGCTGCCAAGTGTCG AAAC	180 bp	1498 bp
		RnATF3_RTr	TTCTGAGCCCGGACG ATAC		
<b>Ppp1r15a</b>	171071	RnPpp1r15a_RTf	GAAGCGGCTCAGATC TTTC	182 bp	625 bp
		RnPpp1r15a_RTr	CAAAGCGGCTTCGAT CTC		

Der Reaktionsansatz erfolgte mit SSoFast™ EvaGreen® Supermix 2x (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Kalifornien, USA). Die Reaktion erfolgte in farblosen 96-well-Reaktionsplatten (96 well 0,2 ml low profile tube plate, color natural, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Kalifornien, USA), die mit spezieller Folie für RT-qPCR verschlossen wurden (PCR Sealers™ Microseal® ‚B‘ Film, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Kalifornien, USA). In jedem RT-qPCR-Lauf wurde zur Überprüfung auf mögliche Kontamination eine Kontrolle ohne Zugabe von Template-DNA mitgeführt (NTC, no template control). Es wurde nach folgendem Protokoll vorgegangen:

**Pro Ansatz:**

6 µl Aqua dest.

10 µl SSoFast™ EvaGreen® Supermix 2x (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Kalifornien, USA)

2 µl Salt free Oligos Primermix (Eurofins MWG GmbH, Ebersberg)

2 µl cDNA (1:10 verdünnt)

Die Reagenzien wurden für alle Proben im Mastermix ohne cDNA angesetzt, anschließend aliquotiert und die cDNA separat zugegeben.

**PCR-Programm zur RT-qPCR im CFX 96 Real-Time PCR Detection Systems** (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Kalifornien, USA):

1. 15 min 95 °C
2. 15 s 95 °C
3. 25 s 60 °C (hier Fluoreszenzmessung für Quantifizierung)
4. 1 min 95 °C
5. 1 min 65 °C
6. + 0,5 °C/5 s bis 95 °C (Fluoreszenzmessung der Schmelzkurvenanalyse)

Die Schritte 2. und 3. wurden in 45 Zyklen wiederholt.

Zur Qualitätskontrolle wurde nach der RT-qPCR-Reaktion eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Hierbei wurden die Proben unter Fluoreszenzmessung von 65 °C ausgehend um 0,5 °C pro 5 s bis 95 °C erhitzt. Jedes in der RT-qPCR entstandene Produkt hat einen charakteristischen Schmelzpunkt, an dem es zu einem plötzlichen Abfall des Fluoreszenzsignals kommt, da hier der Doppelstrang zu zwei einzelsträngigen Molekülen denaturiert und der Fluoreszenzfarbstoff freigesetzt wird. Ist eine Probe frei von Nebenprodukten, so weist die Fluoreszenz-Schmelzkurve nur einen steilen Abfall des Fluoreszenzsignals am Schmelzpunkt des erwarteten Produktes auf, bzw. einen einzelnen Peak, wenn die erste Ableitung des Fluoreszenzsignals gegen die Temperatur aufgetragen wird. In der NTC darf aufgrund fehlender cDNA kein Anstieg des Fluoreszenzsignals vorhanden sein.

Weiterhin wurde nach jedem RT-qPCR-Lauf eine gelelektrophoretische Auftrennung der amplifizierten Proben durchgeführt, mit der das PCR-Produkt auf korrekte Amplifikation des Zielgens sowie auf etwaige unspezifische Nebenprodukte überprüft wurde.

Hierzu wurde jede Probe (20 µl) nach dem RT-qPCR-Lauf mit 4 µl Loading Dye Solution 6x (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) versetzt und davon 7 µl auf ein Agarosegel zur DNA-

Elektrophorese aufgetragen. Zur Bestimmung der Produktgröße wurde der Marker GeneRuler™ 100bp DNA Ladder (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) verwendet. Nach 45 min bei 100 Volt Gleichspannung in TAE 1x Laufpuffer (Tris-Acetat-EDTA Puffer pH 8,3) wurden die erhaltenen Bandengrößen analysiert und zur Dokumentation fotografiert (vgl. Kapitel 3.2.2).

### 3.2.5 Auswertung der RT-qPCR

Der Cq-Wert (Cycle of quantitation, dt. Quantifizierungszyklus) wurde über die Methode der nicht-linearen Regression nach Richards Gleichung bestimmt und automatisch über die CFX 96-interne Software Bio-Rad CFX Manager<sup>©</sup> Version 1.6.541.1028 (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Kalifornien, USA) berechnet. Die anschließende Normalisierung und Auswertung erfolgte mit Microsoft® Office Excel® 2007 (©2006 Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA) auf Grundlage der  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode nach Livak [134].

Die Cq-Werte wurden für die vorliegende Arbeit nach der  $Cy_0$ -Methode bestimmt (entwickelt 2008 von Guescini *et al.* [75]). Bei dieser Methode werden die Fluoreszenzdaten mit Hilfe einer nicht-linearen Regression an eine 5-Parameter Richards-Funktion angepasst, wobei der Schnittpunkt zwischen der Abszisse und der Tangente im Wendepunkt der Funktion ermittelt wird [75, 198]. Die Autoren konnten zeigen, dass diese Methode der Cq-Wert-Ermittlung gegenüber anderen Methoden die geringsten Abweichungen bei unterschiedlichen Reaktionseffizienzen liefert [75].

Je mehr Kopien des jeweiligen Transkripts in der zu untersuchenden Probe vorhanden sind, desto früher wird ein messbarer Fluoreszenzanstieg erreicht. Es kommt dann zu einem schnelleren Anstieg der amplifizierten cDNA-Menge und des Fluoreszenz-Signals. Der  $Cy_0$ -Wert ist also ein Maß zur Quantifizierung der DNA-Menge in einer Probe. Da aufgrund der relativen Quantifizierung der  $Cy_0$ -Wert nur im Vergleich interpretiert werden kann, erfolgte für jede Probe auch die Bestimmung der  $Cy_0$ -Werte zweier Referenzgene, gegen die normalisiert wurde. Hierzu dienen grundsätzlich Gene, die im Idealfall in allen Zelltypen unabhängig von äußeren Faktoren gleich stark exprimiert sind. In den vorliegenden Versuchen kamen hierfür die Gene Rps16 und Rps21 zum Einsatz. Sie kodieren für die Proteine S16 und S21 als Teile der ribosomalen Untereinheiten und sind somit ubiquitär vorhanden [16, 114]. Die Verwendung solcher Gene für ribosomale Proteine als Referenzgene in der RT-qPCR ist eine gängige Methode, da sie sich in

verschiedenen Untersuchungen als konstant exprimiert erwiesen [21, 178, 208, 209, 218]. Da die Expression der Referenzgene aber auch gewebeabhängig ist, sollten geeignete Referenzgene anhand des verwendeten Gewebes am Anfang jedes Experimentes neu etabliert werden [29, 178]. Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analysen von schockgefrorenem Lebergewebe der Sprague-Dawley Ratte wurden zu Anfang des Experiments die Referenzgene auf ihre konstante Expression im verwendeten Gewebe hin überprüft. Hierbei erwiesen sich Rps16 und Rps21 als geeignete Referenzgene.

Als „Kalibrator“ entsprechend der Auswertung nach Livak (Expressionswert, der als physiologisch angenommen wird), diente für alle Proben der mittlere Expressionswert einer unbehandelten Kontrollgruppe aus früheren Studien der AG (Sham / Vehikel, ShV = scheinoperierte Tiere mit Vehikel-Medikation, n = 4 Tiere) [134].

### 3.2.6 Verwendete Puffer und Medien

#### **RNase-freies Wasser 1000 ml ( $H_2O_{DEPC}$ )**

1000 ml Aqua dest.

1 ml DEPC-Lösung (Diethylpyrocarbonat, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)

unter Rühren über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert, dann autoklaviert

#### **Tris-Puffer (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-Puffer) 500 ml:**

607 mg TRIS Pufferan® 121,14 g/mol (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)

in 300 ml Aqua dest. gelöst,

mit HCl auf pH 7,0 eingestellt (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)

mit Aqua dest. auf 500 ml aufgefüllt, autoklaviert

#### **MOPS-Puffer (3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure-Puffer) 1x pH 7,0:**

MOPS 0,2 M (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)

Na-Acetat 50 mM (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)

EDTA 10 mM (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)

auf pH 7,0 eingestellt, autoklaviert

#### **RNA-Elektrophoresegel 1,2 %:**

1,44 g Agarose (peqGold Universal-Agarose, peqLab Biotechnology GmbH, Erlangen)

86 ml Aqua dest.

12 ml 10x MOPS-Puffer 1x

22 ml Formaldehyd 37 % p.a. (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)

#### **RNA-Probenpuffer (für RNA Gelelektrophorese):**

30 µl 10x MOPS-Puffer

39 µl 1x MOPS-Puffer

150 µl Formamid (GiscoBRL Life Technologies, Paisley, UK)

54 µl Formaldehyd 37 % p.a. (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)

1 µl Bromphenolblau (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)

1 µl Ethidiumbromidlösung 10 mg/ml (Axon Labortechnik GmbH, Kaiserslautern)

**RNA-Gelelektrophorese:**

3 µl unverdünnte RNA (ca. 6-9 µg RNA) + 9 µl RNA-Probenpuffer

Laufpuffer: MOPS 1x-Puffer

**TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA pH 8,3) 50x 500 ml:**

121 g TRIS Pufferan® 121,14 g/mol (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)

mit Aqua dest. auf 400 ml aufgefüllt

22 ml Essigsäure (99%) (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)

50 ml 0,5 M EDTA pH 8.0 (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)

gemischt

mit Essigsäure auf pH 8,3 eingestellt (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)

mit Aqua dest. auf 500 ml aufgefüllt

sterilfiltriert

bei 4 °C gelagert

**TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA pH 8,3) 1x**

TAE-Puffer 50x mit Aqua dest. verdünnt

**DNA-Elektrophoresegel 2 %:**

2 % Agarose (peqGold Universal-Agarose, peqLab Biotechnology GmbH, Erlangen)

in TAE 1x durch Kochen gelöst

1 µl Ethidiumbromidlösung

**DNA-Gelelektrophorese**

4 µl Loading Dye Solution 6x (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) + 20 µl DNA

Laufpuffer: TAE 1x

Marker: GeneRuler™ 100bp DNA Ladder

Spannung, Laufzeit: 100 V Gleichspannung, 45 min

### 3.3 Software und Statistik

#### 3.3.1 Verwendete Computerprogramme

Die Erstellung der Dissertationsschrift erfolgte in Microsoft® Office Word® 2007 (©2006 Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA).

Zur Bildbearbeitung wurden die Programme CorelDRAW® X4 und Corel Photo-Paint® X4 Version 14.0.0.701 (©2008 Corel Corporation, Ottawa, Ontario, Kanada) verwendet.

Das Primerdesign erfolgte mit Hilfe der Clone Manager Suite 7 (Sci-Ed Software, Cary, North Carolina, USA).

Die Bestimmung der RT-qPCR Rohdaten und der Cq-Werte erfolgte mittels des Softwarepakets Bio-Rad CFX Manager® Version 1.6.541.1028 (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Kalifornien, USA).

Die Auswertung der RT-qPCR Daten aus Bio-Rad CFX Manager® Version 1.6.541.1028 (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) erfolgte mit Microsoft® Office Excel® 2007 (©2006 Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA).

Die statistische Analyse und die grafische Darstellung erfolgte mit dem Programm SigmaPlot® for Windows mit SigmaStat®-Integration (SigmaPlot® Version 9.01 Systat Software, Inc., Chicago, USA).

#### 3.3.2 Web-Quellen

Die Literaturrecherche erfolgte mit Hilfe der Meta-Datenbank PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) sowie der Suchmaschine Google Scholar (<http://scholar.google.de>).

Die Recherche und Analyse von DNA- und RNA-Sequenzen erfolgte mit Hilfe folgender Web-Quellen:

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore>

#### 3.3.3 Statistische Auswertung

Im Anschluss an den Nachweis einer Normalverteilung mittels Kolmogorov-Smirnov-Test erfolgte die Analyse der Überlebenszeiten der Tiere und Evaluation der Gruppenunterschiede mittels Log-Rank-Test nach Kaplan Meier; p-Werte < 0,001 wurden

als statistisch signifikant angesehen. Nun erfolgte ein multipler Vergleich zur Analyse der Gruppenunterschiede mittels „All Pairwise Multiple Comparison“ Vergleichstest nach Holm-Sidak; p-Werte  $< 0,05$  wurden hier als statistisch signifikant angesehen.

Zur Analyse der Dosisabhängigkeit der Melatonintherapie auf das Überleben wurde eine nicht-lineare Regressionsanalyse nach der Methode der kleinsten Quadrate (least square best fit) durchgeführt und das Maximum bestimmt.

Zur statistischen Auswertung der Expressionsstudien wurden zunächst die relativen Expressionen der Zielgene (ATF3 und Ppp1r15a) auf Unterschiede zwischen den Therapiegruppen untersucht. Nach Überprüfung auf Normalverteilung der Daten mittels Kolmogorov-Smirnov-Test erfolgte zur Evaluation der Gruppenunterschiede eine einfaktorielle Varianzanalyse mittels Rangsummentest nach Kruskal-Wallis für nicht normalverteilte Daten; p-Werte  $< 0,001$  wurden als statistisch signifikant angesehen. Dem folgte ein „All Pairwise Multiple Comparison“ Vergleichstest nach Dunn's zur Analyse der Gruppenunterschiede; p-Werte  $< 0,05$  wurden hier als statistisch signifikant angesehen. Einzelwerte mit mehr als sechsfacher Standardabweichung wurden als Ausreißer angesehen und aus der Auswertung ausgeschlossen.

Zur Korrelationsanalyse zwischen Überlebenszeit und rel. Expression der Zielgene wurde eine lineare Regressionsanalyse nach der Methode der kleinsten Quadrate durchgeführt und der Korrelationskoeffizient ermittelt. Diese Analyse wurde unabhängig von den jeweiligen Therapiegruppen durchgeführt.

Alle Daten sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (MW  $\pm$  SD), wenn nicht anders angegeben.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Letalitätsversuche

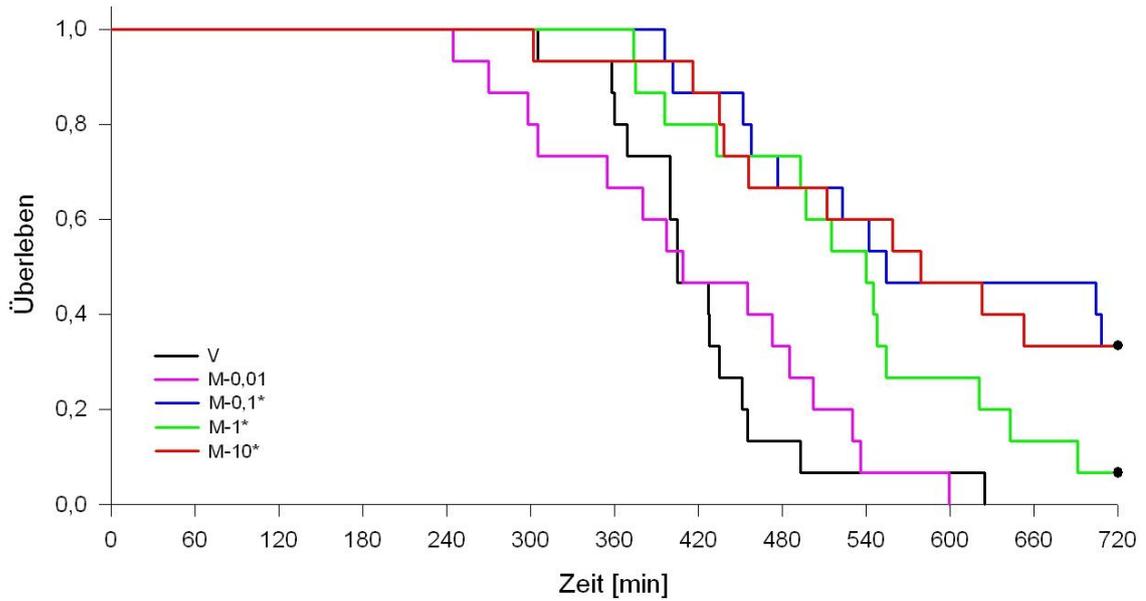
Alle Versuchstiere wiesen zu Versuchsbeginn vergleichbare Vitalparameter (MAP, HF) auf. Die Applikation von Melatonin in einer Dosierung zwischen 0,1 mg/kg KG und 10 mg/kg KG führte jeweils zu einer signifikant verlängerten Überlebenszeit der Tiere nach CLI gegenüber der Vehikel-Gruppe (je  $p < 0,05$ ) (Tab. 4; Abb. 6). Eine Dosierung von 0,01 mg/kg KG Melatonin führte hingegen zu keiner signifikanten Änderung der Überlebenszeit gegenüber der Vehikel-Gruppe. Die Überlebenszeiten der Therapiegruppen mit  $\geq 0,1$  mg/kg KG Melatonin unterschieden sich signifikant gegenüber denen der M-0,01-Gruppe ( $p < 0,05$ ).

Die nicht-lineare Regressionsanalyse zeigt ein best-fit Maximum bei 576 min (95 % Konfidenzintervall 533,5 – 618,5 min) bei keiner weiteren Steigerung der Überlebenszeit über 1,0 mg/kg KG mit einem Regressionskoeffizienten von  $R^2 = 0,1968$  (Abb. 7).

**Tab. 4: Überlebenszeiten der Tiere nach CLI**

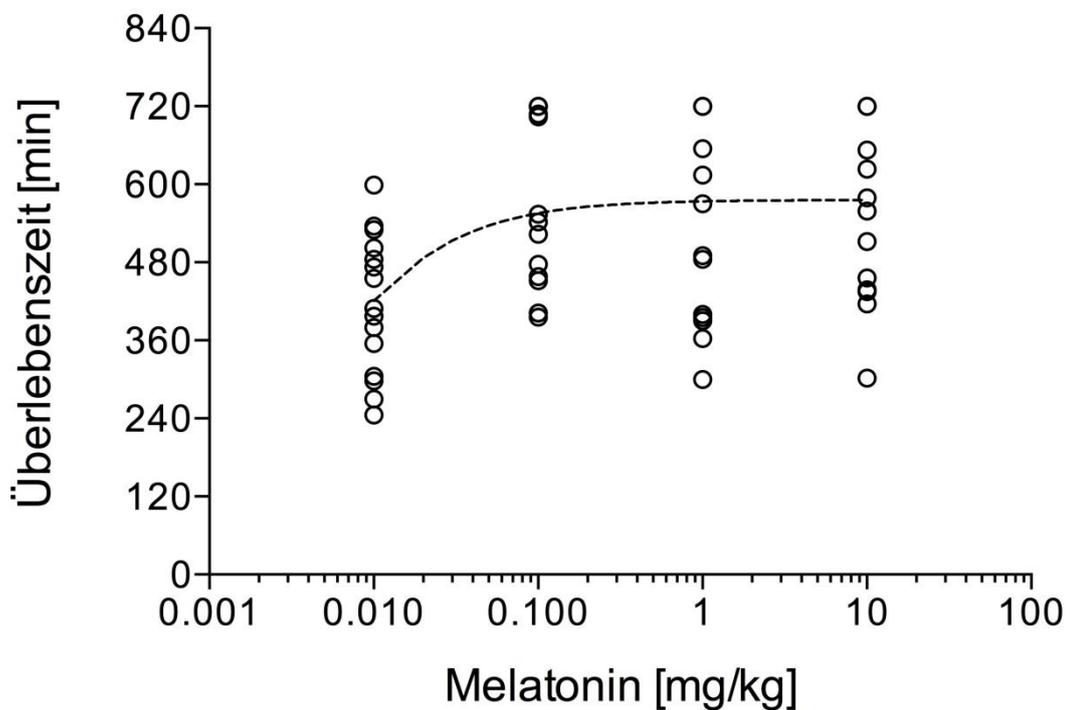
Ein Stern (\*) indiziert  $p < 0,05$  gegenüber der Vehikelgruppe und gegenüber der Melatonintherapie mit 0,01 mg/kg. V = Sepsis + Vehikel, M = Melatonin + angegebene Dosierung in mg/kg Körpergewicht

Therapiegruppe	Überlebenszeit (MW $\pm$ SD) in min
V	421 $\pm$ 73
M-0,01	416 $\pm$ 107
M-0,1	588 $\pm$ 131 *
M-1	530 $\pm$ 108 *
M-10	572 $\pm$ 139 *



**Abb. 6: Kumulative Sterberate der Therapiegruppen nach CLI**

Ein Stern (\*) indiziert  $p < 0,05$  gegenüber der V-Gruppe und gegenüber der M-0,01-Gruppe. Die schwarzen Punkte kennzeichnen das Ende des Beobachtungszeitraums bei 720 min. V = Sepsis + Vehikel, M = Melatonin + angegebene Dosierung in mg/kg Körpergewicht



**Abb. 7: Nicht-lineare Regressionsanalyse Melatoninindosis - Überlebenszeit**

Das best-fit Maximum liegt bei 576 min und zeigt keine Steigerung der Überlebenszeit über einer Dosis über 1,0 mg/kg Melatonin. Regressionskoeffizient  $R^2 = 0,1968$ .

## 4.2 Qualitätskontrollen der molekularbiologischen Experimente

Im Rahmen der molekularbiologischen Experimente wurden Qualitätskontrollen durchgeführt, um die fehlerfreie Interpretation und die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten.

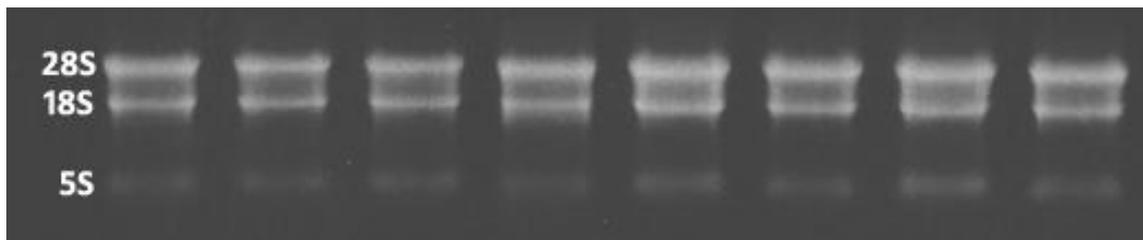
### 4.2.1 Qualitätskontrolle der RNA

- **Photometrische Bestimmung von Reinheit und Konzentration der Proben:**

Die hier verwendeten Proben hatten alle Werte über 2,38 mit einem MW von  $2,47 \pm 0,05$  (SD).

- **RNA-Analyse mittels Agarose-Gelelektrophorese:**

Alle hier verwendeten Proben entsprachen der exemplarisch dargestellten RNA-Gelelektrophorese (Abb. 8).



**Abb. 8: RNA-Gelelektrophorese**

Beispiel einer RNA-Gelelektrophorese von nicht degradierter RNA aus Lebergewebe. Exemplarisch dargestellt sind hier 8 Proben aus der M-1 Versuchsgruppe mit den Banden der 28S, 18S und 5S ribosomalen Untereinheiten. (1,2 %iges RNA-Elektrophoresegel, 80 V 35 min in MOPS 1x Laufpuffer)

### 4.2.2 Effizienzbestimmung der RT-qPCR Primer

Die Effizienzbestimmung der Primerpaare für die Ziel- und Referenzgene der RT-qPCR erfolgte für jedes Primerpaar (vgl. Kapitel 3.2.4) und ergab folgende Werte (Tab. 5):

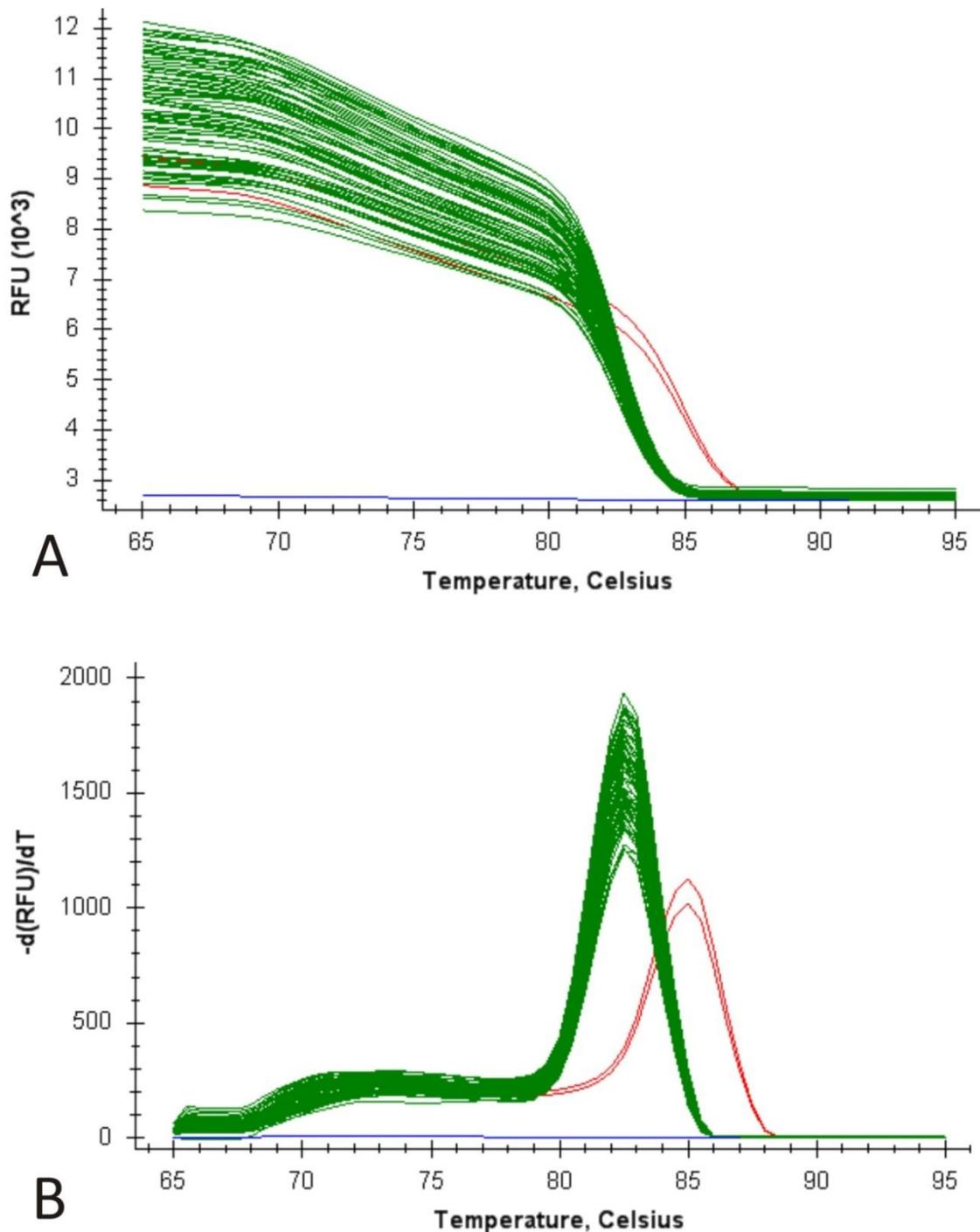
**Tab. 5: Effizienzen der Primer der RT-qPCR**

<b>Primerpaar</b>	<b>Primereffizienz</b>
Rps16	107,5 %
Rps21	102,6 %
ATF3	104,1 %
Ppp1r15a	104,7 %

### 4.2.3 Qualitätskontrolle der RT-qPCR-Reaktion

Alle verwendeten Proben wiesen in der Fluoreszenz-Schmelzkurve nur einen steilen Abfall des Fluoreszenzsignals am Schmelzpunkt des erwarteten Produktes auf bzw. einen Peak, wenn die erste Ableitung des Fluoreszenzsignals gegen die Temperatur aufgetragen wurde (Schmelzpunkt für Rps16 bei ca. 82,50 °C, für Rps21 bei ca. 85,00 °C) (Abb. 9). In keiner der NTC konnte ein Anstieg des Fluoreszenzsignals beobachtet werden.

Alle hier verwendeten Proben wiesen in der elektrophoretischen Auftrennung nur ein spezifisches Produkt in der erwarteten Größe auf. In der NTC zeigte sich kein Amplifikat. Somit konnte davon ausgegangen werden, dass alle Proben frei von Nebenprodukten waren und in der NTC keine cDNA vorhanden war.

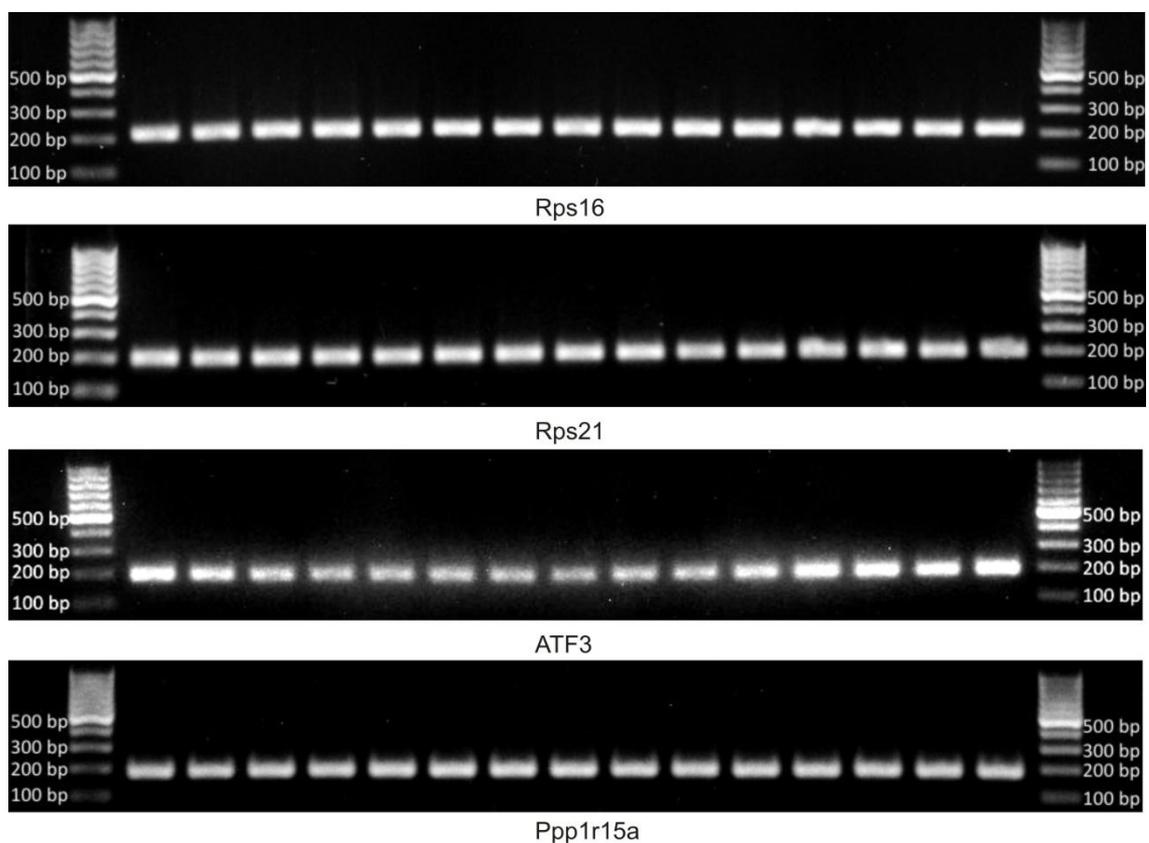


**Abb. 9: Schmelzkurven nach RT-qPCR**

Beispiele einer Schmelkurenanalyse (Exemplarisch dargestellt ist hier ein RT-qPCR-Lauf mit Rps16 Primern und Rps21 Primern.) RFU = Relative Fluorescence Units (dt. relative Fluoreszenzeinheiten),  $-d(\text{RFU})/dT$  = erste Ableitung der RFU, grüne Kurven = Proben mit Rps16 Primern, rote Kurven = zwei Kontrollproben mit Rps21 Primern, blaue Kurve = NTC mit Rps16 Primern

Abb. 9 A zeigt die Fluoreszenzintensität gegen die Temperatur. Hier ist der Abfall der Signalintensität am Schmelzpunkt der Proben zu erkennen, Abb. 9 B zeigt bei gleichen Daten die erste Ableitung der Fluoreszenzintensität gegen die Temperatur („Melt Peak Curve“), wo sich der Schmelzpunkt als Peak in den Graphen zeigt. Zu erkennen ist das Fehlen eines Fluoreszenzsignals in der NTC (blau). Weiterhin zeigt sich in jeder Probe nur ein Peak am primerspezifischen Schmelzpunkt (ca. 82,50 °C für Rps16-Primer (grün) und ca. 85,00 °C für Rps21-Primer (rot)), eine Verunreinigung der Proben ist demnach nicht anzunehmen.

Dargestellt sind in Abb. 10 beispielhaft die gelelektrophoretischen Auftrennungen der PCR-Produkte für jedes eingesetzte Primerpaar aus einem RT-qPCR-Lauf. Die erwarteten Produktgrößen für die verschiedenen Primer betragen (Tab. 3): Rps16: 202 bp; Rps 21: 190 bp; ATF3: 180 bp; Ppp1r15a: 182 bp. Die Amplifikate liegen alle auf Höhe der erwarteten Produktgröße. Alle Proben zeigen nur diese Bande. Somit wurde das gewünschte Produkt korrekt amplifiziert und es sind keine Nebenprodukte in den Proben vorhanden. Alle Kontrollgele der verwendeten Proben entsprachen (bezogen auf die jeweiligen Primerpaare) denen, die hier exemplarisch dargestellt sind.



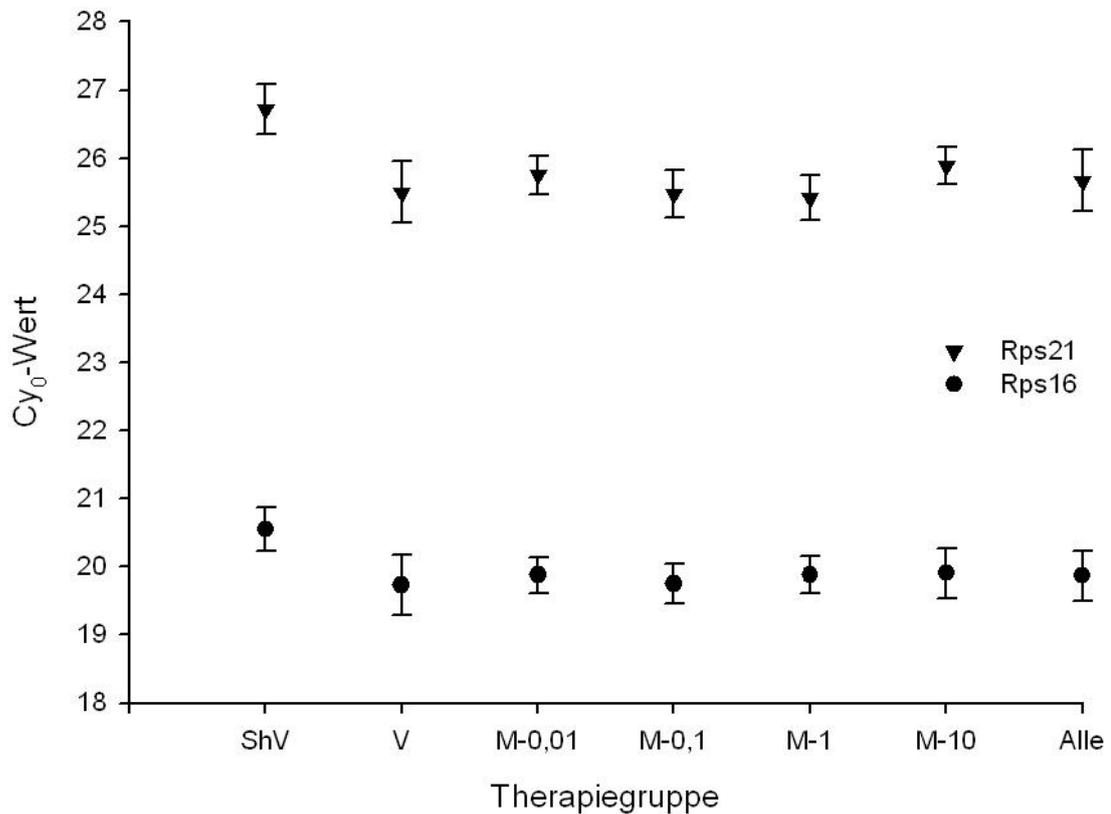
**Abb. 10: Kontrollgelelektrophoresen nach RT-qPCR**

Beispiele der Gelelektrophoresen der Amplifikate aus einem RT-qPCR-Lauf, hier exemplarisch mit den 15 Proben aus der M-0,1-Gruppe für jedes eingesetzte Primerpaar. Die 15 Banden entsprechen den Amplifikaten der 15 Proben aus der M-0,01-Gruppe. In jeder Probe tritt nur eine spezifische Bande auf, die der erwarteten Produktgröße entspricht (Rps16: 202 bp; Rps 21: 190 bp; ATF3: 180 bp; Ppp1r15a: 182 bp). Somit wurden die gewünschten Produkte korrekt amplifiziert und es sind keine Nebenprodukte in den Proben vorhanden.

Marker: GeneRuler™ 100bp DNA Ladder (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot)

#### 4.2.4 Prüfung der Referenzgene

Die Gene Rps16 und Rps21 zeigten über alle Versuchsgruppen hinweg eine konstante Expression und waren daher als Referenzgene geeignet (Abb. 11).



**Abb. 11:  $Cy_0$ -Werte der Referenzgene**

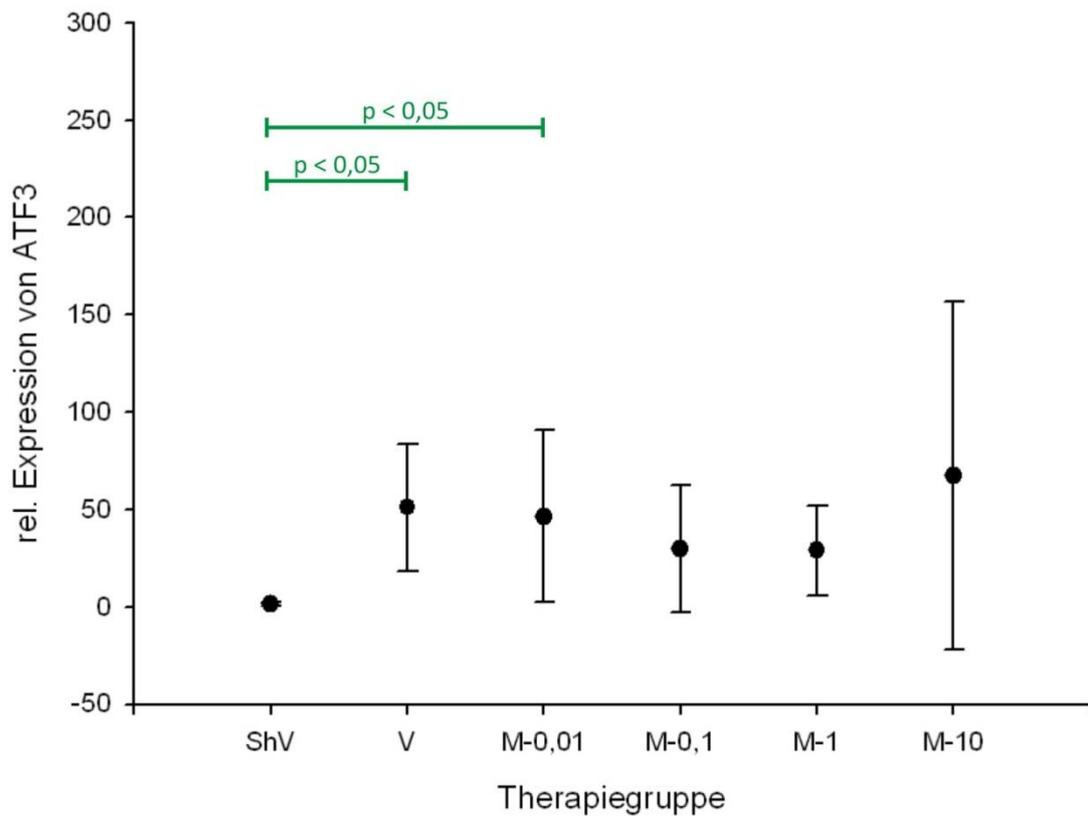
Dargestellt sind die  $Cy_0$ -Werte der Referenzgene Rps16 und Rps21, beide Gene zeigten über alle Versuchsgruppen hinweg eine konstante Expression. Dargestellt sind Mittelwerte +/- Standardabweichung. ShV = Scheinoperierte Kontrolle, V = Sepsis + Vehikel, M = Melatonin + angegebene Dosierung in mg/kg Körpergewicht

### 4.3 Genexpressionsanalysen

Neben den Letalitätsversuchen wurde in dieser Arbeit auch die Beeinflussung der hepatischen Genexpression von ATF3 und Ppp1r15a durch Melatoningabe in verschiedenen Dosierungen im Modell des septischen Schocks untersucht.

#### 4.3.1 Expressionsanalysen von ATF3

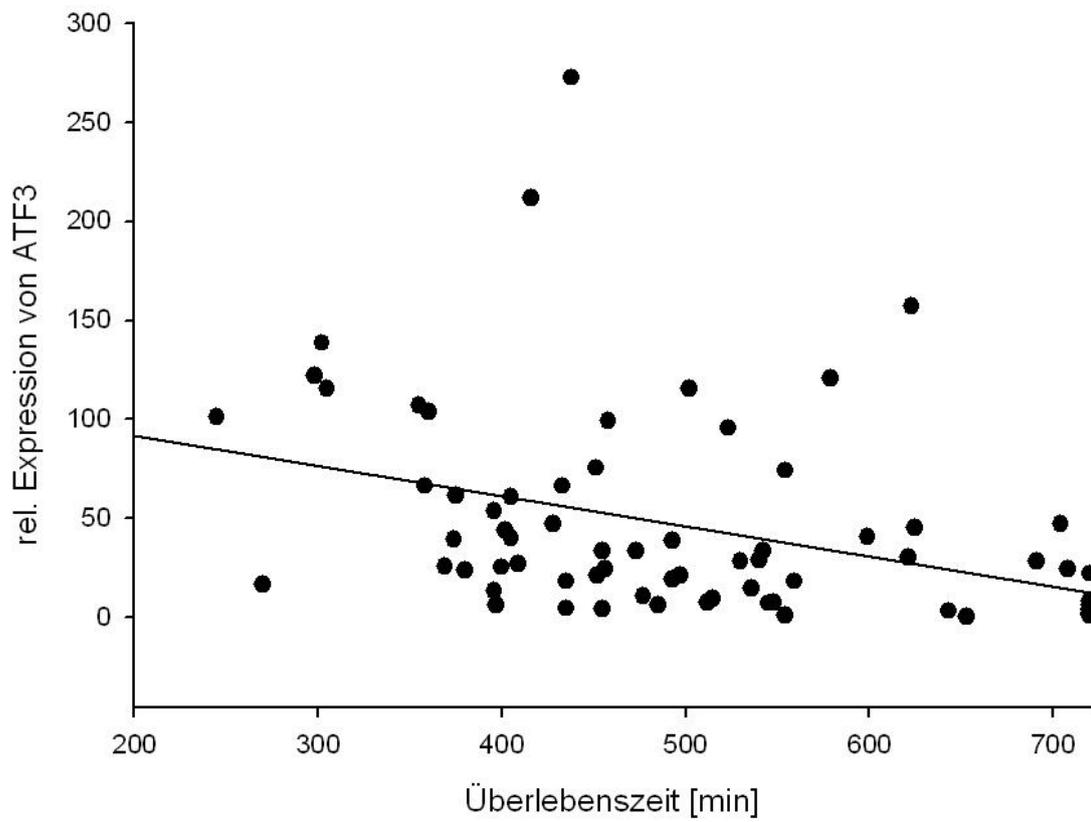
Die Versuchstiere in der ShV-Gruppe zeigten eine konstante Expression von ATF3 mit einem MW von  $1,3 \pm 1,2$  (SD) (Abb. 12). In der V-Gruppe kam es zu einem signifikanten Anstieg der Expression mit einem MW von  $51,1 \pm 32,6$  (SD). Die M-0,01-Gruppe wies ebenfalls einen signifikanten Expressionsanstieg gegenüber der ShV-Gruppe auf mit einem MW von  $46,3 \pm 44,3$  (SD). In der Therapiegruppe M-0,1 war die ATF3-Expression gegenüber V und M-0,01 verringert (MW von  $29,8 \pm 32,8$  (SD)). Die Werte unterschieden sich zwischen M-0,1 und ShV nicht mehr signifikant. Auch gegenüber den anderen Gruppen wies M-0,1 hinsichtlich der Expression keine signifikanten Unterschiede auf. Die M-1-Gruppe zeigt einen MW von  $28,9 \pm 23,3$  (SD), auch hier findet sich kein signifikanter Unterschied gegenüber einer anderen Gruppe. In der M-10-Gruppe kam es wieder zu einem Anstieg der Expression (MW =  $67,1 \pm 89,4$  (SD)), hier war kein signifikanter Unterschied zu einer anderen Therapiegruppe zu verzeichnen.



**Abb. 12: Hepatische rel. Expression von ATF3 in den Therapiegruppen**

Die Expression von ATF3 ist nach Sepsis erhöht, ohne in allen Gruppen das Signifikanzniveau zu erreichen. Dargestellt sind Mittelwerte +/- Standardabweichung. ShV = Scheinoperierte Kontrolle, V = Sepsis + Vehikel, M = Melatonin + angegebene Dosierung in mg/kg Körpergewicht

In der linearen Regressionsanalyse zwischen hepatischer relativer Expression von ATF3 und Überlebenszeit der Versuchstiere zeigte sich ein Regressionskoeffizient von  $R^2 = 0,157$ . Es zeigt sich eine große Streuung der Expressionswerte über alle Überlebenszeiten (Abb. 13).

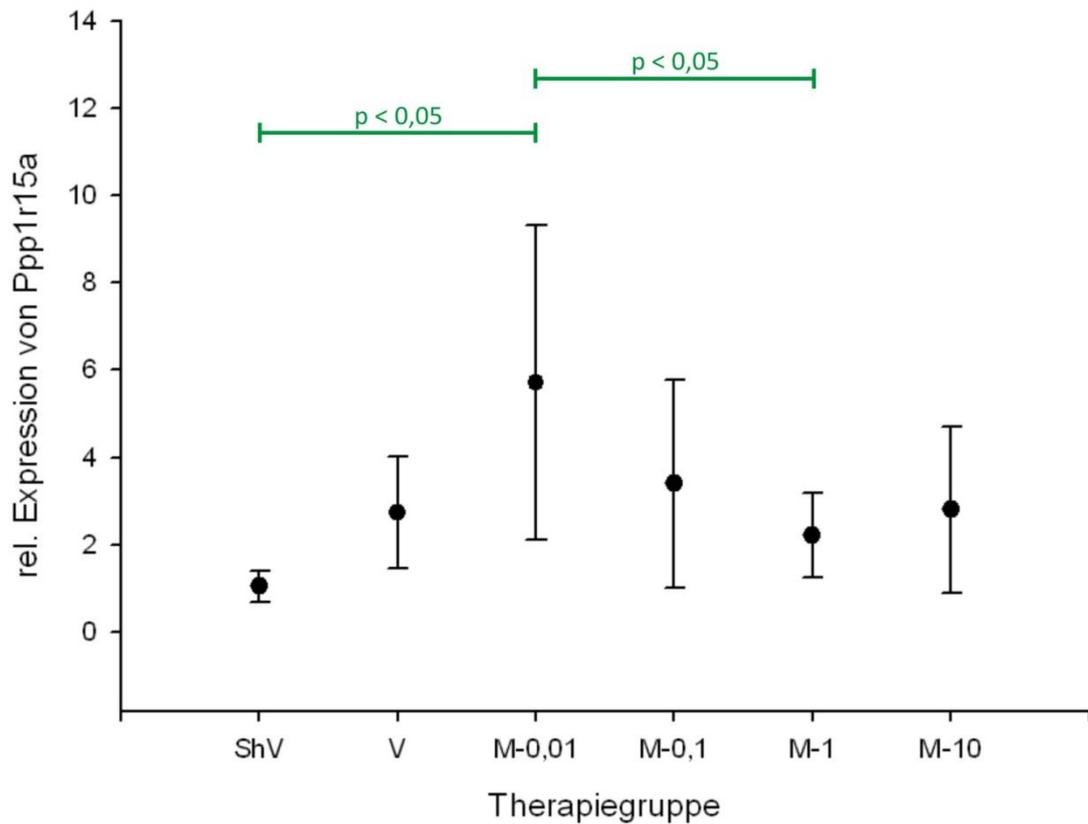


**Abb. 13: Regressionsanalyse: Expression von ATF3 und Überlebenszeit**

Die Überlebenszeit nach Sepsis korreliert nur schwach mit der hepatischen Expression von ATF3 ( $R^2 = 0,157$ ).

### 4.3.2 Expressionsanalysen von Ppp1r15a

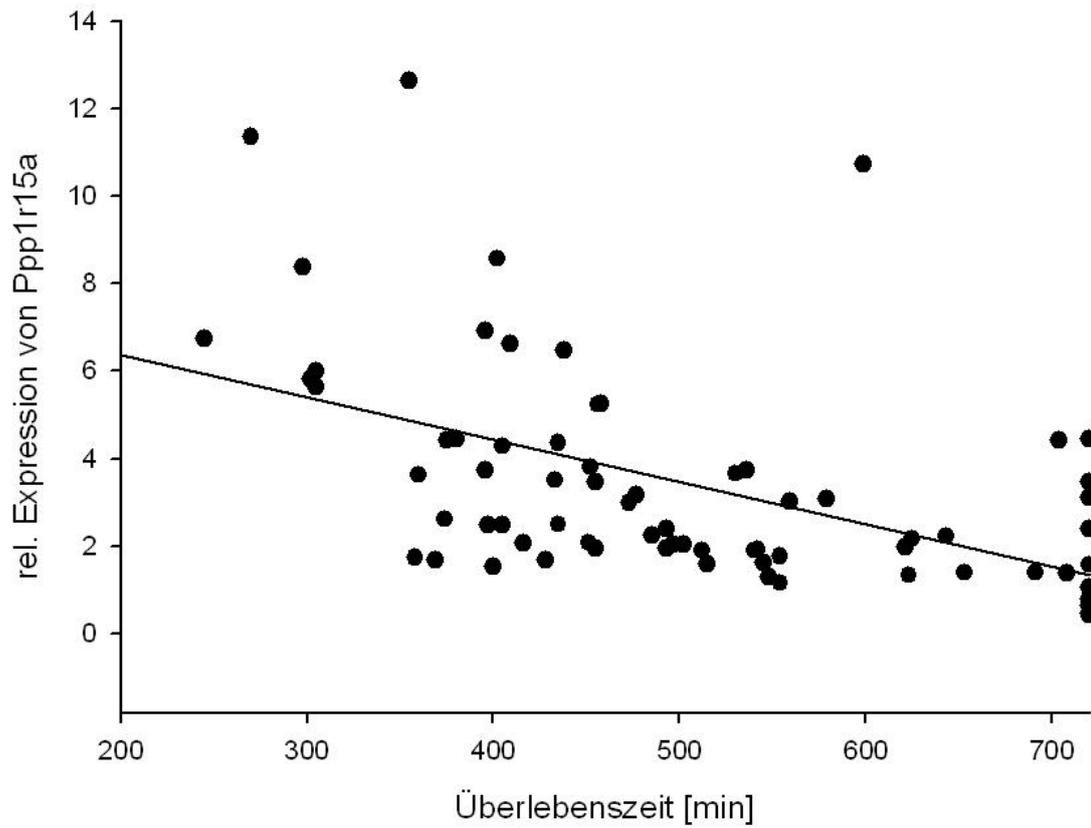
Die Versuchstiere in der ShV-Gruppe zeigten eine konstante Expression von Ppp1r15a mit einem MW von  $1,1 \pm 0,4$  (SD) (Abb. 14). Dem gegenüber steht ein Anstieg der Expression in der V-Gruppe mit einem MW von  $2,7 \pm 1,3$  (SD). Die M-0,01-Gruppe zeigte einen weiteren Anstieg der Expression mit einem MW von  $5,7 \pm 3,6$  (SD), der gegenüber der ShV-Gruppe signifikant war. In der M-0,1-Gruppe fiel die Expression wieder ab mit einem MW von  $3,4 \pm 2,4$  (SD) ohne signifikanten Unterschied zu einer anderen Therapiegruppe. Die M-1-Gruppe weist einen weiteren Abfall der Expression mit einem MW von  $2,2 \pm 1,0$  (SD) auf. Sie unterscheidet sich signifikant gegenüber der M-0,01-Gruppe. Die M-10-Gruppe wiederum zeigt einen MW von  $2,8 \pm 1,9$  (SD) ohne signifikanten Unterschied zu anderen Therapiegruppen.



**Abb. 14: Hepatische rel. Expression von Ppp1r15a in den Therapiegruppen**

Die Expression von Ppp1r15a ist nach Sepsis lediglich in der Gruppe M-0,01 signifikant erhöht. Dargestellt sind Mittelwerte +/- Standardabweichung. ShV = Scheinoperierte Kontrolle, V = Sepsis + Vehikel, M = Melatonin + angegebene Dosierung in mg/kg Körpergewicht

In der linearen Regressionsanalyse zwischen relativer Expression von Ppp1r15a in der Rattenleber und Überlebenszeit der Versuchstiere zeigt sich ein Regressionskoeffizient von  $R^2 = 0,268$  (Abb. 15).



**Abb. 15: Regressionsanalyse: Expression von Ppp1r15a und Überlebenszeit**

Die Überlebenszeit nach Sepsis korreliert nur schwach mit der hepatischen Expression von Ppp1r15a ( $R^2 = 0,268$ ).

## 5. Diskussion

### 5.1 Wertung der Methodik

#### 5.1.1 Tiermodell

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen optimalen Dosisbereich für die Therapie der polymikrobiellen Sepsis bzw. des septischen Schocks bei einer Einmalapplikation von Melatonin i.v. zu bestimmen, und den Einfluss der Sepsis und der Melatonintherapie auf die hepatische Expression der Gene ATF3 und Ppp1r15a zu analysieren.

In Zellkulturmodellen oder anderen *in vitro* Studien kann eine Betrachtung dieser Fragestellung nur sehr deterministisch erfolgen, da lediglich ein sehr kleiner Bereich des Organismus untersucht werden kann und Interaktionen zwischen Organsystemen des Organismus keine ausreichende Beachtung finden können. *In vivo* Modelle, wie das hier gewählte Modell der CLI-Sepsis bei der Ratte, berücksichtigen die Gesamtfunktion des Organismus und ermöglichen eine Betrachtung der Ergebnisse im Einfluss aller physiologischen und pathophysiologischen Prozesse. Dennoch kann eine Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen aufgrund der unterschiedlichen Physiologie der Ratte nur eingeschränkt stattfinden.

In der vorliegenden Studie wurden ausschließlich männliche Sprague-Dawley-Ratten betrachtet. Dadurch sollten eventuelle zyklusabhängige Hormoneinflüsse weiblicher Tiere auf die Untersuchungsergebnisse und ein möglicher positiver Einfluss von Östrogenen auf den Krankheitsverlauf in der Sepsis ausgeschlossen werden [40, 188, 195]. Da der physiologische Melatoninspiegel der Tiere tageszeitlichen Schwankungen unterliegt (vgl. Kapitel 2.2.1, Abb. 2), wurden alle Versuche zum gleichen Tageszeitpunkt durchgeführt, um eine Verfälschung der Ergebnisse zu vermeiden.

Die Sepsisinduktion bei Versuchstieren kann auf unterschiedliche Weise erfolgen. Das am weitesten verbreitete Modell ist das 1980 von Wichterman *et al.* beschriebene Verfahren durch coecale Ligatur und Punktion (CLP) [242], das durch anhaltenden Stuhlaustritt in das Abdomen zu einer Peritonitis mit konsekutiver Sepsis führt [206]. Weitere Modelle der Sepsisinduktion bei der Ratte sind der 2007 von Lustig *et al.* beschriebene Colon ascendens Stent (CASP) [141] und das 2009 von Scheiermann *et al.* etablierte Modell der coecalen Ligatur und Inzision (CLI) [206]. Die ebenfalls weit verbreitete Methodik der systemischen Applikation von Lipopolysacchariden führt lediglich zu einer Endotoxinämie, die laut Fink *et al.* und Wichterman *et al.* von der Sepsis im Sinne der Definition der European Society of

Intensive Care Medicine getrennt betrachtet werden muss [60, 242]. Solche Modelle eignen sich nur sehr eingeschränkt für die Beschreibung des klinischen Bildes von Patienten mit Sepsis infolge bakterieller Peritonitis [206] und wurden deshalb für die Fragestellungen in der vorliegenden Arbeit nicht verwendet. Beim Modell der CLP-Sepsis wird häufig der langsam fortschreitende Progress des septischen Krankheitsbildes kritisiert, der die reale Situation eines akuten Krankheitsbeginns ebenfalls nur begrenzt widerspiegelt [203, 219]. Außerdem hängt der Verlauf der Sepsis hier stark von der Größe der Punktion ab [144, 173]. Maier *et al.* postulierten 2004, dass CLP eher das Modell eines intraabdominellen Abszesses darstelle als das einer intraabdominellen Sepsis [144], da die Punktionsstelle nach 24 h bereits wieder von adhesiven Darmschlingen verschlossen sei. Beim CASP-Modell zeigt sich ebenfalls eine Abhängigkeit des Krankheitsverlaufs vom Stent-Durchmesser, auch wenn hier die Punktionsstelle auch nach 24 h noch offen war [144]. Das CASP-Modell repräsentiert eher den klinischen Verlauf einer diffusen Peritonitis mit stetig ansteigenden Zeichen einer systemischen Inflammation [144].

Das CLI-Modell der Sepsis wurde von Scheierman *et al.* 2009 auf der Basis des CLP-Modells etabliert [206]. Es konnte gezeigt werden, dass mit diesem Modell eine rapide und fulminante Form der Sepsis geschaffen wird, die nicht nur alle Kriterien von Sepsis und septischem Schock erfüllt (vgl. Kapitel 2.1.1), sondern auch in zeitlichem Verlauf des Blutdruckverhaltens der Tiere, des Basenüberschusses sowie des pH-Werts und der Sterblichkeit eine geeignete Darstellung der schweren Sepsis bzw. des septischen Schocks ist [206]. Allerdings ist der Einfluss einer konventionellen zielgerichteten Sepsistherapie (z.B. Volumensubstitution, Antibiotikatherapie) auf dieses Modell bislang noch unzureichend untersucht [206]. Dennoch ist es zur Repräsentation des fulminanten Krankheitsverlaufs einer schweren Sepsis bei Peritonitis beispielsweise nach Hohlorganperforation geeignet, was sich auch in vorangegangenen Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe zeigte [61]. So konnte anhand dieses Modells bereits eine signifikante Verlängerung der Überlebenszeit der Ratten durch Melatonin-Gabe nachgewiesen werden. Nicht zuletzt deshalb wurde das Modell für die vorliegenden Untersuchungen ausgewählt.

### 5.1.2 Genexpressionsanalyse mittels RT-qPCR

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung intrazellulärer Effekte von Melatonin in der Leber. Basis hierfür stellen die Analyse der Genexpressionsmuster der Zelle und insbesondere die Veränderung der Genexpression auf RNA-Ebene nach Melatonintherapie dar.

Unter den zahlreichen Methoden zur Durchführung solcher Expressionsanalysen (z.B. Northern Blot [4], SAGE [232], Microarray [207]) stellt die RT-qPCR eine Standardmethode dar, die sich durch einfache Durchführung und hohe Sensitivität und Spezifität auszeichnet [90]. Trotz zunehmender Etablierung der Microarray-Untersuchungen und der SAGE-Methode mit immer exakteren mathematischen Modellen zur Auswertung und deren Eigenschaft, sehr viele Gene in kurzer Zeit analysieren zu können, wird Sensitivität und Spezifität der RT-qPCR-Methodik von anderen Verfahren bislang kaum erreicht. So hat sich die Methodik der RT-qPCR inzwischen zu einer weit verbreiteten Methode in der Molekularbiologie entwickelt [28, 69, 75, 90] und stellt auch in medizinischen Bereichen ein verbreitetes Instrument der Diagnostik dar [28, 75]. Aus diesen Gründen kam die RT-qPCR-Technik auch für die vorliegenden Expressionsanalysen zur Anwendung.

Ein Problem der RT-qPCR Technik besteht darin, dass für jeden einzelnen Schritt von der Gewebeaufarbeitung über die PCR-Analyse an sich bis hin zur Datenauswertung zahlreiche Varianten in der Methodik existieren und daher eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse dieser hochsensitiven Technik mit denen anderer Forschungsgruppen nicht immer uneingeschränkt möglich ist [29]. Um eine Vereinheitlichung in der Darstellung der Ergebnisse und dadurch eine Vergleichbarkeit von Ergebnissen untereinander zu ermöglichen, legten Bustin *et al.* 2009 Leitlinien fest, die Punkte wie beispielsweise Analysemethoden und Qualitätskontrollen ansprechen und ein Anforderungsprofil für die Publikation von RT-qPCR Ergebnissen formulieren [29]. Diese „Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments“ (MIQE-Guidelines) haben zum Ziel, eine international einheitliche und transparente Darstellung der RT-qPCR-Ergebnisse zu etablieren und eine Evaluation der Ergebnisse zu ermöglichen [29]. Aus diesen Gründen erfolgten die Auswahl der Methodik, die Durchführung der Experimente sowie die Ergebnispräsentation der vorliegenden Arbeit in Anlehnung an diese Leitlinien.

Zur Auswertung und Analyse der Rohdaten stehen verschiedene mathematische Modelle zur Verfügung. Variierbar sind hierbei die Methode der Cq-Wert-Determinierung und das mathematische Modell zur Endauswertung der Cq-Werte. Bei der Cq-Determinierung kam in der vorliegenden Arbeit das Modell der Bestimmung mittels nicht-linearer Regression

nach der Richards-Funktion zur Anwendung. Guescini *et al.* konnten 2008 zeigen, dass diese Methode den „klassischen“ Methoden der Bestimmung eines Ct-Wertes (anwenderabhängige Festlegung einer Geraden an den Fluoreszenzkurven parallel zu x-Achse) oder Cp-Wertes (Bestimmung über die zweite Ableitung der Fluoreszenzkurven) überlegen ist [75]. Diese „Cy<sub>0</sub>-Methode“ soll die Abhängigkeit des Cq-Wertes von der PCR-Kinetik minimieren [75].

Zur relativen Quantifizierung (Endauswertung) stehen ebenfalls verschiedene Modelle zur Verfügung (Berechnung über Standard-Kurve / nach Livak [134] / nach Pfaffl [180] etc.). Die Wahl des geeigneten Modells hängt von den Versuchsbedingungen ab. Das 2001 von Livak *et al.* erstellte Modell der  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode normalisiert in zwei Schritten erst jede Probe gegen eine Referenz und dann nochmals gegen einen Kalibrator zur Ermittlung einer relativen Expression [134]. Da in der vorliegenden Studie die Referenzwerte (aus der Expressionsanalyse ribosomaler Proteine, vgl. Kapitel 3.2.5) ermittelt wurden und die Expressionswerte jeder Probe gegen eine Vergleichsgruppe (ShV, vgl. Kapitel 3.2.5) normalisiert werden sollten, entsprachen die Vorgaben dem  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Modell nach Livak. Die Primereffizienz von Rps16, die mit 107,2 % gering von den Vorgaben abweicht (vgl. Kapitel 3.2.4), wurde als tolerierbar angesehen, da es zwischen den Effizienzen der Ziel- und Referenzgene keine Abweichung von mehr als 5 % gab. Darüber hinaus ist die Reaktionseffizienz mit der Cq-Determinierung über Cy<sub>0</sub> von geringer Relevanz (die Problematik der unterschiedlichen Reaktionseffizienzen ist nach Guescini *et al.* durch Cy<sub>0</sub> minimiert [75]).

## 5.2 Diskussion der Ergebnisse

### 5.2.1 Letalitätsstudie

Die vorliegende Studie hatte zum Ziel, die Dosisabhängigkeit des Effekts von Melatonin auf die Überlebenszeit nach polymikrobieller Sepsis bei der Ratte zu untersuchen und gegebenenfalls eine optimale Melatoninindosis zu finden. Ebenso sollte untersucht werden, ob eine hohe Dosierung von Melatonin gegebenenfalls negative Effekte mit sich bringt.

Während die mit Vehikel behandelte Versuchsgruppe eine recht konstante Überlebenszeit mit ca. 7 h zeigte, nahm die Streubreite bei der M-0,01-Gruppe bei kaum veränderter mittlerer Überlebenszeit deutlich zu. In dieser Dosierung war allerdings noch kein Effekt im Sinne einer Beeinflussung der Überlebenszeit durch Melatoninapplikation zu erkennen. In der M-0,1-Gruppe zeigte sich jedoch bereits eine signifikante Verbesserung der Überlebenszeiten gegenüber der Vehikel-Gruppe und der M-0,01-Gruppe. Ab dieser Dosierung erreichten auch einige Versuchstiere die Zwölf-Stunden-Grenze des Versuchs, während in der V- und der M-0,01-Gruppe kein Tier eine derart lange Überlebenszeit nach Sepsisinduktion erreichte. Dieser Effekt scheint sich allerdings auch bei höheren Dosierungen von Melatonin nicht mehr weiter zu verändern. Melatonin führt demnach zu einem signifikant verlängerten Überleben nach polymikrobieller Sepsis, was auch schon von anderen Autoren gezeigt wurde [196, 241, 247, 249, 253]. Die vorliegenden Ergebnisse lassen allerdings auch die Annahme zu, dass der günstige Effekt von Melatonin auf die Überlebenszeit eine Dosisabhängigkeit aufweist. Weiterhin legen die Resultate nahe, dass sich der günstigste Dosisbereich zwischen 0,1 mg/kg KG und 10 mg/kg KG befindet.

Die durchgeführte nicht-lineare Regressionsanalyse unterstützt die These, dass der günstigste Effekt auf die Überlebenszeit der Tiere bei einer Dosierung von 1,0 mg/kg KG auftritt und sich durch höhere Dosierungen nicht weiter steigern lässt. Auch der Verlauf der Näherungskurve lässt hier die Vermutung zu, dass ein Sättigungseffekt der Melatoninwirkung vorliegen könnte.

Es zeigten sich in allen Therapiegruppen große interindividuelle Unterschiede in der Überlebenszeit, was sich in hohen Standardabweichungen widerspiegelt. Insbesondere in den Gruppen M-0,1 und M-10 zeigen sich mitunter Standardabweichungen von über zwei Stunden. Die teils großen interindividuellen Unterschiede in den Therapiegruppen konnten *Mistraletti et al.* bereits am Menschen nachweisen; bezüglich der Melatonin-

Bioverfügbarkeit bei schwerkranken Patienten zeigten sie, dass trotz generell guter Verfügbarkeit große Unterschiede zwischen den Patienten auftraten [156].

Die Ergebnisse von Maestroni *et al.* lassen bereits die Vermutung zu, dass eine Dosisabhängigkeit der Melatoninwirkung bei subcutaner Applikation vorliegen könnte [143]. Ob diese Ergebnisse sich aber auf die intravenöse Applikation und auf die Therapie der Sepsis übertragen lassen, wurde bislang nicht untersucht. Unsere Ergebnisse geben Hinweise darauf, dass tatsächlich eine Dosisabhängigkeit der Melatoninwirkung auch bei intravenöser Einmalgabe vorliegt und unterstützen so die These Maestronis.

In der vorliegenden Untersuchung wurde durch die Betrachtung der Überlebenszeiten der Tiere der Gesamtorganismus betrachtet. Ob die Vermutung, dass ein Sättigungseffekt der Melatoninwirkung eintritt, auch auf die Melatonin-Effekte im molekularen Bereich (rezeptorabhängige und -unabhängige Signalwege, antioxidative Wirkungen etc.) reduziert werden kann, ist noch unbekannt. Lediglich in einer aktuellen Studie von Lowes *et al.* 2011 wurde in einem Zellkulturmodell mit LPS-stimulierten humanen Endothelzellen eine Dosisabhängigkeit des Effekts von Melatonin auf die NFκB-Aktivierung gezeigt [136]. Bei gleichen Versuchsbedingungen konnte jedoch keine Dosisabhängigkeit der Melatoninwirkung auf die Zytokinspiegel von IL-6, IL-8 und GSH-Level nachgewiesen werden.

Vorangegangene Ergebnisse unserer und anderer Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass eine Melatonintherapie zahlreiche organprotektive Effekte mit sich bringt [150] und erfolgreich die Symptome des septischen Schocks reduzieren kann [57]. Dosisabhängigkeiten konnten hier allerdings bei Melatonintherapie im septischen Schock bislang noch nicht gezeigt werden. Unsere Daten geben Hinweise darauf, dass diese positiven Effekte bei der Therapie der Sepsis von der Melatoninindosierung abhängen. Ein günstiger Dosisbereich kann für die intravenöse Einmalapplikation im Bereich von 0,1 mg/kg KG bis 10 mg/kg KG, mit einem Optimum bei 1,0 mg/kg KG, vermutet werden. Ein negativer Effekt von Melatonin bei den gewählten Dosierungen auf die Überlebenszeit konnte durch unsere Ergebnisse nicht wiedergegeben werden.

## 5.2.2 Genexpressionsanalysen

Ziel des zweiten Versuchsabschnitts war es, Veränderungen des hepatischen Genexpressionsverhaltens von ATF3 und Ppp1r15a in Abhängigkeit der applizierten Melatoninkonzentration im septischen Schock zu untersuchen.

### 5.2.2.1 Expressionsanalysen von ATF3

In der scheinoperierten Gruppe (ShV) zeigte sich eine konstante hepatische Expression mit sehr geringer SD von ATF3, während in der Vehikel-Gruppe (V) ein signifikanter Anstieg der Expression zu verzeichnen war. Dies ist vereinbar mit den Ergebnissen, die von unserer Arbeitsgruppe bereits für dieses Gen im Zusammenhang mit hämorrhagischen Schockmodellen beschrieben wurden. Eine Melatonintherapie mit 0,01 mg/kg KG führte zu einem weiteren leichten Anstieg der hepatischen ATF3-Expression, die sich wiederum signifikant von der ShV-Gruppe unterscheidet. Bei höheren Melatonin-Dosierungen von 0,1 mg/kg KG und 1 mg/kg KG veränderte sich die Expression mit steigender Dosierung wieder in Richtung der Werte der ShV-Gruppe. Beide Therapiegruppen unterscheiden sich bzgl. der ATF3-Expression nicht signifikant von der ShV-Gruppe. Allerdings ist die Reduktion der Expression auch nicht signifikant verschieden von der V-Gruppe. Hier könnte man einen Trend zur Beeinflussung der Expression durch die Melatonintherapie in Richtung der physiologischen Werte vermuten.

Bei der Regressionsanalyse der rel. Expression von ATF3 in der Leber gegenüber der Überlebenszeit fällt eine große Streuung der rel. Expression über die gesamte Spanne der Überlebenszeit auf. Dies zeigt sich auch im Resultat der Regressionsanalyse, die mit einem Regressionskoeffizienten von  $R^2 = 0,157$  einen nur geringen linearen Zusammenhang zwischen den Parametern zeigt. An dieser Stelle muss allerdings beachtet werden, dass keine pauschale Beurteilung der Relevanz von ATF3 im Zusammenhang mit der Letalitätsverringerung getroffen werden kann, da lediglich das Expressionsprofil in der Leber der Versuchstiere evaluiert wurde.

Insgesamt ist für ATF3 kein eindeutiger Zusammenhang zwischen hepatischer Genexpression und Melatoninkonzentration bzw. der Überlebenszeit darstellbar, was vermuten lässt, dass hinsichtlich der Genexpression im septischen Schock andere pathophysiologische Mechanismen eine Rolle spielen als im hämorrhagischen Schock.

Bereits 1991 publizierten Hsu *et al.* Daten, die Hinweise auf eine induzierte Expression von ATF3 in geschädigter bzw. regenerierender Rattenleber nach Teilresektion geben [99]. Die Ergebnisse, die sich hinsichtlich der gesteigerten Expression in der Vehikel-Gruppe zeigten,

korrelieren mit den Erkenntnissen, dass ATF3 unter Stressbedingungen *in vitro* [117, 138] und gerade in geschädigter Leber *in vivo* vermehrt exprimiert wird [37]. Die These, dass die ATF3-Expression im Zusammenhang mit der hepatoprotektiven Wirkung von Melatonin stehen könnte, stützt sich neben den Microarray-Ergebnissen unserer AG im Zusammenhang mit ATF3 im hämorrhagischen Schock auf vorhandene Daten, die u.a. zellprotektive Wirkungen bei ATF3-Suppression bei der Maus [256] zeigen. Überwiegend wird ATF3 sowohl in der Zellkultur als auch im Tiermodell in Zusammenhang mit apoptotischen Funktionen von Zellen gebracht [106, 117, 137, 138, 239]. Allerdings werden die Effekte von ATF3 generell kontrovers diskutiert. Auch Ergebnisse mit gegenteiligen Daten liegen vor, die eine Verstärkung der hepatozellulären Proliferation durch ATF3 *in vitro* [1] sowie leberprotektive Effekte [201] ebenso wie generell durch ATF3 vermittelte organprotektive Effekte bei der Maus zeigen [254]. Auch protektive Wirkungen bei inflammatorischen Syndromen in der Zellkultur wurden bereits beschrieben [67], was eine Erklärung dafür sein könnte, dass unsere Ergebnisse im septischen Schock von denen im hämorrhagischen Schockmodell abweichen. Thompson *et al.* vermuteten 2009 Nachteile einer ATF3 Defizienz bei septischem Schock [226], was die Vermutung einer alternativen Rolle zu der im hämorrhagischen Schock untermauern könnte.

Diese kontroverse Datenlage von ATF3 wirft die Frage auf, ob seine Funktion überhaupt isoliert betrachtet werden darf. Einige Autoren postulieren, dass die Funktion von ATF3 nicht einheitlich definiert werden kann [77], sondern vielmehr von anderen ATF / CREB abhängt [226]. Es stellt sich die Frage, ob eine Betrachtung von ATF3 unabhängig von seiner der zweiten Isoform (ATF3deltaZip2), die im Zellkulturmodell eventuell regulatorische Einflüsse auf die ATF3-Funktion hat [36, 86], sinnvoll ist.

Nicht untersucht wurde im Rahmen dieser Studie, ob die Beeinflussung der ATF3-Expression durch Melatonin überhaupt direkt erfolgt oder ob andere Faktoren durch Melatonin beeinflusst werden, die sich ihrerseits auf die ATF3-Expression auswirken.

Eine Schlüsselfunktion der hepatischen ATF3-Expression in der Verbesserung der Überlebenszeit scheint aber eher nicht vorzuliegen, auch wenn die Ergebnisse eine gewisse Rolle von ATF3 in der Pathophysiologie der Sepsis und auch in der Wirkung von Melatonin in der Leber nicht ausschließen. Eine Beeinflussung der Genexpression, wie sie beim hämorrhagischen Schockmodell der Ratte in der Leber gezeigt wurde, kann beim betrachteten Modell des septischen Schocks und seiner Behandlung durch Melatonin anhand der vorliegenden Ergebnisse nicht bestätigt werden.

### 5.2.2.2 Expressionsanalysen von Ppp1r15a

In der ShV-Gruppe zeigte sich eine recht konstante Expression von Ppp1r15a / GADD34, während in der Vehikel-Gruppe nur ein geringer Anstieg der Expression von Ppp1r15a gegenüber ShV zu verzeichnen war. Relevante Änderungen der hepatischen Expression im septischen Schock, wie in den vorliegenden Ergebnissen aus Untersuchungen im hämorrhagischen Schockmodell, scheinen hier in der Leber eher nicht vorzuliegen. In der M-0,01-Gruppe ist allerdings ein Anstieg der Expression zu verzeichnen, der gegenüber der ShV-Gruppe signifikant ist. Bei höheren Dosierungen nimmt die hepatische relative Expression von Ppp1r15a wieder ab und unterscheidet sich bei der M-1-Gruppe signifikant gegenüber der M-0,01-Gruppe. Weitere signifikante Unterschiede finden sich im Vergleich der unterschiedlichen Therapiegruppen nicht, weshalb hier allenfalls ein leichter Trend der Expressionsänderung durch Melatonin vermutet werden kann, wobei die rel. Expressionen in der M-1-Gruppe und M-10-Gruppe eher wieder in Richtung der Werte der V-Gruppe tendieren. Es stellt sich die Frage, ob Ppp1r15a eine relevante Rolle in der Pathophysiologie des septischen Schocks spielt. Die auffallend großen Standardabweichungen in allen Therapiegruppen, insbesondere in den M-0,01 und M-0,1-Gruppen, in denen die relativen Expressionen mäßig erhöht sind, unterstützen die Vermutung, dass zwischen der hepatischen Expression von Ppp1r15a und den pathophysiologischen Veränderungen im Rahmen des septischen Schocks (sowohl unter Melatonintherapie als auch ohne Therapie) kein direkter Zusammenhang besteht.

Die lineare Regressionsanalyse zeigt ein Ergebnis von  $R^2 = 0,268$ , was die Vermutung nahe legt, dass die Überlebenszeit der Tiere nur gering mit der hepatischen Expression von Ppp1r15a korreliert.

Neben den Ergebnissen aus den Microarray-Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe bezüglich der hepatischen Expression im hämorrhagischen Schockmodell liegen auch Daten vor, die Hinweise auf eine Rolle von Ppp1r15a im pathophysiologischen Geschehen der Sepsis geben könnten. So wurde gezeigt, dass die Induktion von Ppp1r15a eine zelluläre Antwort auf Stress darstellt, die mit Apoptose korreliert [96, 210] und einen Wachstumsstopp der Zelle bei oxidativem Stress bewirkt [120, 170], ebenso wie einen „Shift“ von translationaler Repression zu stressinduzierter Genexpression der Zelle [167]. 2003 wurde außerdem von Hung *et al.* postuliert, dass eine Beeinflussung der GADD34-Funktion das Überleben von Zellen unter Stressbedingungen verbessert [101]. Diese Daten und Ergebnisse bezüglich veränderter Expression des Gens bei LPS-Stimulierung [120] legten die Vermutung nahe, dass dieses Gen auch an den hepatoprotektiven Effekten von

Melatonin in der Sepsis beteiligt sein könnte, was im Rahmen des vorliegenden Untersuchungsmodells allerdings nicht bestätigt werden konnte.

Brush *et al.* beschrieben, dass der intrazelluläre Gehalt von Ppp1r15a als Antwort auf zellulären Stress sehr rasch ansteigt und bei Regeneration der Zelle auch schnell wieder abfällt [26]. Dies könnte eine Erklärung dafür sein, warum in der vorliegenden Studie nur geringe Änderungen in der Ppp1r15a-Expression verzeichnet werden konnten, da alle hier untersuchten Organproben erst nach Todeseintritt der Tiere entnommen wurden.

Weiterhin liegen Daten vor, die zeigen, dass Signale der GADD-Gene auch davon abhängig sind, in welchem Stadium des Zellzyklus sich die Zelle zum Zeitpunkt des „Schadens“ befindet [103]. Da allerdings für die vorliegende Studie nicht isolierte Zellen, sondern Gesamtgewebe untersucht wurden, ist ein diesbezüglicher Einfluss auf die vorliegenden Resultate unwahrscheinlich.

Auch wenn die aktuelle Datenlage zur hepatischen Expression von Ppp1r15a im Zusammenhang mit der Sepsis bislang keine eindeutigen Ergebnisse lieferte, so wurde durch die Hochregulation des Gens bei Ischämie und seinen Wirkungen auf DNA-Reparatur und Proteinsynthese bereits 2004 von White *et al.* Einflüsse auf das Überleben der Zelle vermutet [238]. Diese Vermutung konnten wir bei Betrachtung des Überlebens des Gesamtorganismus jedoch im Zusammenhang mit der hepatischen Expression des Gens nicht bestätigen.

Zu beachten ist an dieser Stelle, dass die Expression dieses Gens lediglich in der Leber der Versuchstiere betrachtet wurde und somit keine Aussage zur Relevanz im Gesamtorganismus getroffen werden kann. Weiterhin liegen Daten vor, die zeigen, dass dieses Gen bei zellulärem Stress nicht nur transkriptionell verändert ist, sondern auch einer veränderten translationalen Regulation unterliegt [130]. Dies untermauert, dass eine abschließende Beurteilung von Ppp1r15a in der beschriebenen Fragestellung noch nicht erfolgen kann, da die Proteinebene im Rahmen dieser Studie nicht untersucht wurde.

Aufgrund unserer Ergebnisse und der aktuellen Datenlage kann an dieser Stelle keine abschließende Beurteilung der Funktion von Ppp1r15a in der Leber im Zusammenhang mit septischem Schock, Melatonintherapie und Überlebenszeit der Versuchstiere erfolgen.

### 5.3 Schlussfolgerung

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Verringerung der Letalität durch Melatonin nach polymikrobieller Sepsis bei einmaliger intravenöser Applikation eine Dosisabhängigkeit aufweist. Ein optimaler Dosisbereich für die Melatoninapplikation scheint bei 1,0 mg/kg KG zu liegen. Negative Effekte auf die Überlebenszeit konnten in unseren Untersuchungen bei den gewählten Dosierungen nicht nachgewiesen werden.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse zur Dosierung von Melatonin könnten ein weiterer Schritt bei der Etablierung von Melatonin in der Sepsistherapie „from bench to bedside“ sein.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten molekularbiologischen Experimente zeigen, dass sich die Expression von ATF3 in der Leber während des septischen Schocks ändert, diese Änderung aber durch Melatoninapplikation in verschiedenen Dosisbereichen nicht signifikant beeinflusst wird.

Bezüglich Ppp1r15a konnte demonstriert werden, dass die hepatische relative Expression im Rahmen des septischen Schocks ebenfalls keine signifikante Veränderung gegenüber der Vergleichsgruppe aufweist. Auch hier lässt sich eine Beeinflussung der relativen Expression durch Melatoninapplikation nicht eindeutig nachweisen.

Eine eindeutige Korrelation zwischen relativer hepatischer Expression und der Überlebenszeit der Tiere konnte für beide Gene nicht gezeigt werden.

Die Ergebnisse der durchgeführten Experimente legen nahe, dass die transkriptionelle Regulation von ATF3 und Ppp1r15a in der Leber bei septischem Schock sowie bezüglich der hepatoprotektiven Effekte von Melatonin eine untergeordnete Rolle spielen.

Weitere, umfassendere Studien zur Untersuchung von Genregulation, transkriptioneller und translationaler Prozesse sind nötig, um die molekularen Mechanismen der melatonininduzierten Hepatoprotektion zu untersuchen.

## 6. Literaturverzeichnis

- 1 Allan AL, Albanese C, Pestell RG, LaMarre J (2001) Activating transcription factor 3 induces DNA synthesis and expression of cyclin D1 in hepatocytes. *J Biol Chem* **276**: 27272-27280
- 2 Allen-Jennings AE, Hartman MG, Kociba GJ, Hai T (2001) The roles of ATF3 in glucose homeostasis. A transgenic mouse model with liver dysfunction and defects in endocrine pancreas. *J Biol Chem* **276**: 29507-29514
- 3 Altun A, Ugur-Altun B (2007) Melatonin: therapeutic and clinical utilization. *Int J Clin Pract* **61**: 835-845
- 4 Alwine JC, Kemp DJ, Stark GR (1977) Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 5350-5354
- 5 Ameyar M, Wisniewska M, Weitzman JB (2003) A role for AP-1 in apoptosis: the case for and against. *Biochimie* **85**: 747-752
- 6 Anton-Tay F, Ramirez G, Martinez I, Benitez-King G (1998) In vitro stimulation of protein kinase C by melatonin. *Neurochem Res* **23**: 601-606
- 7 Arendt J (1998) Complex effects of melatonin. *Therapie* **53**: 479-488
- 8 Arendt J (1998) Melatonin and the pineal gland: influence on mammalian seasonal and circadian physiology. *Rev Reprod* **3**: 13-22
- 9 Bagci S, Horoz O, Yildizdas D, Reinsberg J, Bartmann P, Mueller A (2012) Melatonin status in pediatric intensive care patients with sepsis. *Pediatr Crit Care Med* **13**: 120-123
- 10 Banach M, Gurdziel E, Jedrych M, Borowicz KK (2011) Melatonin in experimental seizures and epilepsy. *Pharmacol Rep* **63**: 1-11
- 11 Barjavel MJ, Mamdouh Z, Raghbate N, Bakouche O (1998) Differential expression of the melatonin receptor in human monocytes. *J Immunol* **160**: 1191-1197
- 12 Barochia AV, Cui X, Vitberg D, Suffredini AF, O'Grady NP, Banks SM, Minneci P, Kern SJ, Danner RL, Natanson C, Eichacker PQ (2010) Bundled care for septic shock: an analysis of clinical trials. *Crit Care Med* **38**: 668-678
- 13 Baykal A, Iskit AB, Hamaloglu E, Guc MO, Hascelik G, Sayek I (2000) Melatonin modulates mesenteric blood flow and TNFalpha concentrations after lipopolysaccharide challenge. *Eur J Surg* **166**: 722-727
- 14 Becker C, Riedmaier I, Pfaffl MW (2009) MIQE-Guidelines, RNA-Qualitätskontrolle in der Genexpressionsanalytik *BIOSpektrum* **15**: 512-515

- 15 Bettahi I, Pozo D, Osuna C, Reiter RJ, Acuna-Castroviejo D, Guerrero JM (1996) Melatonin reduces nitric oxide synthase activity in rat hypothalamus. *J Pineal Res* **20**: 205-210
- 16 Bhat KS, Morrison SG (1993) Primary structure of human ribosomal protein S21. *Nucleic Acids Res* **21**: 2939
- 17 Bone RC, Fisher CJ, Jr., Clemmer TP, Slotman GJ, Metz CA, Balk RA (1989) Sepsis syndrome: a valid clinical entity. Methylprednisolone Severe Sepsis Study Group. *Crit Care Med* **17**: 389-393
- 18 Bosscha K, van Vroonhoven TJ, van der Werken C (1999) Surgical management of severe secondary peritonitis. *Br J Surg* **86**: 1371-1377
- 19 Bourne RS, Mills GH, Minelli C (2008) Melatonin therapy to improve nocturnal sleep in critically ill patients: encouraging results from a small randomised controlled trial. *Crit Care* **12**: R52
- 20 Boyce M, Bryant KF, Jousse C, Long K, Harding HP, Scheuner D, Kaufman RJ, Ma D, Coen DM, Ron D, Yuan J (2005) A selective inhibitor of eIF2alpha dephosphorylation protects cells from ER stress. *Science* **307**: 935-939
- 21 Brinkhof B, Spee B, Rothuizen J, Penning LC (2006) Development and evaluation of canine reference genes for accurate quantification of gene expression. *Anal Biochem* **356**: 36-43
- 22 Brown SL, Sekhar KR, Rachakonda G, Sasi S, Freeman ML (2008) Activating transcription factor 3 is a novel repressor of the nuclear factor erythroid-derived 2-related factor 2 (Nrf2)-regulated stress pathway. *Cancer Res* **68**: 364-368
- 23 Bruck R, Aeed H, Avni Y, Shirin H, Matas Z, Shahmurov M, Avinoach I, Zozulya G, Weizman N, Hochman A (2004) Melatonin inhibits nuclear factor kappa B activation and oxidative stress and protects against thioacetamide induced liver damage in rats. *J Hepatol* **40**: 86-93
- 24 Brunkhorst FM (2006) [Epidemiology, economy and practice -- results of the German study on prevalence by the competence network sepsis (SepNet)]. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* **41**: 43-44
- 25 Brush MH, Weiser DC, Shenolikar S (2003) Growth arrest and DNA damage-inducible protein GADD34 targets protein phosphatase 1 alpha to the endoplasmic reticulum and promotes dephosphorylation of the alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor 2. *Mol Cell Biol* **23**: 1292-1303
- 26 Brush MH, Shenolikar S (2008) Control of cellular GADD34 levels by the 26S proteasome. *Mol Cell Biol* **28**: 6989-7000
- 27 Brzezinski A (1997) Melatonin in humans. *N Engl J Med* **336**: 186-195
- 28 Bustin SA, Mueller R (2005) Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. *Clin Sci (Lond)* **109**: 365-379

- 29 Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT (2009) The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* **55**: 611-622
- 30 Cagnoli CM, Atabay C, Kharlamova E, Manev H (1995) Melatonin protects neurons from singlet oxygen-induced apoptosis. *J Pineal Res* **18**: 222-226
- 31 Carreras MC, Franco MC, Peralta JG, Poderoso JJ (2004) Nitric oxide, complex I, and the modulation of mitochondrial reactive species in biology and disease. *Mol Aspects Med* **25**: 125-139
- 32 Carrillo-Vico A, Lardone PJ, Naji L, Fernandez-Santos JM, Martin-Lacave I, Guerrero JM, Calvo JR (2005) Beneficial pleiotropic actions of melatonin in an experimental model of septic shock in mice: regulation of pro-/anti-inflammatory cytokine network, protection against oxidative damage and anti-apoptotic effects. *J Pineal Res* **39**: 400-408
- 33 Catala A, Zvara A, Puskas LG, Kitajka K (2007) Melatonin-induced gene expression changes and its preventive effects on adriamycin-induced lipid peroxidation in rat liver. *J Pineal Res* **42**: 43-49
- 34 Chan AS, Lai FP, Lo RK, Voyno-Yasenetskaya TA, Stanbridge EJ, Wong YH (2002) Melatonin mt1 and MT2 receptors stimulate c-Jun N-terminal kinase via pertussis toxin-sensitive and -insensitive G proteins. *Cell Signal* **14**: 249-257
- 35 Chaum E, Yin J, Yang H, Thomas F, Lang JC (2009) Quantitative AP-1 gene regulation by oxidative stress in the human retinal pigment epithelium. *J Cell Biochem* **108**: 1280-1291
- 36 Chen BP, Liang G, Whelan J, Hai T (1994) ATF3 and ATF3 delta Zip. Transcriptional repression versus activation by alternatively spliced isoforms. *J Biol Chem* **269**: 15819-15826
- 37 Chen BP, Wolfgang CD, Hai T (1996) Analysis of ATF3, a transcription factor induced by physiological stresses and modulated by gadd153/Chop10. *Mol Cell Biol* **16**: 1157-1168
- 38 Choi SI, Joo SS, Yoo YM (2008) Melatonin prevents nitric oxide-induced apoptosis by increasing the interaction between 14-3-3beta and p-Bad in SK-N-MC cells. *J Pineal Res* **44**: 95-100
- 39 Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**: 156-159
- 40 Christaki E, Opal SM, Keith JC, Jr., Kessianian N, Palardy JE, Parejo NA, Lavallie E, Racie L, Mounts W, Malamas MS, Mewshaw RE, Harris HA, Vlasuk GP (2010) Estrogen receptor beta agonism increases survival in experimentally induced sepsis and ameliorates the genomic sepsis signature: a pharmacogenomic study. *J Infect Dis* **201**: 1250-1257
- 41 Colak C, Parlakpınar H, Ozer MK, Sahna E, Cigremis Y, Acet A (2007) Investigating the protective effect of melatonin on liver injury related to myocardial ischemia-reperfusion. *Med Sci Monit* **13**: BR251-254

- 42 Connor JH, Weiser DC, Li S, Hallenbeck JM, Shenolikar S (2001) Growth arrest and DNA damage-inducible protein GADD34 assembles a novel signaling complex containing protein phosphatase 1 and inhibitor 1. *Mol Cell Biol* **21**: 6841-6850
- 43 Connors AF, Jr., Speroff T, Dawson NV, Thomas C, Harrell FE, Jr., Wagner D, Desbiens N, Goldman L, Wu AW, Califf RM, Fulkerson WJ, Jr., Vidaillet H, Broste S, Bellamy P, Lynn J, Knaus WA (1996) The effectiveness of right heart catheterization in the initial care of critically ill patients. SUPPORT Investigators. *JAMA* **276**: 889-897
- 44 Costa EJ, Shida CS, Biaggi MH, Ito AS, Lamy-Freund MT (1997) How melatonin interacts with lipid bilayers: a study by fluorescence and ESR spectroscopies. *FEBS Lett* **416**: 103-106
- 45 Crespo E, Macias M, Pozo D, Escames G, Martin M, Vives F, Guerrero JM, Acuna-Castroviejo D (1999) Melatonin inhibits expression of the inducible NO synthase II in liver and lung and prevents endotoxemia in lipopolysaccharide-induced multiple organ dysfunction syndrome in rats. *FASEB J* **13**: 1537-1546
- 46 Cristofanon S, Ugucioni F, Cerella C, Radogna F, Dicato M, Ghibelli L, Diederich M (2009) Intracellular prooxidant activity of melatonin induces a survival pathway involving NF-kappaB activation. *Ann N Y Acad Sci* **1171**: 472-478
- 47 Crouser ED (2004) Mitochondrial dysfunction in septic shock and multiple organ dysfunction syndrome. *Mitochondrion* **4**: 729-741
- 48 Cuzzocrea S, Reiter RJ (2002) Pharmacological actions of melatonin in acute and chronic inflammation. *Curr Top Med Chem* **2**: 153-165
- 49 Czeisler CA, Gooley JJ (2007) Sleep and circadian rhythms in humans. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **72**: 579-597
- 50 Dauchy RT, Blask DE, Dauchy EM, Davidson LK, Tirrell PC, Greene MW, Tirrell RP, Hill CR, Sauer LA (2009) Antineoplastic effects of melatonin on a rare malignancy of mesenchymal origin: melatonin receptor-mediated inhibition of signal transduction, linoleic acid metabolism and growth in tissue-isolated human leiomyosarcoma xenografts. *J Pineal Res* **47**: 32-42
- 51 Daulat AM, Maurice P, Froment C, Guillaume JL, Broussard C, Monsarrat B, Delagrangé P, Jockers R (2007) Purification and identification of G protein-coupled receptor protein complexes under native conditions. *Mol Cell Proteomics* **6**: 835-844
- 52 de Ruiter J, Weel J, Manusama E, Kingma WP, van der Voort PH (2009) The epidemiology of intra-abdominal flora in critically ill patients with secondary and tertiary abdominal sepsis. *Infection* **37**: 522-527
- 53 DeMuro RL, Nafziger AN, Blask DE, Menhinick AM, Bertino JS, Jr. (2000) The absolute bioavailability of oral melatonin. *J Clin Pharmacol* **40**: 781-784
- 54 Doolen S, Krause DN, Dubocovich ML, Duckles SP (1998) Melatonin mediates two distinct responses in vascular smooth muscle. *Eur J Pharmacol* **345**: 67-69
- 55 Dornblüth O, Pschyrembel W, Braun R, Brehmer A (2002) Pschyrembel Klinisches Wörterbuch. Walter de Gruyter, Berlin, New York

- 56 El-Sokkary GH (2008) Melatonin and vitamin C administration ameliorate diazepam-induced oxidative stress and cell proliferation in the liver of rats. *Cell Prolif* **41**: 168-176
- 57 Escames G, Acuna-Castroviejo D, Lopez LC, Tan DX, Maldonado MD, Sanchez-Hidalgo M, Leon J, Reiter RJ (2006) Pharmacological utility of melatonin in the treatment of septic shock: experimental and clinical evidence. *J Pharm Pharmacol* **58**: 1153-1165
- 58 Escames G, Lopez LC, Tapias V, Utrilla P, Reiter RJ, Hitos AB, Leon J, Rodriguez MI, Acuna-Castroviejo D (2006) Melatonin counteracts inducible mitochondrial nitric oxide synthase-dependent mitochondrial dysfunction in skeletal muscle of septic mice. *J Pineal Res* **40**: 71-78
- 59 Fan F, Jin S, Amundson SA, Tong T, Fan W, Zhao H, Zhu X, Mazzacurati L, Li X, Petrik KL, Fornace AJ, Jr., Rajasekaran B, Zhan Q (2002) ATF3 induction following DNA damage is regulated by distinct signaling pathways and over-expression of ATF3 protein suppresses cells growth. *Oncogene* **21**: 7488-7496
- 60 Fink MP, Heard SO (1990) Laboratory models of sepsis and septic shock. *J Surg Res* **49**: 186-196
- 61 Fink T, Reus E, Wolf M, Wolf B, Vesper B, Rensing H, Mathes A (2009) Melatonin receptor agonist ramelteon improves survival after sepsis in rat. *Shock* **31**, Supplement 1: 1
- 62 Friedman G, Silva E, Vincent JL (1998) Has the mortality of septic shock changed with time. *Crit Care Med* **26**: 2078-2086
- 63 Fukunaga K, Horikawa K, Shibata S, Takeuchi Y, Miyamoto E (2002) Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II-dependent long-term potentiation in the rat suprachiasmatic nucleus and its inhibition by melatonin. *J Neurosci Res* **70**: 799-807
- 64 Fustin JM, Dardente H, Wagner GC, Carter DA, Johnston JD, Lincoln GA, Hazlerigg DG (2009) Egr1 involvement in evening gene regulation by melatonin. *FASEB J* **23**: 764-773
- 65 Gattinoni L, Brazzi L, Pelosi P, Latini R, Tognoni G, Pesenti A, Fumagalli R (1995) A trial of goal-oriented hemodynamic therapy in critically ill patients. SvO<sub>2</sub> Collaborative Group. *N Engl J Med* **333**: 1025-1032
- 66 Gilad E, Wong HR, Zingarelli B, Virag L, O'Connor M, Salzman AL, Szabo C (1998) Melatonin inhibits expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase in murine macrophages: role of inhibition of NFkappaB activation. *FASEB J* **12**: 685-693
- 67 Gilchrist M, Thorsson V, Li B, Rust AG, Korb M, Roach JC, Kennedy K, Hai T, Bolouri H, Aderem A (2006) Systems biology approaches identify ATF3 as a negative regulator of Toll-like receptor 4. *Nature* **441**: 173-178
- 68 Gilchrist M, Henderson WR, Jr., Clark AE, Simmons RM, Ye X, Smith KD, Aderem A (2008) Activating transcription factor 3 is a negative regulator of allergic pulmonary inflammation. *J Exp Med* **205**: 2349-2357
- 69 Gingeras TR, Higuchi R, Kricka LJ, Lo YM, Wittwer CT (2005) Fifty years of molecular (DNA/RNA) diagnostics. *Clin Chem* **51**: 661-671

- 70 Gitto E, Pellegrino S, Gitto P, Barberi I, Reiter RJ (2009) Oxidative stress of the newborn in the pre- and postnatal period and the clinical utility of melatonin. *J Pineal Res* **46**: 128-139
- 71 Godson C, Reppert SM (1997) The Mel1a melatonin receptor is coupled to parallel signal transduction pathways. *Endocrinology* **138**: 397-404
- 72 Gu J, Zhuang L, Huang GC (2006) Melatonin prevents H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced activation of rat hepatic stellate cells. *J Pineal Res* **41**: 275-278
- 73 Guenther AL, Schmidt SI, Laatsch H, Fotso S, Ness H, Ressemeyer AR, Poeggeler B, Hardeland R (2005) Reactions of the melatonin metabolite AMK (N1-acetyl-5-methoxykynuramine) with reactive nitrogen species: formation of novel compounds, 3-acetamidomethyl-6-methoxycinnolinone and 3-nitro-AMK. *J Pineal Res* **39**: 251-260
- 74 Guerra S, Lopez-Fernandez LA, Garcia MA, Zaballos A, Esteban M (2006) Human gene profiling in response to the active protein kinase, interferon-induced serine/threonine protein kinase (PKR), in infected cells. Involvement of the transcription factor ATF-3 IN PKR-induced apoptosis. *J Biol Chem* **281**: 18734-18745
- 75 Guescini M, Sisti D, Rocchi MB, Stocchi L, Stocchi V (2008) A new real-time PCR method to overcome significant quantitative inaccuracy due to slight amplification inhibition. *BMC Bioinformatics* **9**: 326
- 76 Gutteridge JM, Mitchell J (1999) Redox imbalance in the critically ill. *Br Med Bull* **55**: 49-75
- 77 Hackl C, Lang SA, Moser C, Mori A, Fichtner-Feigl S, Hellerbrand C, Dietmeier W, Schlitt HJ, Geissler EK, Stoeltzing O (2010) Activating transcription factor-3 (ATF3) functions as a tumor suppressor in colon cancer and is up-regulated upon heat-shock protein 90 (Hsp90) inhibition. *BMC Cancer* **10**: 668
- 78 Hai T, Hartman MG (2001) The molecular biology and nomenclature of the activating transcription factor/cAMP responsive element binding family of transcription factors: activating transcription factor proteins and homeostasis. *Gene* **273**: 1-11
- 79 Hai TW, Liu F, Coukos WJ, Green MR (1989) Transcription factor ATF cDNA clones: an extensive family of leucine zipper proteins able to selectively form DNA-binding heterodimers. *Genes Dev* **3**: 2083-2090
- 80 Haneda M, Kojima E, Nishikimi A, Hasegawa T, Nakashima I, Isobe K (2004) Protein phosphatase 1, but not protein phosphatase 2A, dephosphorylates DNA-damaging stress-induced phospho-serine 15 of p53. *FEBS Lett* **567**: 171-174
- 81 Hardeland R (2005) Antioxidative protection by melatonin: multiplicity of mechanisms from radical detoxification to radical avoidance. *Endocrine* **27**: 119-130
- 82 Hardeland R (2009) Melatonin: signaling mechanisms of a pleiotropic agent. *Biofactors* **35**: 183-192
- 83 Harper EG, Alvares SM, Carter WG (2005) Wounding activates p38 map kinase and activation transcription factor 3 in leading keratinocytes. *J Cell Sci* **118**: 3471-3485

- 84 Hartman MG, Lu D, Kim ML, Kociba GJ, Shukri T, Buteau J, Wang X, Frankel WL, Guttridge D, Prentki M, Grey ST, Ron D, Hai T (2004) Role for activating transcription factor 3 in stress-induced beta-cell apoptosis. *Mol Cell Biol* **24**: 5721-5732
- 85 Hasegawa T, Xiao H, Hamajima F, Isobe K (2000) Interaction between DNA-damage protein GADD34 and a new member of the Hsp40 family of heat shock proteins that is induced by a DNA-damaging reagent. *Biochem J* **352 Pt 3**: 795-800
- 86 Hashimoto Y, Zhang C, Kawauchi J, Imoto I, Adachi MT, Inazawa J, Amagasa T, Hai T, Kitajima S (2002) An alternatively spliced isoform of transcriptional repressor ATF3 and its induction by stress stimuli. *Nucleic Acids Res* **30**: 2398-2406
- 87 Hayes MA, Timmins AC, Yau EH, Palazzo M, Hinds CJ, Watson D (1994) Elevation of systemic oxygen delivery in the treatment of critically ill patients. *N Engl J Med* **330**: 1717-1722
- 88 He YW, Deftos ML, Ojala EW, Bevan MJ (1998) RORgamma t, a novel isoform of an orphan receptor, negatively regulates Fas ligand expression and IL-2 production in T cells. *Immunity* **9**: 797-806
- 89 Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM (1996) Real time quantitative PCR. *Genome Res* **6**: 986-994
- 90 Hellemans J, Mortier G, De Paepe A, Speleman F, Vandesompele J (2007) qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol* **8**: R19
- 91 Hess J, Angel P, Schorpp-Kistner M (2004) AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *J Cell Sci* **117**: 5965-5973
- 92 Hibaoui Y, Roulet E, Ruegg UT (2009) Melatonin prevents oxidative stress-mediated mitochondrial permeability transition and death in skeletal muscle cells. *J Pineal Res* **47**: 238-252
- 93 Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R (1992) Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)* **10**: 413-417
- 94 Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R (1993) Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)* **11**: 1026-1030
- 95 Ho HH, Antoniv TT, Ji JD, Ivashkiv LB (2008) Lipopolysaccharide-induced expression of matrix metalloproteinases in human monocytes is suppressed by IFN-gamma via superinduction of ATF-3 and suppression of AP-1. *J Immunol* **181**: 5089-5097
- 96 Hollander MC, Zhan Q, Bae I, Fornace AJ, Jr. (1997) Mammalian GADD34, an apoptosis- and DNA damage-inducible gene. *J Biol Chem* **272**: 13731-13737
- 97 Hollander MC, Poola-Kella S, Fornace AJ, Jr. (2003) Gadd34 functional domains involved in growth suppression and apoptosis. *Oncogene* **22**: 3827-3832
- 98 Hollenberg SM (2010) Think locally: evaluation of the microcirculation in sepsis. *Intensive Care Med* **36**: 1807-1809

- 99 Hsu JC, Laz T, Mohn KL, Taub R (1991) Identification of LRF-1, a leucine-zipper protein that is rapidly and highly induced in regenerating liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 3511-3515
- 100 Huang H, Yin R, Zhu J, Feng X, Wang C, Sheng Y, Dong G, Li D, Jing H (2007) Protective effects of melatonin and N-acetylcysteine on hepatic injury in a rat cardiopulmonary bypass model. *J Surg Res* **142**: 153-161
- 101 Hung WJ, Roberson RS, Taft J, Wu DY (2003) Human BAG-1 proteins bind to the cellular stress response protein GADD34 and interfere with GADD34 functions. *Mol Cell Biol* **23**: 3477-3486
- 102 Inoue K, Zama T, Kamimoto T, Aoki R, Ikeda Y, Kimura H, Hagiwara M (2004) TNF $\alpha$ -induced ATF3 expression is bidirectionally regulated by the JNK and ERK pathways in vascular endothelial cells. *Genes Cells* **9**: 59-70
- 103 Jackman J, Alamo I, Jr., Fornace AJ, Jr. (1994) Genotoxic stress confers preferential and coordinate messenger RNA stability on the five gadd genes. *Cancer Res* **54**: 5656-5662
- 104 Jan JE, Reiter RJ, Wasdell MB, Bax M (2009) The role of the thalamus in sleep, pineal melatonin production, and circadian rhythm sleep disorders. *J Pineal Res* **46**: 1-7
- 105 Jarratt J (2011) Perioperative melatonin use. *Anaesth Intensive Care* **39**: 171-181
- 106 Jiang X, Zhang J, Xia M, Qiu W, Wang H, Zhao D, Wang Y (2010) Role of activating transcription factor 3 (ATF3) in sublytic C5b-9-induced glomerular mesangial cell apoptosis. *Cell Mol Immunol* **7**: 143-151
- 107 Jockers R, Petit L, Brydon L, de Coppet P, Strosberg AD (1998) [Structure and function of melatonin receptors]. *C R Seances Soc Biol Fil* **192**: 659-667
- 108 Jousse C, Oyadomari S, Novoa I, Lu P, Zhang Y, Harding HP, Ron D (2003) Inhibition of a constitutive translation initiation factor 2 $\alpha$  phosphatase, CREP, promotes survival of stressed cells. *J Cell Biol* **163**: 767-775
- 109 Jung KH, Hong SW, Zheng HM, Lee DH, Hong SS (2009) Melatonin downregulates nuclear erythroid 2-related factor 2 and nuclear factor- $\kappa$ B during prevention of oxidative liver injury in a dimethylnitrosamine model. *J Pineal Res* **47**: 173-183
- 110 Kamata H, Honda S, Maeda S, Chang L, Hirata H, Karin M (2005) Reactive oxygen species promote TNF $\alpha$ -induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases. *Cell* **120**: 649-661
- 111 Karasek M, Winczyk K (2006) Melatonin in humans. *J Physiol Pharmacol* **57 Suppl 5**: 19-39
- 112 Karimova A, Pinsky DJ (2001) The endothelial response to oxygen deprivation: biology and clinical implications. *Intensive Care Med* **27**: 19-31
- 113 Kaszubska W, Hooft van Huijsduijnen R, Ghersa P, DeRaemy-Schenk AM, Chen BP, Hai T, DeLamarter JF, Whelan J (1993) Cyclic AMP-independent ATF family members

- interact with NF-kappa B and function in the activation of the E-selectin promoter in response to cytokines. *Mol Cell Biol* **13**: 7180-7190
- 114 Kenmochi N, Kawaguchi T, Rozen S, Davis E, Goodman N, Hudson TJ, Tanaka T, Page DC (1998) A map of 75 human ribosomal protein genes. *Genome Res* **8**: 509-523
- 115 Khuu CH, Barrozo RM, Hai T, Weinstein SL (2007) Activating transcription factor 3 (ATF3) represses the expression of CCL4 in murine macrophages. *Mol Immunol* **44**: 1598-1605
- 116 Kim EJ, Yoo YG, Yang WK, Lim YS, Na TY, Lee IK, Lee MO (2008) Transcriptional activation of HIF-1 by RORalpha and its role in hypoxia signaling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **28**: 1796-1802
- 117 Kim EY, Shin HY, Kim JY, Kim DG, Choi YM, Kwon HK, Rhee DK, Kim YS, Choi S (2010) ATF3 plays a key role in Kdo2-lipid A-induced TLR4-dependent gene expression via NF-kappaB activation. *PLoS One* **5**: e14181
- 118 Kimball SR (1999) Eukaryotic initiation factor eIF2. *Int J Biochem Cell Biol* **31**: 25-29
- 119 Kimball SR, Abbas A, Jefferson LS (2008) Melatonin represses oxidative stress-induced activation of the MAP kinase and mTOR signaling pathways in H4IIE hepatoma cells through inhibition of Ras. *J Pineal Res* **44**: 379-386
- 120 Kimura K, Ito S, Nagino M, Isobe K (2008) Inhibition of reactive oxygen species down-regulates protein synthesis in RAW 264.7. *Biochem Biophys Res Commun* **372**: 272-275
- 121 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
- 122 Kleinow W, Neupert W (1970) [RNA from the mitochondria of the thorax muscle of *Locusta migratoria*]. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* **351**: 1205-1214
- 123 Koh IH, Menchaca-Diaz JL, Koh TH, Souza RL, Shu CM, Rogerio VE, Liberatore AM (2010) Microcirculatory evaluation in sepsis: a difficult task. *Shock* **34 Suppl 1**: 27-33
- 124 Korf HW, Schomerus C, Stehle JH (1998) The pineal organ, its hormone melatonin, and the photoneuroendocrine system. *Adv Anat Embryol Cell Biol* **146**: 1-100
- 125 Korkmaz A, Sanchez-Barcelo EJ, Tan DX, Reiter RJ (2009) Role of melatonin in the epigenetic regulation of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* **115**: 13-27
- 126 Krachman SL, D'Alonzo GE, Criner GJ (1995) Sleep in the intensive care unit. *Chest* **107**: 1713-1720
- 127 Kück U (2005) *Praktikum der Molekulargenetik*. Springer-Lehrbuch
- 128 Kuehn CC, Rodrigues Oliveira LG, Santos CD, Ferreira DS, Alonso Toldo MP, de Albuquerque S, do Prado JC, Jr. (2009) Melatonin and dehydroepiandrosterone combination: does this treatment exert a synergistic effect during experimental *Trypanosoma cruzi* infection? *J Pineal Res* **47**: 253-259

- 129 Lee SH, Bahn JH, Whitlock NC, Baek SJ (2010) Activating transcription factor 2 (ATF2) controls tolfenamic acid-induced ATF3 expression via MAP kinase pathways. *Oncogene* **29**: 5182-5192
- 130 Lee YY, Cevallos RC, Jan E (2009) An upstream open reading frame regulates translation of GADD34 during cellular stresses that induce eIF2alpha phosphorylation. *J Biol Chem* **284**: 6661-6673
- 131 Levinthal DJ, Defranco DB (2005) Reversible oxidation of ERK-directed protein phosphatases drives oxidative toxicity in neurons. *J Biol Chem* **280**: 5875-5883
- 132 Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G (2003) 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med* **31**: 1250-1256
- 133 Levy MM, Pronovost PJ, Dellinger RP, Townsend S, Resar RK, Clemmer TP, Ramsay G (2004) Sepsis change bundles: converting guidelines into meaningful change in behavior and clinical outcome. *Crit Care Med* **32**: S595-597
- 134 Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-Delta Delta C(T)</sup> Method. *Methods* **25**: 402-408
- 135 Lopez LC, Escames G, Ortiz F, Ros E, Acuna-Castroviejo D (2006) Melatonin restores the mitochondrial production of ATP in septic mice. *Neuro Endocrinol Lett* **27**: 623-630
- 136 Lowes DA, Almawash AM, Webster NR, Reid VL, Galley HF (2011) Melatonin and structurally similar compounds have differing effects on inflammation and mitochondrial function in endothelial cells under conditions mimicking sepsis. *Br J Anaesth* **107**: 193-201
- 137 Lu D, Wolfgang CD, Hai T (2006) Activating transcription factor 3, a stress-inducible gene, suppresses Ras-stimulated tumorigenesis. *J Biol Chem* **281**: 10473-10481
- 138 Lu D, Chen J, Hai T (2007) The regulation of ATF3 gene expression by mitogen-activated protein kinases. *Biochem J* **401**: 559-567
- 139 Luchetti F, Betti M, Canonico B, Arcangeletti M, Ferri P, Galli F, Papa S (2009) ERK MAPK activation mediates the antiapoptotic signaling of melatonin in UVB-stressed U937 cells. *Free Radic Biol Med* **46**: 339-351
- 140 Luchetti F, Canonico B, Betti M, Arcangeletti M, Pilolli F, Piroddi M, Canesi L, Papa S, Galli F (2010) Melatonin signaling and cell protection function. *FASEB J* **24**: 3603-3624
- 141 Lustig MK, Bac VH, Pavlovic D, Maier S, Grundling M, Grisk O, Wendt M, Heidecke CD, Lehmann C (2007) Colon ascendens stent peritonitis--a model of sepsis adopted to the rat: physiological, microcirculatory and laboratory changes. *Shock* **28**: 59-64
- 142 Ma Y, Hendershot LM (2003) Delineation of a negative feedback regulatory loop that controls protein translation during endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem* **278**: 34864-34873
- 143 Maestroni GJ (1996) Melatonin as a therapeutic agent in experimental endotoxic shock. *J Pineal Res* **20**: 84-89

- 144 Maier S, Traeger T, Entleutner M, Westerholt A, Kleist B, Huser N, Holzmann B, Stier A, Pfeffer K, Heidecke CD (2004) Cecal ligation and puncture versus colon ascendens stent peritonitis: two distinct animal models for polymicrobial sepsis. *Shock* **21**: 505-511
- 145 Manda K, Bhatia AL (2003) Prophylactic action of melatonin against cyclophosphamide-induced oxidative stress in mice. *Cell Biol Toxicol* **19**: 367-372
- 146 Manda K, Ueno M, Anzai K (2007) AFMK, a melatonin metabolite, attenuates X-ray-induced oxidative damage to DNA, proteins and lipids in mice. *J Pineal Res* **42**: 386-393
- 147 Marre R, Mertens T, Trautmann M, Zimmerli W (2008) *Klinische Infektiologie*. Elsevier GmbH, München
- 148 Martin M, Macias M, Escames G, Leon J, Acuna-Castroviejo D (2000) Melatonin but not vitamins C and E maintains glutathione homeostasis in t-butyl hydroperoxide-induced mitochondrial oxidative stress. *FASEB J* **14**: 1677-1679
- 149 Martinez-Cruz F, Osuna C, Guerrero JM (2006) Mitochondrial damage induced by fetal hyperphenylalaninemia in the rat brain and liver: its prevention by melatonin, Vitamin E, and Vitamin C. *Neurosci Lett* **392**: 1-4
- 150 Mathes A, Ruf C, Fink T, Abend M, Rensing H (2010) Molecular effects of melatonin and ramelteon administration after hemorrhagic shock in rat liver. *Eur J Anaesthesiol* **27**: 2
- 151 Mathes AM (2010) Hepatoprotective actions of melatonin: possible mediation by melatonin receptors. *World J Gastroenterol* **16**: 6087-6097
- 152 Matura T, Nishida T, Togawa A, Horie S, Kusumoto C, Ohata S, Nakada J, Ishibe Y, Yamada K, Ohta Y (2006) Mechanisms of protection by melatonin against acetaminophen-induced liver injury in mice. *J Pineal Res* **41**: 211-219
- 153 Meki AR, Esmail Eel D, 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
- 154 Menendez-Pelaez A, Reiter RJ (1993) Distribution of melatonin in mammalian tissues: the relative importance of nuclear versus cytosolic localization. *J Pineal Res* **15**: 59-69
- 155 Mistraletti G, Carloni E, Cigada M, Zambrelli E, Taverna M, Sabbatici G, Umbrello M, Elia G, Destrebecq AL, Iapichino G (2008) Sleep and delirium in the intensive care unit. *Minerva Anesthesiol* **74**: 329-333
- 156 Mistraletti G, Sabbatini G, Taverna M, Figini MA, Umbrello M, Magni P, Ruscica M, Dozio E, Esposti R, DeMartini G, Fraschini F, Rezzani R, Reiter RJ, Iapichino G (2010) Pharmacokinetics of orally administered melatonin in critically ill patients. *J Pineal Res* **48**: 142-147
- 157 Miyazaki T, Kuwano H, Kato H, Ando H, Kimura H, Inose T, Ohno T, Suzuki M, Nakajima M, Manda R, Fukuchi M, Tsukada K (2003) Correlation between serum melatonin

- circadian rhythm and intensive care unit psychosis after thoracic esophagectomy. *Surgery* **133**: 662-668
- 158 Moerer O, Quintel M (2009) [Sepsis in adult patients - definitions, epidemiology and economic aspects]. *Internist (Berl)* **50**: 788, 790-794, 796-798
- 159 Mohan N, Sadeghi K, Reiter RJ, Meltz ML (1995) The neurohormone melatonin inhibits cytokine, mitogen and ionizing radiation induced NF-kappa B. *Biochem Mol Biol Int* **37**: 1063-1070
- 160 Mongardon N, Dyson A, Singer M (2009) Is MOF an outcome parameter or a transient, adaptive state in critical illness? *Curr Opin Crit Care* **15**: 431-436
- 161 Montilla P, Feijoo M, Munoz MC, Munoz-Castaneda JR, Bujalance I, Tunes I (2003) Effect of melatonin on the oxidative stress in N1E-115 cells is not mediated by mt1 receptors. *J Physiol Biochem* **59**: 263-268
- 162 Morgan PJ, Barrett P, Howell HE, Helliwell R (1994) Melatonin receptors: localization, molecular pharmacology and physiological significance. *Neurochem Int* **24**: 101-146
- 163 Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51 Pt 1**: 263-273
- 164 Mundigler G, Delle-Karth G, Koreny M, Zehetgruber M, Steindl-Munda P, Marktl W, Ferti L, Siostrzonek P (2002) Impaired circadian rhythm of melatonin secretion in sedated critically ill patients with severe sepsis. *Crit Care Med* **30**: 536-540
- 165 Nelson CS, Ikeda M, Gompf HS, Robinson ML, Fuchs NK, Yoshioka T, Neve KA, Allen CN (2001) Regulation of melatonin 1a receptor signaling and trafficking by asparagine-124. *Mol Endocrinol* **15**: 1306-1317
- 166 Novoa I, Zeng H, Harding HP, Ron D (2001) Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2alpha. *J Cell Biol* **153**: 1011-1022
- 167 Novoa I, Zhang Y, Zeng H, Jungreis R, Harding HP, Ron D (2003) Stress-induced gene expression requires programmed recovery from translational repression. *EMBO J* **22**: 1180-1187
- 168 O'Brien JM, Jr., Ali NA, Abraham E (2008) Year in review 2007: Critical Care--multiple organ failure and sepsis. *Crit Care* **12**: 228
- 169 Odagiri K, Katoh H, Kawashima H, Tanaka T, Ohtani H, Saotome M, Urushida T, Satoh H, Hayashi H (2009) Local control of mitochondrial membrane potential, permeability transition pore and reactive oxygen species by calcium and calmodulin in rat ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol* **46**: 989-997
- 170 Oh-Hashi K, Maruyama W, Isobe K (2001) Peroxynitrite induces GADD34, 45, and 153 VIA p38 MAPK in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Free Radic Biol Med* **30**: 213-221

- 171 Olofsson K, Alling C, Lundberg D, Malmros C (2004) Abolished circadian rhythm of melatonin secretion in sedated and artificially ventilated intensive care patients. *Acta Anaesthesiol Scand* **48**: 679-684
- 172 Opal SM, Cross AS (1999) Clinical trials for severe sepsis. Past failures, and future hopes. *Infect Dis Clin North Am* **13**: 285-297, vii
- 173 Otero-Anton E, Gonzalez-Quintela A, Lopez-Soto A, Lopez-Ben S, Llovo J, Perez LF (2001) Cecal ligation and puncture as a model of sepsis in the rat: influence of the puncture size on mortality, bacteremia, endotoxemia and tumor necrosis factor alpha levels. *Eur Surg Res* **33**: 77-79
- 174 Ozbek E, Ilbey YO, Ozbek M, Simsek A, Cekmen M, Somay A (2009) Melatonin attenuates unilateral ureteral obstruction-induced renal injury by reducing oxidative stress, iNOS, MAPK, and NF-kB expression. *J Endourol* **23**: 1165-1173
- 175 Panacek EA, Marshall JC, Albertson TE, Johnson DH, Johnson S, MacArthur RD, Miller M, Barchuk WT, Fischkoff S, Kaul M, Teoh L, Van Meter L, Daum L, Lemeshow S, Hicklin G, Doig C (2004) Efficacy and safety of the monoclonal anti-tumor necrosis factor antibody F(ab')<sub>2</sub> fragment afelimomab in patients with severe sepsis and elevated interleukin-6 levels. *Crit Care Med* **32**: 2173-2182
- 176 Pandi-Perumal SR, Trakht I, Spence DW, Srinivasan V, Dagan Y, Cardinali DP (2008) The roles of melatonin and light in the pathophysiology and treatment of circadian rhythm sleep disorders. *Nat Clin Pract Neurol* **4**: 436-447
- 177 Park SW, Choi SM, Lee SM (2007) Effect of melatonin on altered expression of vasoregulatory genes during hepatic ischemia/reperfusion. *Arch Pharm Res* **30**: 1619-1624
- 178 Penning LC, Vrieling HE, Brinkhof B, Riemers FM, Rothuizen J, Rutteman GR, Hazewinkel HA (2007) A validation of 10 feline reference genes for gene expression measurements in snap-frozen tissues. *Vet Immunol Immunopathol* **120**: 212-222
- 179 Perras B, Kurowski V, Dodt C (2006) Nocturnal melatonin concentration is correlated with illness severity in patients with septic disease. *Intensive Care Med* **32**: 624-625
- 180 Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**: e45
- 181 Physicians ACoC, Medicine SoCC (1992) Consensus Conference / Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med* **20**: 864-874
- 182 Pieri C, Marra M, Moroni F, Recchioni R, Marcheselli F (1994) Melatonin: a peroxy radical scavenger more effective than vitamin E. *Life Sci* **55**: PL271-276
- 183 Poeggeler B, Saarela S, Reiter RJ, Tan DX, Chen LD, Manchester LC, Barlow-Walden LR (1994) Melatonin--a highly potent endogenous radical scavenger and electron donor: new aspects of the oxidation chemistry of this indole accessed in vitro. *Ann N Y Acad Sci* **738**: 419-420

- 184 Pollack BP, Sapkota B, Haun PL (2010) Activating transcription factor 3 (ATF3) expression is increased in erythema multiforme and is regulated by IFN-gamma in human keratinocytes. *Exp Dermatol* **19**: e310-313
- 185 Pozo D, Reiter RJ, Calvo JR, Guerrero JM (1997) Inhibition of cerebellar nitric oxide synthase and cyclic GMP production by melatonin via complex formation with calmodulin. *J Cell Biochem* **65**: 430-442
- 186 Radogna F, Paternoster L, De Nicola M, Cerella C, Ammendola S, Bedini A, Tarzia G, Aquilano K, Ciriolo M, Ghibelli L (2009) Rapid and transient stimulation of intracellular reactive oxygen species by melatonin in normal and tumor leukocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* **239**: 37-45
- 187 Radogna F, Sestili P, Martinelli C, Paolillo M, Paternoster L, Albertini MC, Accorsi A, Gualandi G, Ghibelli L (2009) Lipoxygenase-mediated pro-radical effect of melatonin via stimulation of arachidonic acid metabolism. *Toxicol Appl Pharmacol* **238**: 170-177
- 188 Raju R, Chaudry IH (2008) Sex steroids/receptor antagonist: their use as adjuncts after trauma-hemorrhage for improving immune/cardiovascular responses and for decreasing mortality from subsequent sepsis. *Anesth Analg* **107**: 159-166
- 189 Raza H, John A, Brown EM, Benedict S, Kambal A (2008) Alterations in mitochondrial respiratory functions, redox metabolism and apoptosis by oxidant 4-hydroxynonenal and antioxidants curcumin and melatonin in PC12 cells. *Toxicol Appl Pharmacol* **226**: 161-168
- 190 Reinhart K, Brunkhorst FM, Bone HG, Bardutzky J, Dempfle CE, Forst H, Gastmeier P, Gerlach H, Grundling M, John S, Kern W, Kreyman G, Kruger W, Kujath P, Marggraf G, Martin J, Mayer K, Meier-Hellmann A, Oppert M, Putensen C, Quintel M, Ragaller M, Rossaint R, Seifert H, Spies C, Stuber F, Weiler N, Weimann A, Werdan K, Welte T (2010) Prevention, diagnosis, therapy and follow-up care of sepsis: 1st revision of S-2k guidelines of the German Sepsis Society (Deutsche Sepsis-Gesellschaft e.V. (DSG)) and the German Interdisciplinary Association of Intensive Care and Emergency Medicine (Deutsche Interdisziplinäre Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin (DIVI)). *Ger Med Sci* **8**: Doc14
- 191 Reiter RJ, Calvo JR, Karbownik M, Qi W, Tan DX (2000) Melatonin and its relation to the immune system and inflammation. *Ann N Y Acad Sci* **917**: 376-386
- 192 Reiter RJ, Korkmaz A (2008) Clinical aspects of melatonin. *Saudi Med J* **29**: 1537-1547
- 193 Reiter RJ, Paredes SD, Manchester LC, Tan DX (2009) Reducing oxidative/nitrosative stress: a newly-discovered genre for melatonin. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **44**: 175-200
- 194 Reppert SM, Weaver DR (2002) Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* **418**: 935-941
- 195 Rettew JA, Huet YM, Marriott I (2009) Estrogens augment cell surface TLR4 expression on murine macrophages and regulate sepsis susceptibility in vivo. *Endocrinology* **150**: 3877-3884

- 196 Reynolds FD, Dauchy R, Blask D, Dietz PA, Lynch D, Zuckerman R (2003) The pineal gland hormone melatonin improves survival in a rat model of sepsis/shock induced by zymosan A. *Surgery* **134**: 474-479
- 197 Rezzani R, Buffoli B, Rodella L, Stacchiotti A, Bianchi R (2005) Protective role of melatonin in cyclosporine A-induced oxidative stress in rat liver. *Int Immunopharmacol* **5**: 1397-1405
- 198 Richards FJ (1959) A flexible growth function for empirical use. *Journal of experimental Botany* **10**: 290-300
- 199 Rivers E, Nguyen B, Havstad S, Ressler J, Muzzin A, Knoblich B, Peterson E, Tomlanovich M (2001) Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* **345**: 1368-1377
- 200 Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM, Antolin I, Herrera F, Martin V, Reiter RJ (2004) Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J Pineal Res* **36**: 1-9
- 201 Rosenberger CM, Clark AE, Treuting PM, Johnson CD, Aderem A (2008) ATF3 regulates MCMV infection in mice by modulating IFN-gamma expression in natural killer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 2544-2549
- 202 Rusnak F, Reiter T (2000) Sensing electrons: protein phosphatase redox regulation. *Trends Biochem Sci* **25**: 527-529
- 203 Safranek R, Ishibashi N, Oka Y, Ozasa H, Shirouzu K, Holecek M (2006) Modulation of inflammatory response in sepsis by proteasome inhibition. *Int J Exp Pathol* **87**: 369-372
- 204 Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491
- 205 Sarkar D, Su ZZ, Lebedeva IV, Sauane M, Gopalkrishnan RV, Valerie K, Dent P, Fisher PB (2002) mda-7 (IL-24) Mediates selective apoptosis in human melanoma cells by inducing the coordinated overexpression of the GADD family of genes by means of p38 MAPK. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 10054-10059
- 206 Scheiermann P, Hoegl S, Revermann M, Ahluwalia D, Zander J, Boost KA, Nguyen T, Zwissler B, Muhl H, Hofstetter C (2009) Cecal ligation and incision: an acute onset model of severe sepsis in rats. *J Surg Res* **151**: 132-137
- 207 Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO (1995) Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* **270**: 467-470
- 208 Schlotter YM, Veenhof EZ, Brinkhof B, Rutten VP, Spee B, Willemsse T, Penning LC (2009) A GeNorm algorithm-based selection of reference genes for quantitative real-time PCR in skin biopsies of healthy dogs and dogs with atopic dermatitis. *Vet Immunol Immunopathol* **129**: 115-118
- 209 Schlotter YM, Veenhof EZ, Brinkhof B, Rutten VP, Spee B, Willemsse T, Penning LC (2009) A GeNorm algorithm-based selection of reference genes for quantitative real-time PCR in skin biopsies of healthy dogs and dogs with atopic dermatitis. *Vet Immunol Immunopathol* **129**: 115-8

- 210 Scott DW, Mutamba S, Hopkins RG, Loo G (2005) Increased GADD gene expression in human colon epithelial cells exposed to deoxycholate. *J Cell Physiol* **202**: 295-303
- 211 Semak I, Korik E, Antonova M, Wortsman J, Slominski A (2008) Metabolism of melatonin by cytochrome P450s in rat liver mitochondria and microsomes. *J Pineal Res* **45**: 515-523
- 212 Shafer LL, McNulty JA, Young MR (2001) Assessment of melatonin's ability to regulate cytokine production by macrophage and microglia cell types. *J Neuroimmunol* **120**: 84-93
- 213 Shang Y, Xu SP, Wu Y, Jiang YX, Wu ZY, Yuan SY, Yao SL (2009) Melatonin reduces acute lung injury in endotoxemic rats. *Chin Med J (Engl)* **122**: 1388-1393
- 214 Shigeta H, Yasui A, Nimura Y, Machida N, Kageyama M, Miura M, Menjo M, Ikeda K (2001) Postoperative delirium and melatonin levels in elderly patients. *Am J Surg* **182**: 449-454
- 215 Shilo L, Dagan Y, Smorjik Y, Weinberg U, Dolev S, Komptel B, Balaum H, Shenkman L (1999) Patients in the intensive care unit suffer from severe lack of sleep associated with loss of normal melatonin secretion pattern. *Am J Med Sci* **317**: 278-281
- 216 Sigala F, Theocharis S, Sigalas K, Markantonis-Kyroudis S, Papalabros E, Triantafyllou A, Kostopanagiotou G, Andreadou I (2006) Therapeutic value of melatonin in an experimental model of liver injury and regeneration. *J Pineal Res* **40**: 270-279
- 217 Silbernagl S, Despopoulos A (2007) *Taschenatlas Physiologie*. Thieme Verlag
- 218 Spinsanti G, Panti C, Lazzeri E, Marsili L, Casini S, Frati F, Fossi CM (2006) Selection of reference genes for quantitative RT-PCR studies in striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*) skin biopsies. *BMC Mol Biol* **7**: 32
- 219 Suda K, Kitagawa Y, Ozawa S, Saikawa Y, Ueda M, Ebina M, Yamada S, Hashimoto S, Fukata S, Abraham E, Maruyama I, Kitajima M, Ishizaka A (2006) Anti-high-mobility group box chromosomal protein 1 antibodies improve survival of rats with sepsis. *World J Surg* **30**: 1755-1762
- 220 Sugden D (1989) Melatonin biosynthesis in the mammalian pineal gland. *Experientia* **45**: 922-932
- 221 Tamura EK, Cecon E, Monteiro AW, Silva CL, Markus RP (2009) Melatonin inhibits LPS-induced NO production in rat endothelial cells. *J Pineal Res* **46**: 268-274
- 222 Tan DX, Poeggeler B, Reiter RJ, Chen LD, Chen S, Manchester LC, Barlow-Walden LR (1993) The pineal hormone melatonin inhibits DNA-adduct formation induced by the chemical carcinogen safrole in vivo. *Cancer Lett* **70**: 65-71
- 223 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**: 2294-2296

- 224 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
- 225 Tengattini S, Reiter RJ, Tan DX, Terron MP, Rodella LF, Rezzani R (2008) Cardiovascular diseases: protective effects of melatonin. *J Pineal Res* **44**: 16-25
- 226 Thompson MR, Xu D, Williams BR (2009) ATF3 transcription factor and its emerging roles in immunity and cancer. *J Mol Med (Berl)* **87**: 1053-1060
- 227 Ting KN, Dunn WR, Davies DJ, Sugden D, Delagrangre P, Guardiola-Lemaitre B, Scalbert E, Wilson VG (1997) Studies on the vasoconstrictor action of melatonin and putative melatonin receptor ligands in the tail artery of juvenile Wistar rats. *Br J Pharmacol* **122**: 1299-1306
- 228 Tomas-Zapico C, Coto-Montes A (2005) A proposed mechanism to explain the stimulatory effect of melatonin on antioxidative enzymes. *J Pineal Res* **39**: 99-104
- 229 Toussaint S, Gerlach H (2010) [Clinical value of the sepsis bundles and modes of implementation]. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* **45**: 566-571; quiz 572
- 230 Turchi L, Aberdam E, Mazure N, Pouyssegur J, Deckert M, Kitajima S, Aberdam D, Virolle T (2008) Hif-2alpha mediates UV-induced apoptosis through a novel ATF3-dependent death pathway. *Cell Death Differ* **15**: 1472-1480
- 231 Urata Y, Honma S, Goto S, Todoroki S, Iida T, Cho S, Honma K, Kondo T (1999) Melatonin induces gamma-glutamylcysteine synthetase mediated by activator protein-1 in human vascular endothelial cells. *Free Radic Biol Med* **27**: 838-847
- 232 Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B, Kinzler KW (1995) Serial analysis of gene expression. *Science* **270**: 484-487
- 233 Viswanathan M, Laitinen JT, Saavedra JM (1990) Expression of melatonin receptors in arteries involved in thermoregulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 6200-6203
- 234 Waldhauser F, Waldhauser M, Lieberman HR, Deng MH, Lynch HJ, Wurtman RJ (1984) Bioavailability of oral melatonin in humans. *Neuroendocrinology* **39**: 307-313
- 235 Wang H, Mo P, Ren S, Yan C (2010) Activating transcription factor 3 activates p53 by preventing E6-associated protein from binding to E6. *J Biol Chem* **285**: 13201-13210
- 236 Wang Z, Zhang J, Liu H, Huang H, Wang C, Shen Y, Li D, Jing H (2009) Melatonin, a potent regulator of hemeoxygenase-1, reduces cardiopulmonary bypass-induced renal damage in rats. *J Pineal Res* **46**: 248-254
- 237 Weinhouse GL, Schwab RJ (2006) Sleep in the critically ill patient. *Sleep* **29**: 707-716
- 238 White F, McCaig D, Brown SM, Graham DI, Harland J, Macrae IM (2004) Up-regulation of a growth arrest and DNA damage protein (GADD34) in the ischaemic human brain: implications for protein synthesis regulation and DNA repair. *Neuropathol Appl Neurobiol* **30**: 683-691

- 239 Whitlock NC, Bahn JH, Lee SH, Eling TE, Baek SJ (2011) Resveratrol-induced apoptosis is mediated by early growth response-1, Kruppel-like factor 4, and activating transcription factor 3. *Cancer Prev Res (Phila)* **4**: 116-127
- 240 Whitmore MM, Iparraguirre A, Kubelka L, Weninger W, Hai T, Williams BR (2007) Negative regulation of TLR-signaling pathways by activating transcription factor-3. *J Immunol* **179**: 3622-3630
- 241 Wichmann MW, Haisken JM, Ayala A, Chaudry IH (1996) Melatonin administration following hemorrhagic shock decreases mortality from subsequent septic challenge. *J Surg Res* **65**: 109-114
- 242 Wichterman KA, Baue AE, Chaudry IH (1980) Sepsis and septic shock--a review of laboratory models and a proposal. *J Surg Res* **29**: 189-201
- 243 Williams JG, Bernstein S, Prager M (1998) Effect of melatonin on activated macrophage TNF, IL-6, and reactive oxygen intermediates. *Shock* **9**: 406-411
- 244 Wolfgang CD, Liang G, Okamoto Y, Allen AE, Hai T (2000) Transcriptional autorepression of the stress-inducible gene ATF3. *J Biol Chem* **275**: 16865-16870
- 245 Wong CM, Cheema AK, Zhang L, Suzuki YJ (2008) Protein carbonylation as a novel mechanism in redox signaling. *Circ Res* **102**: 310-318
- 246 Wright KP, Jr., Gronfier C, Duffy JF, Czeisler CA (2005) Intrinsic period and light intensity determine the phase relationship between melatonin and sleep in humans. *J Biol Rhythms* **20**: 168-177
- 247 Wu CC, Chiao CW, Hsiao G, Chen A, Yen MH (2001) Melatonin prevents endotoxin-induced circulatory failure in rats. *J Pineal Res* **30**: 147-156
- 248 Wu DY, Tkachuck DC, Roberson RS, Schubach WH (2002) The human SNF5/INI1 protein facilitates the function of the growth arrest and DNA damage-inducible protein (GADD34) and modulates GADD34-bound protein phosphatase-1 activity. *J Biol Chem* **277**: 27706-27715
- 249 Wu JY, Tsou MY, Chen TH, Chen SJ, Tsao CM, Wu CC (2008) Therapeutic effects of melatonin on peritonitis-induced septic shock with multiple organ dysfunction syndrome in rats. *J Pineal Res* **45**: 106-116
- 250 Yagi A, Hasegawa Y, Xiao H, Haneda M, Kojima E, Nishikimi A, Hasegawa T, Shimokata K, Isobe K (2003) GADD34 induces p53 phosphorylation and p21/WAF1 transcription. *J Cell Biochem* **90**: 1242-1249
- 251 Yan C, Lu D, Hai T, Boyd DD (2005) Activating transcription factor 3, a stress sensor, activates p53 by blocking its ubiquitination. *EMBO J* **24**: 2425-2435
- 252 Yang H, Park SH, Choi HJ, Moon Y (2009) Epithelial cell survival by activating transcription factor 3 (ATF3) in response to chemical ribosome-inactivating stress. *Biochem Pharmacol* **77**: 1105-1115
- 253 Yavuz T, Kaya D, Behcet M, Ozturk E, Yavuz O (2007) Effects of melatonin on Candida sepsis in an experimental rat model. *Adv Ther* **24**: 91-100

- 
- 254 Yoshida T, Sugiura H, Mitobe M, Tsuchiya K, Shirota S, Nishimura S, Shiohira S, Ito H, Nobori K, Gullans SR, Akiba T, Nitta K (2008) ATF3 protects against renal ischemia-reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol* **19**: 217-224
- 255 Zhu HQ, Cheng XW, Xiao LL, Jiang ZK, Zhou Q, Gui SY, Wei W, Wang Y (2008) Melatonin prevents oxidized low-density lipoprotein-induced increase of myosin light chain kinase activation and expression in HUVEC through ERK/MAPK signal transduction. *J Pineal Res* **45**: 328-334
- 256 Zmuda EJ, Viapiano M, Grey ST, Hadley G, Garcia-Ocana A, Hai T (2010) Deficiency of Atf3, an adaptive-response gene, protects islets and ameliorates inflammation in a syngeneic mouse transplantation model. *Diabetologia* **53**: 1438-1450

## **7. Publikationen / Dank**

### **7.1 Publikationen**

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

#### **Dosisabhängigkeit der Verringerung der Letalität durch Melatonin nach polymikrobieller Sepsis bei der Ratte**

Michael Glas, Astrid Kleber, Daniel Kiefer, Thomas Volk, Alexander M. Mathes

Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg

Anästhesiologie & Intensivmedizin 2011; 52: S343 (PO-2.7.6)

## 7.2 Dank

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich in der Zeit des Studiums und insbesondere dieser Promotionsarbeit unterstützt haben und somit einen wesentlichen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit leisteten.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Alexander Mathes, dem ehemaligen Leiter des Forschungslabors des Institutes für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie am Universitätsklinikum des Saarlandes, der es mir ermöglichte, in seiner Arbeitsgruppe tierexperimentelle und molekularbiologische Arbeitstechniken zu erlernen und so Einblicke in die moderne medizinische Forschung zu erlangen. Vielen Dank für die Überlassung des Themas und die Unterstützung während der gesamten Promotion.

Bei Herrn Prof. Dr. Thomas Volk, dem Direktor der Klinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie am Universitätsklinikum des Saarlandes, bedanke ich mich für seine fortwährende Unterstützung der Forschungsarbeiten, welche die Durchführung der Experimente überhaupt erst ermöglicht.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei meinen Betreuern Frau Dr. Astrid Kleber und Herrn Dr. Michael Glas, denen es immer wieder gelang den Laboralltag abwechslungsreich zu gestalten und mich auch in schwierigen Zeiten zu motivieren. Von Beginn meiner Tätigkeit im Labor an waren beide für mich immer Ansprechpartner, die mit ihrer herausragenden fachlichen Kompetenz, offenen Art und nicht zuletzt ihrer Motivation wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen. Vielen Dank für das sorgfältige Korrekturlesen der Arbeit, die investierte Zeit, das mir entgegengebrachte Vertrauen und ganz besonders für die tolle Zusammenarbeit.

Ein großes Dankeschön gilt Frau Beate Wolf, die mich in die praktische Durchführung der molekularbiologischen Experimente einwies und durch ihre große Erfahrung, umsichtige Art und Geduld wesentlich zum Gelingen der Experimente beitrug. Auch gelang es ihr, mich nach fehlgeschlagenen Experimenten immer wieder neu für die Arbeit zu motivieren und eine sehr angenehme Arbeitsatmosphäre zu schaffen.

---

Bei meinen Mitdoktorandinnen Maria Teresa Schornberg und Nadine Hempel möchte ich mich für die gute und abwechslungsreiche Zusammenarbeit, die angenehme Zeit im Labor und ihre Unterstützung herzlich bedanken.

Ein ganz besonderer Dank gilt Christina Scheer, die mir in der Zeit der Promotion immer ein Rückhalt war, mir stets geduldig zur Seite stand und mich auch in schwierigen Phasen, insbesondere der anstrengenden Zeit der Laborarbeit neben dem Studium, immer unterstützte.

An dieser Stelle gebührt meiner Familie ein ganz besonderer Dank für ihre Unterstützung. Durch den ständigen uneingeschränkten Rückhalt meiner Eltern nicht nur bei dieser Promotionsarbeit, sondern bei all meinen Vorhaben wurden mir die Durchführung des Medizinstudiums und die Erstellung dieser Dissertation erst ermöglicht. Hierfür kann ich mich nicht genug bedanken.