

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

**Exogenes Melatonin führt zur Modifikation der zellulären Stressantwort in der Leber  
nach polymikrobieller Sepsis in der Maus**

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät**

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2019

vorgelegt von: Daniel Christoph Rössler  
geb. am: 27.01.1988 in Neustadt a.d. Waldnaab

Tag der mündlichen Promotion: 06.07.2020

Dekan der Medizinischen Fakultät: Univ.-Prof. Dr. med. Michael D. Menger

Erstberichterstatter: PD Dr. med. Tobias Fink D.E.S.A.

Zweitberichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. Frank Lammert

## Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis von Abkürzungen .....	6
1. Zusammenfassung/Summary .....	3
1.1. Zusammenfassung .....	3
1.2. Summary.....	5
2. Einleitung .....	7
2.1. Sepsis	
2.1.1. Definition.....	7
2.1.2. Pathophysiologie der Sepsis .....	9
2.1.3. Therapie der Sepsis.....	11
2.2. Oxidativer und nitrosativer Stress .....	13
2.2.1. Reaktive Sauerstoffspezies .....	13
2.2.2. Reaktive Stickstoffspezies.....	13
2.2.3. Pathophysiologie .....	14
2.3. Vaskuläres Zelladhäsionsmolekül-1 (VCAM-1) und intrazelluläres Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1).....	15
2.4. Unfolded Protein Response .....	17
2.4.1. Endoplasmatisches Retikulum und Physiologie.....	17
2.4.2. ER-Stress und Unfolded Protein Response .....	17
2.4.3. PERK-Signalweg.....	18
2.4.4. CHOP.....	19
2.4.5. IRE1 .....	19
2.4.6. ATF6.....	20
2.5. cAMP-responsive-element-binding-protein H (CREBH) .....	21
2.6. Melatonin.....	22
2.6.1. Physiologie .....	22
2.6.2. Melatonin-Signaltransduktion .....	23
2.6.3. Melatonin und oxidativer Stress .....	23
2.6.4. Melatonin in der Sepsis .....	25
2.7. Ziel der Arbeit .....	27
3. Material und Methoden .....	28
3.1. Material.....	28
3.1.1. Geräte.....	28
3.1.2. Verbrauchsmaterialien.....	29

3.1.3.	Reagenzien und Chemikalien .....	29
3.1.4.	Lösungen und Puffer .....	31
3.2.	Methoden.....	35
3.2.1.	Tierexperimenteller Teil .....	35
3.2.1.1.	Versuchstiere .....	35
3.2.1.2.	Narkoseeinleitung und Lagerung.....	35
3.2.1.3.	Chirurgische Präparation .....	36
3.2.1.4.	Versuchsgruppen .....	37
3.2.1.5.	Versuchsprotokoll.....	37
3.2.2.	Molekularbiologischer Teil .....	38
3.2.2.1.	Western Blot.....	38
3.2.2.2.	Funktionsprinzip .....	38
3.2.2.2.1.	Probenaufarbeitung.....	38
3.2.2.2.2.	SDS-PAGE .....	38
3.2.2.2.3.	Blot .....	39
3.2.2.2.4.	Antigen-Antikörper-Reaktion und Detektion.....	39
3.2.2.2.5.	Strippen der Membran .....	40
3.2.2.2.6.	Auswertung des Western Blots.....	41
3.2.2.3.	RNA-Expressionsanalyse .....	41
3.2.2.3.1.	RNA-Isolierung .....	41
3.2.2.3.2.	RNA-Aufarbeitung .....	42
3.2.2.3.2.1.	Konzentrationsbestimmung .....	42
3.2.2.3.2.2.	Bestimmung der Reinheit .....	42
3.2.2.3.2.3.	Einschätzung der RNA-Integrität .....	42
3.2.2.3.2.4.	Entfernung von DNA-Resten .....	43
3.2.2.3.3.	Reverse Transkription.....	43
3.2.2.3.4.	Quantitative real-time PCR (RT-qPCR).....	44
3.2.2.3.5.	Auswertung der RT-qPCR.....	46
3.2.2.4.	Elektronenspinresonanz-Spektroskopie.....	47
3.2.2.4.1.	Funktionsprinzip .....	47
3.2.2.4.2.	Spin trapping und probing .....	49
3.2.2.4.3.	Versuchsdurchführung.....	50
3.2.3.	Software und Statistik.....	51
3.2.3.1.	Statistische Analyse und Graphische Darstellung .....	51

3.2.3.2.	Verwendete Software .....	52
4.	Ergebnisse .....	53
4.1.	Superoxidgehalt der untersuchten Organe.....	53
4.2.	Westernblot-Analysen .....	54
4.2.1.	Expression von VCAM-1 und ICAM-1 .....	54
4.2.2.	Expression der SOD-1 .....	54
4.2.3.	Expression von ERK1/2 und Phosphorylierung.....	55
4.2.4.	Expression von gespaltener Caspase-3 und Caspase-12 .....	56
4.3.	Genexpressionsanalyse.....	57
4.3.1.	Expressionsanalyse von vcam-1 und icam-1 .....	57
4.3.2.	Expressionsanalysen von atf6, ire1 $\alpha$ , s-xbp1 und grp78.....	58
4.3.3.	Expressionsanalyse von perk.....	58
4.3.4.	Expressionsanalyse von chop .....	59
4.3.5.	Expressionsanalyse von crebh .....	60
5.	Diskussion .....	61
5.1.	Wertung der Methodik .....	61
5.1.1.	Tiermodell .....	61
5.1.2.	Melatoninkonzentration und Art der Applikation .....	63
5.1.3.	Genexpressionsanalyse mittels RT-qPCR.....	65
5.1.4.	Proteinanalytik mittels Western Blot.....	66
5.1.5.	Elektronenspinresonanz-Spektroskopie.....	66
5.2.	Wertung der Ergebnisse .....	69
5.2.1.	Oxidativer Stress.....	69
5.2.2.	ER-Stress .....	71
5.2.2.1.	Aktivierung der Unfolded Protein Response.....	71
5.2.2.2.	Aktivierung von PERK und CHOP.....	72
5.2.2.3.	CREBH.....	75
6.	Schlussfolgerung .....	77
7.	Literaturverzeichnis.....	78
8.	Publikation .....	99
9.	Dank .....	100
10.	Lebenslauf .....	101

## Verzeichnis von Abkürzungen

$^1\text{O}_2$	Singulett Sauerstoff
6-OHMS	6-Hydroxymelatonin
AA-NAT	Arylalkylamin-N-Acetyltransferase
AARE	Aminosäure-regulatorisches Element
ACCP	American College of Chest Physicians
AFMK	N-Acetyl-N-formyl-5-methoxykynuramin
AMK	N-Acetyl-5-methoxykynuramin
APR	Akuten Phase Reaktion
ATF2	Aktivierender Transkriptionsfaktor 2
ATF3	Aktivierender Transkriptionsfaktor 3
ATF4	Aktivierender Transkriptionsfaktor 4
ATF6	Aktivierender Transkriptionsfaktor 6
ASK1	apoptosis-signal-regulating kinase 1
ATP	Adenosintriphosphat
B	Feldintensität
Bcl-2	B-Zell-Lymphom-2
Bcl-X	B-Zell-Lymphom-x
BSA	Bovines Serumalbumin
CaMKII	Calcium-Calmodulin-abhängige Proteinkinase II
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
Casp-3	Caspase-3
CBP	cAMP-responsive-element-binding-protein binding protein
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cCasp-3	Cleaved Caspase-3
cCasp-12	Cleaved Caspase-12
CHOP	CCAAT/enhancer-binding-protein (C/EBP) homologous protein
CI	Kontrollierte Inokulation
CLI	Coecum Ligatur und Inzision
CMH	1-Hydroxy-3-methoxycarbonyl -2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine
$\text{CO}_3^{2-}$	Carbonat
COPII	coat protein complex II
COS-1	CV-1-in-origin-carring-SV40-1

CPH	1-Hydroxy-3-carboxy-2,2,5,-tetramethylpyrrolidinhydrochlorid
Cq	cycle quantification
CRE	cAMP-responsive-element
CREB	cAMP-responsive-element-binding-protein
CREBH	cAMP-responsive-element-binding-protein H
CRP	C-reaktives Protein
DAMP	damage-associated molecular patterns
DEPC	Diethylcarbonat
DETC	Diethyldithiocarbamat
DMPO	5,5-dimethyl-pyrrolin-N-oxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOC	downstream-of-CHOP
EDEM	ER degradation-enhancing $\alpha$ -mannosidase-like protein
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGDT	early goal directed therapy
eIF2 $\alpha$	eukaryotic translation initiation factor 2 $\alpha$
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	endoplasmic-reticulum-associated protein degradation
ERK	extracellular-signal regulated kinase
ERO1	Endoplasmatisches Retikulum Oxidoreduktase 1
ERQC	ER-Qualitätskontrollsystem
ERR $\gamma$	estrogen-related receptor $\gamma$
ERSE	ER-stress response elements
ESR	Elektronenspinresonanz-Spektroskopie
FiO <sub>2</sub>	Inspiratorische Sauerstofffraktion
g	Landé-Faktor
GADD34	Growth-arrest-and-DNA-damage-inducible protein 34
GRP58	glucose-regulated protein 58 Kilodalton
GRP78	glucose-regulated protein 78 Kilodalton
GRP94	glucose-regulated protein 94 Kilodalton
h	Plancksches Wirkungsquantum
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Schwefelsäure

HIOMT	Hydroxyindol-O-Methyl-Transferase
HRD1	3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme-A reductase degradation protein 1
ICAM	Intrazelluläres Adhäsionsmolekül
IE	Internationale Einheit
IL-1	Interleukin-1
IL-1RA	Interleukin-1-Rezeptorantagonist
IL-2	Interleukin-2
IL-4	Interleukin-4
IL-6	Interleukin-6
IL-10	Interleukin-10
IL-12	Interleukin-12
INF $\gamma$	Interferon $\gamma$
iNOS	Induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase
IP3R	Inositol-Triphosphat-Rezeptor
i.v.	Intravenös
IRE	inositol-requiring enzyme
IRES	internal ribosome entry site
JNK	c-Jun N-terminal kinase
Keap1	Kelch-like ECH-associated protein 1
KG	Körpergewicht
LBP	LPS-bindendem Protein
LFA-1	Leukozytenfunktion-assoziiertes Antigen-1
LOD	Detektionslimit
LPS	Lipopolysaccharid
$\mu$ B	Bohrsches Magneton
MAC-1	Makrophagen-Adhäsion-Ligand-1
Maf	musculoaponeurotic fibrosarcoma
MAP	mitogen-activated protein
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MHC-II	major histocompatibility complex-II
mitoTEMPO-H	1-Hydroxy-4-[2-(triphenylphosphonio)-acetamido]-2,2,6,6-tetramethylpiperidin
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure

mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MW	Mittelwert
NADPH	Nicotinamidadeninukleotidphosphat
NCBI	National Center for Biotechnology Information
nNOS	Neuronale Stickstoffmonoxidsynthase
NO	Stickstoffmonoxid
NO <sub>2</sub> ·	Stickstoffdioxidradikale
NOS	Stickstoffmonoxidsynthase
Nrf2	nuclear factor erythroid 2–related factor 2
NTC	non-template control
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
O <sub>2</sub> ·-	Superoxidradikal
OH·	Hydroxylradikal
oxLDL	Oxidiertes Low Density Lipoprotein
P58IPK	p58 Inositolphosphat Kinase
P38MAPK	P38 mitogen-activated protein kinase
PAF	Plättchen-aktivierender Faktor
PAMP	pathogen-associated molecular patterns
PCR	Polymerasekettenreaktion
pCREBH	Phosphoryliertes cAMP-responsive-element-binding protein H
PDI	Proteindisulfidisomerase
PERK	double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase
PKA	Proteinkinase A
PPI	Protein Phosphatase I
pO <sub>2</sub>	Sauerstoffpartialdruck
PRR	pattern recognition receptors
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RIDD	regulated-IRE1-dependent decay
RIP	Regulierte Intramembranproteolyse
RNA	Ribonukleinsäure
RNS	Reaktive Stickstoffspezies
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	rounds per minute

rps16	Ribosomales Protein S16
RT	Reverse Transkriptase
RT-qPCR	Quantitative real-time Polymerasekettenreaktion
SAP	Serum Amyloid-P Komponente
SCCM	Society of Critical Care Medicine
SCN	Nucleus suprachiasmaticus
ScvO <sub>2</sub>	Zentralvenöse Sauerstoffsättigung
SDHA	Untereinheit A des Succinat-Dehydrogenase-Komplexes
SE	Standardfehler
SIRS	systemic inflammatory response syndrome
SOD	Superoxiddismutase
SOFA	Sequential Organ Failure Assessment
SSC	Surviving Sepsis Campaign
sXBP1	spliced X-box-binding protein 1
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
TRAF2	tumor-necrosis-factor-receptor-associated factor 2
TRB3	tribbles-related protein 3
TTBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween20
UPR	Unfolded Protein Response
VAP-1	Vaskuläres-Adhäsionsprotein-1
v	Frequenz
VCAM	Vaskuläres Zelladhäsionsmolekül
XBP1	X-box-binding-protein 1
ZNS	Zentrales Nervensystem
ZVD	Zentralvenöser Druck
ZVK	Zentralvenösen Katheter

## 1. Zusammenfassung/Summary

### 1.1. Zusammenfassung

Die Sepsis ist aufgrund ihrer Häufigkeit und hohen Mortalität ein Krankheitsbild mit herausragender klinischer Bedeutung. Neben der Sanierung des Infektfokus und einer antibiotischen Therapie beschränken sich die aktuell verfügbaren Therapiemöglichkeiten auf eine Stabilisierung des Patienten und die Behandlung der sich entwickelnden Organfehlfunktionen. Eine spezifische supportive Therapie konnte bisher, trotz vielfacher wissenschaftlicher Bemühungen, noch nicht etabliert werden.

Die Komplexität der pathophysiologischen Zusammenhänge des Krankheitsbildes erschwert die Identifizierung von Therapiemechanismen. Einen möglichen Ansatzpunkt stellt oxidativer Stress dar. In vorangegangenen experimentellen und vereinzelt klinischen Untersuchungen konnte ein positiver Effekt von Melatonin auf das Redoxgleichgewicht belegt werden. Unserer Arbeitsgruppe war es zudem möglich eine dosisabhängige Lebensverlängerung während einer polymikrobiellen Sepsis in der Maus durch Melatonin zu zeigen. Wie dieser Effekt vermittelt wird, ist bisher nicht abschließend geklärt. Weitere Bereiche der zellulären Stressantwort müssen in Betracht gezogen werden. Hierzu gehören die Mechanismen der Zelle als Reaktion auf den vermehrten Anfall fehlgefalteter Proteine im Endoplasmatischen Retikulum, welche als Unfolded Protein Response bezeichnet werden. Verbindungen zur Sepsis sind beschrieben, der Einfluss von Melatonin ist jedoch weitgehend unklar.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Auswirkungen von Melatonin auf Marker für oxidativen Stress und Unfolded Protein Response zu evaluieren und mögliche Verbindungen aufzudecken. Zu diesem Zweck wurden männliche C3H / HeN Mäuse einer Scheinoperation unterzogen oder durch Coecum Ligation und Inzision eine polymikrobielle Sepsis induziert. Es wurde Melatonin in einer Dosis von 1 mg / kg / Körpergewicht oder Vehikellösung injiziert und nach 5 Stunden in Narkose die Organe der Tiere entnommen. Der Gehalt an Superoxid in Aorta, Leber und Milz wurde mittels Elektronenspinresonanz-Spektroskopie bestimmt. Protein- und mRNA-Expression verschiedener Marker der zellulären Stressantwort in der Leber wurden respektive mit Western Blot und quantitativer Echtzeit-Polymerasekettenreaktion bestimmt.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die Sepsis zu einem durch Melatonin reversiblen Anstieg der Superoxidkonzentration in Leber und Aorta führt, während sich die in der Milz bereits basal erhöhten Konzentrationen unbeeinflusst zeigten. Die hepatische Expression der

Superoxiddismutase korrelierte nicht mit den veränderten Konzentrationen an reaktiven Sauerstoffspezies. Melatonin hatte keine Wirkung auf den Expressionsanstieg der Adhäsionsmoleküle vaskuläres Zelladhäsionsmolekül-1 und intrazelluläres Adhäsionsmolekül-1 in der Sepsis. Ein ähnliches Verhalten der Phosphorylierung von extracellular-signal regulated kinases 1 / 2 zu den Adhäsionsmolekülen lässt eine Beteiligung an deren Regulation möglich erscheinen. Ein generell induzierender Effekt der Sepsis auf die Unfolded Protein Response blieb entgegen früherer Beobachtungen aus. Als Erklärung für die heterogene Datenlage kommen abweichende Sepsismodelle und die Untersuchung unterschiedlicher Organe bzw. Zelllinien in Betracht. Melatonin führte im angewandten Versuchsaufbau in der Leber septischer Mäuse zu einer Aktivierung der protein kinase ribonucleic acid-like endoplasmic reticulum kinase und des nachgeschalteten CCAAT / enhancer-binding-protein homologous protein. Dieser Signalweg stellt über den Verbrauch von Redoxäquivalenten und die Endoplasmatisches Retikulum Oxidase 1 eine mögliche Verbindung zwischen Unfolded Protein Response und oxidativem Stress dar.

In der vorliegenden Arbeit konnten Erkenntnisse über die Vermittlung des protektiven Effekts von Melatonin in der Sepsis gewonnen werden. Zudem wurden Anhaltspunkte für weitere Studien generiert und Faktoren identifiziert die hierbei besonderer Berücksichtigung bedürfen.

## 1.2. Summary

Sepsis is due to its prevalence and high mortality a disorder with exceptional clinical significance. Apart from removal of the focus of infection and antibiotic treatment therapeutic options are currently limited to stabilizing the patient and compensating the developing organ dysfunction. So far, a specific supportive therapy could not be established despite extensive scientific effort.

The complexity of underlying pathophysiology of the disease has hindered identification of therapeutic targets. Oxidative stress poses a possible area of interest in this regard. Previous experimental and a limited number of clinical studies have shown promising results concerning the positive effect of melatonin on redox balance. Our working group was able to show a dose dependent prolongation of survival by melatonin in mice in polymicrobial sepsis. How this was mediated remains to be clarified but other areas of cellular stress response have to be considered apart from oxidative stress. This includes cells mechanisms in coping with an increasing amount of misfolded protein in the endoplasmic reticulum which are summarized under the term unfolded protein response. Relevance of this process in sepsis has been noted but the role of melatonin remains largely unclear.

In this study we aimed to elicit the effects of melatonin on common markers of oxidative Stress and the unfolded protein response and identify possible connections. For this male C3H / HeN mice were submitted to sham operation or underwent cecal ligation and incision to induce sepsis under anesthesia. 1 mg / kg bodyweight of melatonin or vehicle solution were administered and after 5 hours the animals' organs were removed. The concentration of superoxide in aorta, liver and spleen was measured with electron spin resonance. Protein and mRNA expression levels were determined by western blot analysis and quantitative real-time polymerase chain reaction respectively.

The results indicate a rise in the superoxide concentration in liver and aorta of septic animals reversible by application of melatonin whereas already initially elevated concentrations in the spleen remained unchanged. No correlation between hepatic expression of superoxide dismutase and concentration on reactive oxygen species was seen. Melatonin did not influence the rise in expression of adhesion molecules vascular cell adhesion molecule-1 and intracellular cellular adhesion molecule-1 caused by sepsis. A similar behavior of the phosphorylation of extracellular-signal regulated kinases 1 / 2 to changes in protein expression lets involvement in regulation of these adhesion molecules seem possible. An inducing effect of sepsis on the unfolded protein response in general could not be shown contrary to previous observations. The

heterogenicity of data might be caused by varying sepsis models and differences in examined cell lines or organs. Melatonin in this experimental set up led to activation of protein kinase ribonucleic acid-like endoplasmic reticulum kinase and the downstream CCAAT / enhancer-binding-protein homologous protein in the liver of septic mice. This signaling pathway poses a possible connection between oxidative stress and unfolded protein response by reduction in consumption of redox equivalents and involvement of endoplasmic reticulum oxidase 1.

The presented study was able to gather evidence on the mediation of the protective effects of melatonin in sepsis. Further objectives for subsequent studies were generated along with factors which thereby demand special consideration.

## 2. Einleitung

### 2.1. Sepsis

#### 2.1.1. Definition

„Sepsis ist eine lebensbedrohliche Organfehlfunktion verursacht durch eine fehlregulierte Wirtsantwort auf eine Infektion“. Zu diesem Schluss kam 2016 der Arbeitskreis der European Society of Intensive Care Medicine und der Society of Critical Care Medicine (203).

Die Definition des Begriffes Sepsis wird jedoch seit seiner Entstehung kontrovers diskutiert. Den Grundstein für die moderne Definition des Begriffs legte 1914 Hugo Schottmüller in seiner Abhandlung „Wesen und Behandlung der Sepsis“. In dieser beschrieb er zum ersten Mal die Vorstellung eines Herdes innerhalb des Körpers der durch Freisetzung pathogener Bakterien in den Blutkreislauf Krankheitserscheinungen auslöst (197).

1989 stellten Bone et al. mit dem Begriff des „sepsis syndrome“ klinisch erhebbare Parameter in den Mittelpunkt (24). Dieser Ansatz wurde 1991 in der ersten Konsensuskonferenz des American College of Chest Physicians (ACCP) und der Society of Critical Care Medicine (SCCM) aufgegriffen. Deren Ziel war es, in diesem umstrittenen Bereich eine einheitliche Nomenklatur mit klinisch nutzbaren Definitionen zu erarbeiten. Nachfolgend wurden folgende Empfehlungen festgehalten (25). Um die Sepsis als infektiionsbedingtes Krankheitsbild von ähnlichen entzündlichen Prozessen abzugrenzen wurde das systemic inflammatory response syndrome (SIRS) definiert. Es besteht wenn mindestens 2 der nachstehenden Kriterien zutreffen (25):

- Körpertemperatur  $> 38^{\circ}\text{C}$  oder  $< 36^{\circ}\text{C}$
- Herzfrequenz  $> 90 / \text{min}$
- Tachypnoe  $> 20 / \text{min}$  und/oder arterieller  $\text{PaCO}_2 < 32\text{mmHg}$  und/oder maschinelle Beatmung
- Leukozytenzahl  $> 12000 / \mu\text{l}$ ,  $< 4000 / \mu\text{l}$  mehr als 10 % stabkernige Granulozyten

Nach dieser Definition setzt die Diagnose Sepsis eine SIRS mit zusätzlichem mikrobiologischem oder klinischem Nachweis einer Infektion voraus. Darüber hinaus wurden die Begriffe der schweren Sepsis und des septischen Schocks definiert. Bei der schweren Sepsis handelt es sich um eine Sepsis, die mit einer Organdysfunktion, Hypoperfusion oder Hypotension einhergeht. Der septische Schock wurde als Zustand definiert, bei dem Hypotension und Hypoperfusion trotz adäquater Volumensubstitution fortbestehen (25).

Seit Einführung der oben genannten Definition wurden, wie z.B. in der International Sepsis Definitions Conference 2001 (131), wiederholt Versuche unternommen Verbesserungen, unter anderem an der mangelnden Spezifität, der beschlossenen Kriterien zu erreichen.

Die dritte Revision des internationalen Konsensus (SEPSIS-3) stellt die klinische Herangehensweise weiter in den Vordergrund. Von der Anwendung der SIRS-Kriterien auf die Sepsis wurde Abstand genommen und der Begriff der schweren Sepsis verworfen. Dies verankert das Vorliegen einer Organfehlfunktion als zentrales Konzept des Arbeitskreises der European Society of Intensive Care Medicine und der Society of Critical Care Medicine 2016 zur Definition der Sepsis (203). Der Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) Score als Alternative zu den SIRS-Kriterien soll dem Rechnung tragen (225) (Tabelle 1). Ein Anstieg um 2 Punkte über den Ausgangswert spricht laut Empfehlung für eine Dysfunktion. Als Ausgangswert sollte in der Regel 0 angenommen werden, es sei denn bei einem Patienten liegen bekannte Funktionseinschränkungen vor, welche nicht im Zusammenhang mit der Infektion stehen (203).

Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) Score					
Organsystem	0	1	2	3	4
Respiration, pO <sub>2</sub> / FiO <sub>2</sub> (mmHg)	≥ 400	< 400	< 300	< 200 <sup>[1]</sup>	< 100 <sup>[1]</sup>
Gerinnung, Thrombozyten (×10 <sup>3</sup> / mm <sup>3</sup> )	≥ 150	< 150	< 100	< 50	< 20
Kreislauf	MAP ≥ 70 mmHg	MAP < 70 mmHg	Dopamin < 5 oder Dobutamin (jede Dosis) <sup>[2]</sup>	Dopamin 5 – 15 oder Adrenalin ≤ 0,1 oder Noradrenalin ≤ 0,1 <sup>[2]</sup>	Dopamin > 15 oder Adrenalin > 0,1 oder Noradrenalin > 0,1 <sup>[2]</sup>
Leber, Bilirubin (mg / dl)	< 1,2	1,2 – 1,9	2,0 – 5,9	6,0 – 11,9	> 12
ZNS, Glasgow Coma Scale	15	14 – 13	12 – 10	9 – 6	< 6
Niere, Kreatinin (mg / dl), Diurese (ml / Tag)	< 1,2	1,2 – 1,9	2 – 3,4	3,5 – 4,9 < 500	> 5,0 < 200

**Tabelle 1.** Der Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) Score. Entnommen und modifiziert nach Vincent et al. (225).

[1] Unter respiratorischer Unterstützung. [2] Katecholamindosen als µg / kg / min für mindestens 1 h. FiO<sub>2</sub>: Inspiratorische Sauerstofffraktion, MAP: mittlerer arterieller Druck, pO<sub>2</sub>: Sauerstoffpartialdruck, ZNS: Zentrales Nervensystem, mmHg: mm Quecksilbersäule.

Zur Vereinfachung und um eine möglichst schnelle Einschätzung unter Notfallbedingungen zu ermöglichen, wird zudem der quickSOFA Score (qSOFA, Tabelle 2) empfohlen. Zwei erfüllte Kriterien sprechen für eine Organfehlfunktion und damit für eine schlechte Prognose (203).

qSOFA Kriterien
Atemfrequenz $\geq 22$ / min
Bewusstseinsbeeinträchtigung vorhanden
Systemischer Blutdruck $\leq 100$ mmHg

**Tabelle 2.** Quick Sequential Organ Failure Assessment Score

Des Weiteren wurde der Begriff des septischen Schocks mittels neuer Kriterien aktualisiert. Er besteht, wenn zur Aufrechterhaltung eines mittleren arteriellen Drucks (MAP)  $\geq 65$  mmHg eine Vasopressortherapie notwendig ist und / oder eine Laktatkonzentration von  $> 2$  mmol / l (18 mg / dl) trotz adäquater Volumentherapie besteht (203).

Diese Aktualisierungen, die Einführung der Organfehlfunktion als Pflichtkriterium und die damit assoziierten Diagnostikkriterien für die Sepsis, stellen zusammengefasst die wesentlichen Punkte der SEPSIS-3 Definition dar. Die dargestellten Neuerungen sind weiterhin Gegenstand fortlaufender Evaluation, so werden insbesondere die Vor- und Nachteile der einzelnen Scores kontrovers diskutiert (150).

### 2.1.2. Pathophysiologie der Sepsis

Bei der Sepsis handelt es sich um einen komplexen und zum jetzigen Zeitpunkt nicht vollständig verstandenen Prozess, bei dem eine initial vorhandene Infektion zu einer verlängerten und variabel verlaufenden Wirtsantwort führt. Hierbei nehmen sowohl pro- als auch antiinflammatorische Faktoren positive und negative Einflüsse auf den Krankheitsverlauf (11).

Am Anfang der Sepsis steht ein infektiöser Stimulus, welcher prinzipiell von allen Arten von Mikroorganismen ausgehen kann, meist jedoch auf grampositive und -negative Bakterien zurückzuführen ist (29). Diese tragen in ihrer Zellmembran bzw. -wand Bestandteile, welche von sogenannten pattern recognition receptors (PRR) auf Makrophagen und dendritischen Zellen wahrgenommen werden und zu einer Aktivierung der angeborenen Immunantwort führen. Im Falle von gramnegativen Erregern handelt es sich hierbei vor allem um Lipopolysaccharid (LPS), welches aus der Zellmembran freigesetzt wird und eine sehr hohe Affinität zu LPS-bindendem Protein (LBP) aufweist. Der LPS-LPB-Komplex transferiert LPS

an verschiedene Membranproteine, welche mit dem Toll-like-Rezeptor-4 (TLR4) interagieren und zu einer Konformationsänderung dieses PRR führen (140). Einen ähnlichen, jedoch geringer ausgeprägten Effekt wie LPS löst Peptidoglykan aus, welches neben Lipoteichonsäure einen Hauptbestandteil der Zellwand grampositiver Bakterien bildet. Es stellt einen Liganden des Toll-like-Rezeptor-2 dar (228). Die exogenen Strukturen werden als pathogen-associated molecular patterns (PAMP) bezeichnet. Daneben existieren damage-associated molecular patterns (DAMP), welche von geschädigtem körpereigenem Gewebe ausgehen (210).

Als einer der bedeutendsten, durch die Stimulation von PRR ausgelösten Signalwege, gilt die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B. Dieser ist an der Expressionsregulation von mehr als 150 Genen beteiligt, welche unter anderem für Zytokine, Adhäsionsmoleküle, Enzyme und Zellzyklusregulatoren kodieren (188). Insbesondere vermittelt durch Monozyten und Makrophagen kommt es zur vermehrten Bildung von proinflammatorischen Zytokinen wie Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-12 (IL-12) und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) (47).

Einen potenteren Weg der Aktivierung nutzen sogenannte Superantigene. Konventionelle Antigene werden von Immunzellen prozessiert und nach Präsentation in Form von kleinen Fragmenten von Lymphozytenrezeptoren erkannt. Superantigene aktivieren T-Lymphozyten hingegen durch direkte Interaktion zwischen major histocompatibility complex-II (MHC-II) und dem T-Zell-Rezeptor. Hierdurch kommt es zu einer massiven Aktivierung von Typ1-T-Helferzellen und Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF $\alpha$ , Interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) und Interleukin-2 (IL-2). Beispiele für Superantigene sind die Staphylokokken-Enterotoxine A bis E und Streptococcus pyrogenes Exotoxin A und C (177).

In Folge der Aktivierung durch Zytokine exprimieren Endothelzellen vermehrt Adhäsionsmoleküle, an welche Neutrophile, Makrophagen, Thrombozyten und andere Effektorzellen binden. Die Freisetzung von antiinflammatorisch wirkenden Zytokinen, wie Interleukin-10 (IL-10), Interleukin-4 (IL-4) und Interleukin-1-Rezeptor-Antagonisten (IL-1RA) kann, z.B. durch Induktion der Apoptose aktivierter Zellen, eine überschießende Wirtsantwort verhindern (47). Gelingt dies nicht in ausreichendem Maße kann die Ausschüttung von Mediatoren wie Proteasen, Oxidantien, Prostaglandinen und Leukotrienen zu einer Endothelschädigung führen. Dies geht mit einer erhöhten Permeabilität, Vasodilatation und gestörten Blutgerinnung einher (188). Den resultierenden Mikrozirkulationsstörungen kommt eine zentrale Rolle in der Pathophysiologie der Sepsis zu. Unbehandelt führen sie zu Gewebshypoxie und können Organschädigungen bis zum Tod zur Folge haben (215).

### 2.1.3. Therapie der Sepsis

Trotz der enormen Bedeutung mit einer Prävalenz von 76 – 110 schwerer Sepsis Erkrankungen pro 100 000 Einwohner in Deutschland, mit einer Mortalität von 55 % (70) und intensiver Forschung sind die Therapiemöglichkeiten weiterhin eingeschränkt.

Der bisher umfassendste Versuch einer strukturierten Herangehensweise und Verbesserung des Outcomes dieses komplexen Krankheitsbildes stellt die 2002 ins Leben gerufene Surviving Sepsis Campaign (SSC) dar. Dieses Gremium veröffentlichte seither evidenzbasierte Leitlinien, von denen die aktuellste Version aus dem Jahre 2016 stammt (184). Einen zentralen Bestandteil stellt die von Rivers et al. 2001 postulierte „early goal directed therapy“ (EGDT) dar (185). Dieses Konzept zielt auf eine Optimierung der Sauerstoffversorgung durch Beeinflussung des Preloads, Afterloads und der myokardialen Kontraktilität ab. Hierzu sollten innerhalb der ersten drei Stunden der Behandlung 30 ml / kg / Körpergewicht an kristalloiden Lösungen verabreicht werden. Die Definierung klarer Zielparameter zur Beurteilung des Erfolgs dieser Maßnahme wurde in der Aktualisierung 2016 größtenteils verworfen. Insbesondere von der Steuerung der Volumentherapie anhand des zentralvenösen Drucks wurde aufgrund neuer Erkenntnisse Abstand genommen (72). Es wird eine gründliche klinische Beurteilung und die Evaluation aller verfügbaren physiologischen Parameter einschließlich Herzfrequenz, Blutdruck, Atemfrequenz, Urinausscheidung und Temperatur empfohlen. Bei Patienten unter Vasopressortherapie sollte ein mittlerer arterieller Druck von 65 mmHg und bei erhöhten Lactatspiegeln eine Normalisierung dieser angestrebt werden (184).

Wichtigste Basis einer suffizienten Therapie stellen die kausalen Ansätze Herdsanierung und antibiotische Therapie, sowie eine hämodynamischer Stabilisierung dar (178). Für Patienten, bei denen eine chirurgische oder interventionelle Fokussanierung möglich war, konnte eine reduzierte Mortalität belegt werden (151). Die Datenlage zur Auswirkung des Zeitpunkts der Intervention ist hierbei beschränkt. Eine unzureichende Kontrolle des Infektionsherdes zieht ein verschlechtertes Therapieergebnis nach sich (116). Die frühzeitige Einleitung von Stabilisierung und antibiotischer Therapie trägt maßgeblich zur Verbesserung des Outcomes bei (33, 149, 176). In einer retrospektiven Kohortenanalyse an Patienten im septischen Schock konnte gezeigt werden, dass die Sterblichkeit durch Verzögerungen bei der Einleitung einer effektiven Antibiotikatherapie um 7,6 % pro Stunde ansteigt (118). Aus diesem Grund wurden zusätzlich zu den Leitlinien der SSC zwei Bündel an Maßnahmen etabliert um den Therapiebeginn zu optimieren (Tabelle 3 und 4). In einer Analyse der Behandlung von 1794 Patienten mit schwerer Sepsis und septischem Schock war eine Compliance mit dem 3 bzw. 6 Stunden Bündel an Maßnahmen mit einer Reduktion der Mortalität vergesellschaftet (183).

<b>Durchzuführen innerhalb von 3 Stunden nach Vorstellung</b>
Bestimmung der Laktatkonzentration im Blut
Abnahme von Blutkulturen vor Antibiotikaapplikation
Verabreichung von Breitspektrumantibiotika
Verabreichung von 30 ml / kg / Körpergewicht Kristalloiden bei Hypotension oder Laktat $\geq$ 4 mmol / l

**Tabelle 3.** 3-Stunden-Bündel (nach <http://www.survivingsepsis.org/Bundles>)

<b>Durchzuführen innerhalb von 6 Stunden nach Vorstellung</b>
Vasopressortherapie mit Ziel-MAP $\geq$ 65 mmHg (bei mangelndem Ansprechen auf initiale Volumengabe)
Überprüfung und Dokumentation des Volumenstatus bei persistierender Hypotension trotz initialer Volumengabe oder bei initialem Laktat $\geq$ 4 mmol / l
Überprüfung der Laktatkonzentration bei initial erhöhten Werten

**Tabelle 4.** 6-Stunden-Bündel (nach <http://www.survivingsepsis.org/Bundles>) MAP: Mittlerer arterieller Druck

Neben dem Zeitfaktor spielt die Auswahl der richtigen kalkulierten Antibiotikatherapie eine entscheidende Rolle. Diese Entscheidung ist komplex und sollte lokale, sowie individuelle Faktoren berücksichtigen (184).

Die Leitlinien enthalten zudem Empfehlungen zur Optimierung der Intensivtherapie, z.B. in den Bereichen Beatmung, Ernährung und Transfusionstherapie. Eine Prognoseverbesserung durch medikamentöse Therapien über die antibiotische Therapie hinaus konnte bisher nicht belegt werden. Aktuell wird lediglich Hydrocortison in einer Dosis von 200mg / 24 Stunden, für Patienten, welche sich durch sonstige Maßnahmen nicht ausreichend hämodynamisch stabilisieren lassen, empfohlen (184). Zu Immunglobulinen ist die Datenlage (5), ebenso wie zu rekombinantem aktiviertem Protein C (APC) negativ und diese sollten nicht verabreicht werden (59).

Der Effekt der Implementierung der SSC Leitlinien wurde seit deren Einführung wiederholt untersucht. Das Fazit fiel überwiegend positiv aus, wobei eine Senkung von Morbidität und Mortalität festgestellt wurde (130, 161, 186). Auf welche der Maßnahmen dies im Einzelnen zurückzuführen ist konnte jedoch bisher nicht eruiert werden (95). In diesem Zusammenhang

muss darauf hingewiesen werden, dass die Überlegenheit der EGDT gegenüber weniger intensiven Strategien inzwischen aufgrund einiger großer Multicenterstudien in Zweifel gezogen wurde und aktuell Gegenstand kontroverser Diskussionen ist (12, 106, 175).

## **2.2. Oxidativer und nitrosativer Stress**

### **2.2.1. Reaktive Sauerstoffspezies**

Unter oxidativem Stress versteht man eine Verschiebung des Reduktions-Oxidationsgleichgewichts in Richtung der Oxidation (218). Eine Vielzahl an Prozessen im menschlichen Körper führen zu einer Produktion von oxidativen Substanzen. Einen der bedeutendsten darunter stellt die Übertragung einzelner Elektronen auf Sauerstoffmoleküle im Rahmen der Atmungskette dar. Der Prozess, in dessen Verlauf Sauerstoff ( $O_2$ ) durch schrittweise Übertragung von vier Elektronen zu Wasser ( $H_2O$ ) reduziert wird, ist einer der Hauptenergielieferanten unseres Körpers und beinhaltet die Entstehung von drei Hauptvertretern der sogenannten reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) (218). Primär wird durch univalente Reduktion das Superoxidradikal ( $O_2^{\cdot-}$ ), sekundär und tertiär durch die Übertragung weiterer Elektronen Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) und das Hydroxylradikal ( $OH^{\cdot}$ ) generiert (201). Die Freisetzung dieser Produkte geschieht physiologisch, etwa bei der Umsetzung von 2 % des in der Atmungskette verbrauchten  $O_2$  (66). Es gibt jedoch zahlreiche weitere Quellen von ROS. Andere enzymatische Quellen wie die NADPH-Oxidase, Xanthin-Oxidase und Cyclooxygenase liefern vor allem im Rahmen der Entzündungsreaktion erhöhte Mengen an ROS (224). ROS übernehmen physiologische Aufgaben im menschlichen Körper. So werden sie z.B. von neutrophilen Granulozyten im Rahmen des oxidativen Bursts direkt zur Abwehr von Erregern benutzt (219). Zusätzlich sind sie als Mediatoren an Regulationsprozessen beteiligt. Membranrezeptoren, Ionenkanäle und Transkriptionsfaktoren einschließlich des schon genannten NF- $\kappa$ B stellen nur einige der von ihnen beeinflussten Strukturen dar (86).

### **2.2.2. Reaktive Stickstoffspezies**

Eine weitere Gruppe unter den freien Radikalen stellen die reaktiven Stickstoffspezies (RNS) dar. Stickstoffmonoxid ist das Leitmolekül dieser Gruppe und wird von dem Enzym Stickstoffmonoxidsynthase (NOS) aus L-Arginin gebildet. Mit der neuronalen (nNOS, Typ I), induzierbaren (iNOS, Typ II) und endothelialen (eNOS, Typ III) existieren drei Isoformen der NOS. NO dient als Signalmolekül dessen bekanntester Effekt die Vasodilatation ist, darüber hinaus wirkt es durch Reaktion mit anderen Oxidantien zytoprotektiv (141). Im Rahmen der Inflammation kommt es, Zytokin-vermittelt, zu einer gesteigerten Expression der iNOS. NO

reagiert mit  $O_2^{\cdot-}$  zu dem verstärkt toxisch wirkenden Peroxynitrit. Die schädigenden Effekte werden Großteils durch die sekundär entstehenden Hydroxyl- ( $OH^{\cdot}$ ), Carbonat- ( $CO_3^{\cdot-}$ ) und Stickstoffdioxidradikale ( $NO_2^{\cdot}$ ) vermittelt. Der Zustand wird äquivalent zum oxidativen Stress als nitrosativer Stress bezeichnet. Da sowohl NO als auch  $O_2^{\cdot-}$  während entzündlichen Prozessen vermehrt vorliegen kommt dem Peroxynitrit in diesem Zusammenhang besondere Bedeutung zu (171).

### 2.2.3. Pathophysiologie

ROS und RNS verursachen Veränderungen an Zellbestandteilen. Oxidation von Thiolen, Carbonylierung, Nitrierung von Phenolen und S-Nitrosylierung beeinflussen Abbaugeschwindigkeit und Funktion von Proteinen (200). Oxidativer Stress führt zu Lipidperoxidation, welche die Membranpermeabilität beeinträchtigt und zytotoxische Substanzen wie Malondialdehyde hervorbringt (60). Die Modifikation von Proteinen und Lipiden hat Einfluss auf eine große Zahl von Signaltransduktionswegen. Wie die anderen Bestandteile wird auch die DNA der Zellen geschädigt. Folgen sind Veränderungen an den Basen sowie Strangbrüche die aufwendige Reparaturmechanismen nach sich ziehen und zum Zelluntergang führen können (14).

Im Rahmen der Sepsis führt eine Kombination dieser schädigenden Einflüsse zu vermehrtem Anfall oxidativer Substanzen in den Mitochondrien. Veränderte Membranpermeabilität (52) und die Inhibition von Komplexen der Atmungskette (51, 74) führen sowohl zu vermehrtem Anfall von ROS als auch zu einer verminderten Adenosintriphosphat (ATP) Produktion durch gestörte oxidative Phosphorylierung (51). Dieser Umstand stellt eine der möglichen Ursachen für den Zustand der zytopathischen Hypoxie dar. Hierbei wird angenommen, dass nicht nur eine mangelnde Versorgung des Gewebes mit  $O_2$  zur Entwicklung eines Multiorganversagens beiträgt, sondern vielmehr eine Unfähigkeit zur Verstoffwechselung des angebotenen Sauerstoffs pathogenetisch essentiell ist (74, 132).

Um sich vor übermäßigen Schäden durch oxidative Prozesse zu schützen benötigt ein Organismus antioxidativ wirksame Substanzen. Zu diesen wird nach einer geläufigen Definition nach Halliwell und Gutteridge jede Substanz gezählt, die „wenn sie in niedrigen Konzentrationen verglichen zum oxidierbaren Substrat vorkommt, die Oxidation dieses Substrats signifikant verzögert oder verhindert“ (98). Diese sehr breit gefasste Begriffserklärung schließt komplexe Enzymsysteme ebenso ein wie kleine, niedermolekulare Verbindungen.

Zu den bedeutendsten antioxidativen Enzymen der Zelle gehören die Superoxiddismutase (SOD) und die Katalase. Es existieren vier Typen der Superoxiddismutase. Diese Metalloenzyme unterscheiden sich neben ihrer Struktur vor allem durch das enthaltene Kation, Nickel (NiSOD), Eisen (FeSOD), Mangan (MnSOD) und Kupfer in Kombination mit Zink (CuZnSOD). Der menschliche Organismus verfügt über drei Isoenzyme. Die SOD-1, eine CuZnSOD, wurde in dieser Arbeit untersucht.

In zwei Halbreaktionen katalysiert dieses Enzym die Umwandlung von zwei Molekülen  $O_2^{\cdot-}$  und zwei Protonen in ein  $O_2$  und ein  $H_2O_2$  Molekül (201). Das  $H_2O_2$  wiederum wird von der Katalase zu  $H_2O$  und  $O_2$  abgebaut (92).

Weiteren Schutz bieten antioxidative Puffersubstanzen wie das Glutathion / Glutathiondisulfid-System, Thioredoxin, die schwefelhaltigen Aminosäuren Cystein und Methionin, sowie kleine Moleküle wie Ascorbinsäure (VitaminC), Retinol (VitaminA) und Tocopherol (VitaminE) (162). Diese Substanzen können ihren Effekt beispielsweise als direkte Radikalfänger, Metallchelatoren, Inhibitoren oxidativ wirksamer oder Cofaktoren antioxidativ wirksamer Enzyme entfalten (173). Oxidativer Stress konnte als pathogenetischer Faktor in der Entwicklung von kardiovaskulären (204), neurodegenerativen (56), pulmonalen (113) und hepatischen Erkrankungen (45) identifiziert werden. Der Wechselwirkung aus Inflammation, Leukozytenaktivierung, einem gestörten Redoxgleichgewicht und mitochondrialer Dysfunktion wird zudem eine gewichtige Rolle in der Entstehung der Multiorganfehlfunktion im Rahmen der Sepsis zugeschrieben. ROS sind in der Lage die Membranzusammensetzung von Mitochondrien zu verändern, ihre DNA zu schädigen und die Funktion sämtlicher an der Atmungskette beteiligter Komplexe negativ zu beeinflussen (84). Der resultierende Mangel des Energielieferanten ATP konnte mit der Fehlfunktion von Herz und anderen Organen in der Sepsis in Verbindung gebracht werden (132). Wiederholt wurde versucht diesen Effekt durch Verabreichung antioxidativ wirksamer Substanzen umzukehren, bisher ohne die Etablierung einer klinisch nutzbaren Behandlung der Sepsis (9, 55, 238).

### **2.3. Vaskuläres Zelladhäsionsmolekül-1 (VCAM-1) und intrazelluläres Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1)**

Das klassische Modell der Leukozytenrekrutierung aus dem Blutstrom durch das vaskuläre Endothel gliedert sich in drei Schritte. Zu Beginn rollen die Leukozyten entlang der luminalen Endotheloberfläche von Venolen. Vermittelt wird dies hauptsächlich durch niedrig-affine Rezeptormoleküle, insbesondere Selektine und Adressine (223). Alternativ ist auch eine Interaktion zwischen  $\alpha_4\beta_1$ -Integrin von Leukozyten und VCAM-1 möglich. Durch die initiale

Interaktion und Chemokinausschüttung kommt es zu einer Aktivierung mit anschließender Affinitätserhöhung verschiedener Rezeptoren der Integrin-Familie. Diese binden ICAM-1 und VCAM-1 und führen zu einer stabilen Bindung der Leukozyten an Endothelzellen wodurch im dritten Schritt deren Migration ermöglicht wird (48). Die wichtigsten Bindungspartner für ICAM-1 stellen Makrophagen-Adhäsion-Ligand-1 (MAC-1) und Leukozytenfunktion-assoziiertes-Antigen-1 (LFA-1) dar (128). ICAM-1 ist zwingend für die luminale Fortbewegung von Neutrophilen notwendig und ist ebenso wie VCAM-1 für die transendotheliale Migration als entscheidende Verbindungskomponente zum endothelialen Zytoskelett von großer Bedeutung (196).

Das Expressionsmuster der Adhäsionsmoleküle unterscheidet sich nach Organ und teils sogar innerhalb dieser. Einen besonderen Fall stellt die Leber aufgrund ihres komplexen Gefäßsystems dar. Unter normalen Bedingungen wird Vaskuläres-Adhäsionsprotein-1 (VAP-1) und ICAM-2 von Portalgefäßen exprimiert. Unter Inflammation treten P-Selectin, E-Selectin und VCAM-1 hinzu und es finden sich größere Mengen ICAM-1. Sinusoidale Endothelzellen bilden konstitutiv ICAM-1 und VAP-1. Entzündliche Prozesse induzieren VCAM-1 und erhöhen ICAM-1. Selektine kommen hier nur sehr eingeschränkt vor, wofür die niedrige Fließgeschwindigkeit im Bereich der Sinusoide als Erklärung herangezogen wurde (123). Neben Endothelzellen wird ICAM-1 zudem unter anderem von Hepatozyten, Fibroblasten, Lymphozyten, Monozyten, Eosinophilen und dendritischen Zellen gebildet (93).

Expressionssteigernde Mediatoren durch Inflammation sind unter anderem: Zytokine wie  $\text{TNF}\alpha$  und  $\text{IL-1}\beta$ , hohe Mengen an ROS, oxidiertes Low Density Lipoprotein (oxLDL), Plättchen-aktivierender Faktor (PAF), Leukotrien  $\text{B}_4$ , vermehrte Glukosekonzentration und Stimulation endothelialer TLRs, z.B. durch bakterielle Peptide (48, 93, 123). Auch die Expression der Integrine LFA-1 und MAC-1 als Bindungspartner auf der Leukozytenoberfläche wird durch proinflammatorische Zytokine erhöht (93).

Reaktiven Sauerstoffspezies kommt hierbei eine besondere Rolle zu. Zusätzlich zu ihrem generellen Auftreten im Rahmen der Inflammation scheint das Superoxidradikal direkt an der Signalübertragung der  $\text{TNF}\alpha$ -vermittelten Induktion von Adhäsionsmolekülen beteiligt zu sein (42).

## **2.4. Endoplasmatisches Retikulum Stress und Unfolded Protein Response**

### **2.4.1. Physiologie des endoplasmatischen Retikulums**

Das endoplasmatische Retikulum (ER) ist ein Zellorganell welches aus einem weitverzweigten tubulären Membrannetzwerk besteht und sich an die äußere Kernmembran anschließt. Man unterscheidet zwei verschiedene Formen des ER. Das raue ER, benannt nach der durch Ribosomen mikroskopisch rau wirkenden Oberfläche, stellt den Ort der Synthese und Modifikation von Membranproteinen, Lysosomenproteinen und exkretorischer Proteine dar. Das glatte ER dient der Lipid- und Steroidsynthese, dem Kohlehydratmetabolismus, der Lipiddoppelschichtsynthese, der Calciumhomöostase sowie dem Abbau lipophiler Substanzen (4).

Das ER-Qualitätskontrollsystem (ERQC) gewährleistet die posttranslationale Modifikation der am ER synthetisierten Proteine. Hieran sind Chaperone, Glukosidasen, Transferasen und Mitglieder der Proteindisulfid-Isomerasen-Familie beteiligt. Einer der beteiligten Chaperone, das glucose-regulated protein 78 (GRP78), sei hier zur Verdeutlichung der Vorgänge besonders hervorgehoben. GRP78 bindet an kurze hydrophobe Sequenzen nicht nativ gefalteter Proteine und wirkt so deren aggregationsfördernder Wirkung entgegen. Da die Bindung reversibel in Zyklen stattfindet wird den Proteinen wiederholt Gelegenheit gegeben die native Konfirmation einzunehmen (39). Die korrekt gefalteten Proteine werden anschließend in den Golgi-Apparat und von dort zu ihren weiteren Zielen transportiert. Fehlerhafte Proteine werden durch das ERQC und ER abbauverstärkende  $\alpha$ -Mannosidase-ähnliche-Proteine (ER degradation-enhancing  $\alpha$ -mannosidase-like protein, EDEM) erkannt und nach Translokation im Zytosol Ubiquitin-vermittelt in Proteasomen oder durch Autophagie abgebaut (41). Für den proteasomalen Abbau wurde der Begriff des ER-assoziierten Proteinabbaus (endoplasmic-reticulum-associated protein degradation, ERAD) geprägt (157).

### **2.4.2. Unfolded Protein Response**

Allgemein wird unter Stress das Abweichen eines Systems von seinem Normalzustand verstanden. In Bezug auf Stress des endoplasmatischen Retikulums wird dies meist vereinfachend auf den vermehrten Anfall fehlgefalteter Proteine reduziert. Die übrigen Funktionen des ER werden bisher häufig vernachlässigt, da über den Effekt von Störungen z.B. der Lipidsynthese auf dieses Organell ungleich weniger bekannt ist. ER-Stress tritt unter allen Zuständen auf, in denen das Aufkommen die Kapazität des ERQC übersteigt. Hierzu zählen

physiologische und pathophysiologische Prozesse wie die Plasmazelldifferenzierung und virale Infektionen (198).

Die komplexen Mechanismen, welche eingeleitet werden um ER-Stress entgegenzuwirken werden als Unfolded Protein Response (UPR) bezeichnet. Ihr werden drei Funktionen zugerechnet: Adaptierung, Alarmierung und Apoptose. Die Adaptierung beinhaltet die Induktion von Chaperonen, die generelle Verminderung der Translation und eine Verstärkung des Abbaus fehlerhafter Proteine (38). Ist dies nicht ausreichend stellt die Autophagie einen Weg dar, durch welchen auch Proteinaggregate entfernt werden können, die gegen proteasomalen Abbau resistent sind (163).

Entscheidend für die Vermittlung dieses Prozesses sind drei ER-transmembran Rezeptoren: Inositol-requiring-enzyme 1 (IRE1), double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) und aktivierender Transkriptionsfaktor 6 (ATF6). Der Chaperon GRP78 ist entscheidend an der Regulation dieser Membranrezeptoren beteiligt. GRP78 liegt normalerweise an deren ER-luminales Ende gebunden vor und verhindert so deren Oligomerisierung und damit Aktivierung. ER-Stress führt zu einer Dissoziation zwischen den Rezeptoren und GRP78, es kommt zur Ausbildung von Oligomeren und damit zur Initiation der einzelnen Signalwege (21). Im Folgenden werden die drei Hauptsignalwege kurz umrissen. Entscheidend für das Verständnis der UPR ist hierbei, dass es sich keinesfalls um strikt voneinander getrennte Abläufe handelt, sondern dass multiple Querverbindungen und Konvergenzpunkte bestehen.

### **2.4.3. PERK-Signalweg**

Die katalytische Einheit der protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) weist starke Ähnlichkeit zur Familie der eIF2 $\alpha$  (eukaryotic translation initiation factor 2 $\alpha$ ) Kinasen auf und ist so nach Autophosphorylierung in der Lage, die Translation von mRNA durch eIF2 $\alpha$ -Phosphorylierung zu unterdrücken. Dies führt zu einer verminderten Proteinbelastung des ER. Einige mRNAs, welche internal ribosome entry site (IRES) Sequenzen in ihren 5'-nicht-translatierten Bereichen enthalten, erlangen hierdurch einen Vorteil (38).

Aktivierender Transkriptionsfaktor 4 (ATF4) gehört zu den am besten untersuchten Mitgliedern dieser Gruppe. Dieser Transkriptionsfaktor aus der Gruppe der CREB beeinflusst die Expression der Chaperone GRP78 und GRP94, des an der antioxidativen Antwort beteiligten nuclear factor-E2-related factor (NRF2), sowie den Aminosäuremetabolismus und die Apoptose (112, 147, 206).

Die Aktivierung von PERK unterliegt Feedbackmechanismen. Die Aktivierung von growth-arrest und DNA damage-inducible protein (GADD34) über CCAAT / enhancer-binding-protein (C/EBP) homologous protein (CHOP) führt zu einer Protein Phosphatase I (PPI)-vermittelten Dephosphorylierung von eIF2 $\alpha$ . Einen ähnlichen Effekt übt p58IPK aus. Durch die Inhibierung von PERK kommt es zu einer verminderten Phosphorylierung von eIF2 $\alpha$ . Auf diese Weise kann der Translationsstop zur Wiederherstellung einer regelrechten Zellfunktion aufgehoben, oder der Übertritt in die Apoptose begünstigt werden (206, 220).

#### 2.4.4. CHOP

CCAAT / enhancer-binding-protein (C/EBP) homologous protein (CHOP) stellt einen zentralen proapoptotischen Regulator der UPR dar. Strukturell besteht CHOP aus einer N-terminalen Transkriptionsaktivierungsdomäne und einer C-terminalen basischem Leucizipper-Domäne (bZIP) (135). Es ist in der Lage durch Bildung von Heterodimeren mit anderen C/EBP Transkriptionsfaktoren die Expression von Zielgenen positiv oder negativ zu beeinflussen (112).

CHOP ist Bestandteil aller drei Hauptsignalwege der UPR. Innerhalb des humanen CHOP Promotors finden sich zwei ER-stress response elements (ERSE) deren Sequenzen einen hohen Grad an Übereinstimmung mit den entsprechenden Abschnitten in den Genen von GRP78, GRP94 und anderen zentralen Molekülen der UPR aufweisen (168). Zudem besteht für ein im Promotor enthaltenes Aminosäure-regulatorisches Element (AARE) geringere Homologie zu C/EBP- und ATF-Bindungsstellen. Interaktionen mit ATF2, ATF3, ATF4 und ATF6 wurden gezeigt, wobei Untersuchungen an PERK Doppel knock-out (-/-) Zellen nahelegen, dass die PERK/ATF4-Achse eine führende Rolle einnimmt (135, 144).

Die Apoptose-fördernde Wirkung von CHOP wird unter anderem durch GADD34, endoplasmatisches Retikulum Oxidoreduktase-1 $\alpha$  (Ero1 $\alpha$ ) und eine Inhibition des anti-apoptotischen BCL-2 vermittelt (135). Durch die GADD34 induzierte Dephosphorylierung von eIF2 $\alpha$  wird im Falle prolongierten Stresses die Belastung des ERs mit ungefalteten Proteinen verstärkt und die Bildung proapoptotischer Proteine ermöglicht (192).

#### 2.4.5. IRE1

Das inositol-requiring-enzyme 1 ist ein Transmembranprotein, welches eine Endoribonuklease- sowie eine Serin-Threonin-Kinase-Domäne aufweist. Es existiert in zwei Isoformen, von denen IRE1 $\alpha$  in einer Vielzahl von Geweben nachgewiesen werden konnte, wohingegen IRE1 $\beta$  nur in intestinalen Epithelzellen vorkommt (38). Die Dissoziation von GRP78 erlaubt eine Homodimerisierung der IRE1 gefolgt von einer Autophosphorylierung, welche wiederum

deren Kinase- und Endonukleasefähigkeit aktiviert (38). Durch die Endonuklease wird die mRNA des X-box-binding-protein 1 (XBP1) so prozessiert, dass der Transkriptionsfaktor spliced XBP1 (sXBP1) entsteht. Dieser wandert in den Zellkern und ist dort in der Lage mit sich selbst oder anderen Ko-Regulatoren zu dimerisieren und an einen Promoter von ERSE zu binden. Eine große Zahl von ER-Chaperonen und Komponenten des ERAD werden so reguliert (41). Die p58 Inositolphosphat Kinase (p58IPK) weist ebenfalls ein ERSE in ihrer Promotorregion auf, wodurch sich eine Querverbindung zu den PERK- und ATF6-Signalwegen ergibt (235). Der IRE1 vermittelte Abbau von mRNA, als regulated-IRE1-dependent-decay (RIDD) bezeichnet, führt zudem zu einer Reduktion der Proteinbelastung (43). Durch Interaktion der Kinasedomäne mit tumor-necrosis-factor-receptor-associated factor 2 (TRAF2) wird apoptosis signal-regulating kinase1 (ASK1) und damit c-Jun N-terminal kinase (JNK) sowie P38 mitogen-activated protein kinase (p38MAPK) aktiviert (192). JNK verursacht die Freisetzung von Cytochrom c, die Aktivierung von Caspasen und proapoptotische Effekte durch mehrere Mitglieder der Bcl-2-Familie (206). Die Phosphorylierung durch p38MAPK aktiviert CHOP und stellt so einen weiteren Konvergenzpunkt der Signalwege dar (229).

#### **2.4.6. ATF6**

ATF6 ist ebenso wie die zuvor genannten Stresssensoren ein membranlokalisiertes Protein. In Säugetierzellen tritt es in einer  $\alpha$ - und  $\beta$ -Isoform auf, welche beide ubiquitär exprimiert werden (234).

Zwei Hauptmechanismen der Stresserkennung werden angeführt. Einerseits wird durch Dissoziation von GRP78 ein verdecktes Golgi-Lokalisationssignal offengelegt. Andererseits wurde postuliert, dass die luminalen Domänen von ATF6 unter normalen Bedingungen Di- oder Oligomere formen. Diese werden durch Disulfidbrücken verbunden, welche im Falle von ER-Stress gelöst werden. So können Monomere freigesetzt werden (13). Bei vermehrtem Auftreten von ungefalteten Proteinen wird ATF6 durch coat protein complex II (COPII) Vesikel in den Golgi-Apparat transportiert, wo es einer regulierten Intramembranproteolyse (RIP) durch die dort lokalisierten Site-1- und Site-2-Proteasen ausgesetzt ist (13). Das hierdurch freigesetzte N-terminale Fragment mit einer bzip-Domäne wandert in den Zellkern und beeinflusst die Transkription von ATF/cAMP response elements sowie ERSE (206).

ATF6 kommt eine Schlüsselrolle in der Regulation von ERQC und ERAD zu. So werden Chaperone wie GRP78 und GRP94, Co-Chaperone (z.B. p58IPK), Proteindisulfidisomerase-ähnliche Enzyme wie ERp72, P5 und GRP58 und ERAD-Komponenten wie 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme-A reductase degradation protein 1 (HRD1) und EDEM1 hauptsächlich auf diese Weise reguliert (2). Erneut existieren Querverbindungen der einzelnen

Signalwege. ATF6 ist in der Lage ein Heterodimer mit XBP1 zu bilden. Diese weisen eine bis zu achtfach höhere Bindungsaffinität zu Zielgenen im Vergleich zu XBP1-Homodimeren auf, deren Wirkungsbereich insbesondere den Proteinabbau betrifft (234).

### **2.5. cAMP-responsive-element-binding-protein H (CREBH)**

Bei der Gruppe der cAMP-responsive-element-binding-proteins (CREB) handelt es sich um Transkriptionsfaktoren die durch Phosphorylierung reguliert werden. Eine Anzahl von Guanosintriphosphat (GTP)-gekoppelten Rezeptoren vermittelt ihre Wirkung durch eine Beeinflussung des zyklischen-Adenosinmonophosphat(cAMP)-Spiegels. Eine Erhöhung führt zu einer Aktivierung der Proteinkinase A (PKA). Diese Kinase liegt in ihrem inaktiven Zustand als ein Heterotetramer aus regulatorischer (R) und katalytischer (C) Einheit vor. Wird vermehrt cAMP gebildet kommt es zu einer Dissoziation und die C-Untereinheit gelangt in den Zellkern wo sie CREB durch Phosphorylierung aktiviert. Neben PKA sind hierzu auch verschiedene andere Kinasen wie z.B. Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-abhängige Proteinkinasen in der Lage. CREB bildet Dimere, welche in Verbindung mit den Koaktivatoren CREB-Binding Protein (CBP) und p300 die Genexpression an cAMP-responsive-elements (CRE) modifizieren (156). Das CRE beinhaltet die Basenabfolge TGACGTCA und interagiert mit der carboxyterminalen basischen Leucin-Zipper-Domäne, welche ein Bestandteil aller CREB-Familienmitglieder ist. Die Transkription erreicht ihr Maximum innerhalb vom ca. 30 min und ebbt nach 2 - 4 Stunden unter kontinuierlicher Stimulation mit cAMP durch Dephosphorylierung ab (156).

Bei dem vor allem in der Leber, aber auch im Dünndarm, vorkommenden Mitglied der CREB-Familie CREBH handelt es sich um ein im ER lokalisiertes, strukturell mit ATF6 verwandtes, Transmembranprotein. Durch Golgi-lokalisierte proteolytische Spaltung kann ein zytosolischer Anteil dieses Moleküls in den Zellkern gelangen, wo es durch Aktivierung der Transkription bedeutende physiologische Prozesse beeinflusst (15, 165). So konnte gezeigt werden, dass CREBH entscheidenden Einfluss auf den hepatischen Fettstoffwechsel (240), die dortige Gluconeogenese (126) und über eine verstärkte Expression von Hecpidin auf den Eisenstoffwechsels nimmt (221). Von besonderem Interesse ist auch die Verbindung von CREBH zu Genen der Akuten Phase Reaktion (APR). Zhang und Kollegen konnten zeigen, dass proinflammatorische Zytokine in der Lage sind die Spaltung von CREBH zu induzieren. Des Weiteren scheint es die Transkription wichtiger Akute Phase Proteine maßgeblich zu regulieren. So war es möglich durch CREBH knock-down eine signifikante Reduktion der Basalspiegel an C-Reaktives Protein (CRP) und Serum Amyloid-P Komponente (SAP) zu

erreichen (241). Unterstützt werden diese Erkenntnisse durch Beobachtungen welche die Existenz einer Signalkaskade aus ER-Stress, estrogen-related receptor- $\gamma$  (ERR $\gamma$ ), CREBH und CRP nahelegen. Die Überexpression bzw. Inhibition von ERR $\gamma$  übt einen gleichgerichteten Effekt auf CREBH und CRP unter ER-Stressbedingungen aus und führt zu einer vermehrten Expression bzw. abgeschwächten Induktion beider Proteine (158). Auf Basis dieser Beobachtungen wird durch CREBH eine Verbindung zwischen ER-Stress und der Akute Phase Reaktion hergestellt. Die Bedeutung der APR im Rahmen der Sepsis ist seit langem etabliert (164) und rechtfertigt eine weitere Eruiierung der Zusammenhänge.

## 2.6. Melatonin

### 2.6.1. Physiologie

Das Indolamin Melatonin ist vor allem für seine Funktion als neuroendokrines Hormon und Hauptprodukt der Zirbeldrüse (Glandula pinealis, Epiphyse) bekannt. Melatonin, dessen chemische Bezeichnung N-acetyl-5-methoxytryptamin lautet, wird über mehrere Zwischenschritte aus Tryptophan synthetisiert. Die Pinealozyten nehmen die essentielle Aminosäure aus dem Blut auf und wandeln sie durch Hydroxylierung und Decarboxylierung in Serotonin um. Im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Reaktion wird hieraus vom Enzym Arylalkylamin-N-Acetyltransferase(AA-NAT) N-Acetyl-Serotonin synthetisiert, welches schließlich von der Hydroxyindol-O-Methyl-Transferase (HIOMT) zu Melatonin verstoffwechselt wird (179). Nach seiner Fertigstellung wird das Hormon nicht gespeichert sondern direkt in das Kapillarbett sezerniert, wo es zu 70 % an Albumin gebunden transportiert wird (34). Aufgrund seiner Amphiphilie ist es in der Lage Membranen zu überwinden. Der Abbau erfolgt zu 90 % in der Leber wo das Molekül zunächst hydroxyliert und anschließend sulfatiert bzw. glucuronidiert wird. Anschließend wird der Hauptmetabolit 6-Hydroxy-Melatonin-Sulfat (6-OHMS) über die Niere ausgeschieden (80).

Der wohl eindrucklichste Regulationsmechanismus der Melatoninsynthese beruht auf dem Wechsel zwischen Phasen von Licht und Dunkelheit. Die photischen Informationen werden von einer Untergruppe der retinalen Ganglienzellen über den retinohypothalamischen Trakt in den Nucleus suprachiasmaticus (SCN) weitergeleitet, wo sie den endogenen circadianen Schrittmacher beeinflussen (20). Dieser moduliert sympathische Efferenzen, deren Neurotransmitter Noradrenalin zu einer verstärkten Expression der AA-NAT und damit einer erhöhten Produktion von Melatonin in der Epiphyse führt (115). Tageslicht hyperpolarisiert die retinalen Photorezeptoren und inhibiert so Noradrenalinfreisetzung und Melatoninsynthese (30).

Melatonin vermittelt systemisch Informationen über die Lichtexposition und somit über die Tageszeit (226). Einige Prozesse in die so möglicherweise eingegriffen wird sind der Schlaf-Wach-Rhythmus (30), die Temperaturregulation (207) und die Cortisolsynthese (213). Zudem wurden Zusammenhänge mit der Immunomodulation (88) und der Cancerogenese (54) festgestellt.

Neben der Epiphyse existieren noch weitere, extrapineale Produktionsorte von Melatonin. Zu diesen zählen Retina, Haut, Gastrointestinaltrakt, Reproduktionstrakt, Leber und Immunzellen (1, 121, 205). Diese peripheren Vorkommen scheinen jedoch eher auto- und parakrine Funktionen zu erfüllen (36).

### **2.6.2. Melatonin-Signaltransduktion**

Bisher sind bei Säugetieren zwei Subtypen membrangebundener Melatoninrezeptoren bekannt. Hierbei handelt es sich um G-Protein-gekoppelte, sieben Transmembrandomänen umfassende Rezeptoren namens MT1 und MT2. Diese Rezeptoren entfalten ihre Wirkung unter anderem über eine Inhibition der cAMP-Bildung, Proteinkinase-A-Aktivität, Beeinflussung der Phospholipasen A2 und C und eine Phosphorylierung des cAMP-responsive-element-binding-protein (CREB). Darüber hinaus existiert ein dritter als MT3 bezeichnete Rezeptor, welcher identisch mit der intrazellulären Quinon-2-Reduktase ist (153).

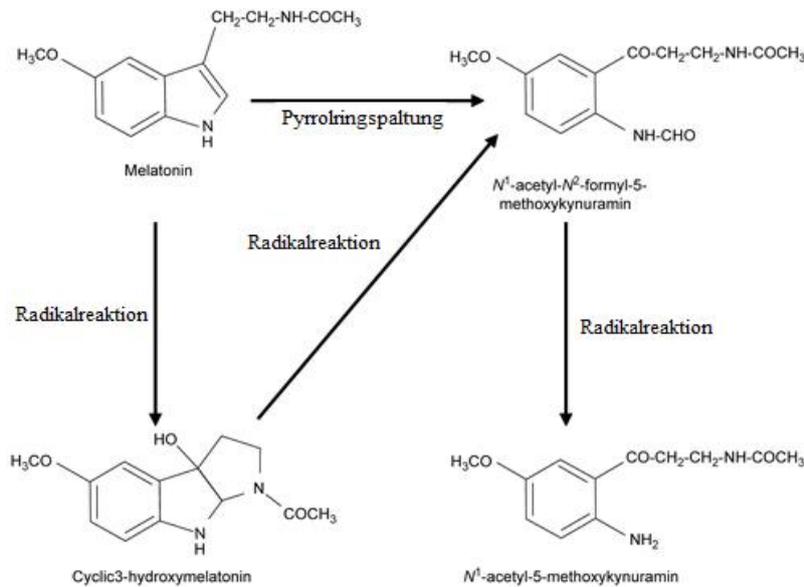
Melatoninrezeptoren werden in vielen Organen exprimiert. Im Kontext dieser Studie erscheint insbesondere das Vorkommen von MT1 und MT2 in Leber, Milz, Gastrointestinaltrakt, kardiovaskulärem System, inklusive Aorta und verschiedenen Immunzellen von Relevanz. Zudem konnten sie beispielsweise in Gehirn, Pankreas, Nieren und den Reproduktionsorganen nachgewiesen werden (172).

### **2.6.3. Melatonin und oxidativer Stress**

1993 konnten Tan et al. durch Nutzung der Elektronenspinresonanz-Spektroskopie (ESR) nachweisen, dass es sich bei Melatonin um einen Elektronendonator und somit Radikalfänger handelt. Dies geschah zunächst in vitro durch Reduktion der Hydroxylierung von 5,5-dimethylpyrrolin-N-oxid (DMPO) (174). In den folgenden Jahren konnte die hierdurch gewonnene Erkenntnis einer Unschädlichmachung von Hydroxylradikalen auf den in vivo Bereich und Stickstoffmonoxid, das Peroxynitritanion, Singulett-Sauerstoff ( $^1\text{O}_2$ ), das Superoxidradikal und Wasserstoffperoxid ausgeweitet werden (180).

Die Radikalbindungskapazität wird durch die Tatsache, dass es sich bei seinen Stoffwechselprodukten ebenfalls um reduktiv wirksame Substanzen handelt enorm gesteigert. Die bisher identifizierten Reaktionsprodukte, zu denen u.a. 3-Hydroxymelatonin, N-Acetyl-N-

formyl-5-methoxykynuramin (AFMK) und N-Acetyl-5-methoxykynuramin (AMK) zählen, bilden eine antioxidative Kaskade. So wird errechnet, dass ein Melatoninmolekül auf diese Weise in der Lage ist 10 Reduktionsäquivalente zu liefern und eine entsprechende Anzahl an ROS/RNS zu neutralisieren (211).



**Abbildung 1.** Antioxidative Kaskade der Melatoninmetabolite, nach Reiter et al. (180)

Neben der direkten Funktion als Radikalfänger wurden für Melatonin und seine Metabolite antioxidative Effekte durch die Beeinflussung von Enzymaktivität und -expression beschrieben. Melatonin und AMK sind in der Lage die Expression der neuronalen (nNOS) und induzierbaren (iNOS) Form der Stickstoffmonoxidsynthase zu unterdrücken. Durch die resultierende Reduktion an NO wird auch das Auftreten von Peroxynitrit vermindert (129, 166). Melatoninapplikation führte experimentell zu einer Steigerung des Abbaus von ROS durch die SOD und erhöhte die Glutathionkonzentration u.a. durch Induktion der  $\gamma$ -Glutamylcystein-Synthetase und Glutathion-Reduktase (187, 217). Die am Abbau von  $H_2O_2$  beteiligte Glutathion-Peroxidase wird ebenfalls durch Melatonin induziert (170). Die Fähigkeit von Melatonin und seiner Reaktionsprodukte als Chelatbildner zu fungieren ist ein weniger bekannter Mechanismus zur Vermeidung von oxidativem Stress. Durch Komplexbildung und Reduktion von Übergangsmetallen wie Eisen und Kupfer ist es in der Lage die Funktion von Proteinen wie Hämoglobin zu erhalten und wiederherzustellen. Diese Proteinkomplexe enthalten ein Metallion im aktiven Zentrum, welches durch Oxidation in seiner physiologischen Funktion gestört werden kann (181).

Eine Eigenschaft des Melatonins, die es von anderen antioxidativ-wirksamen Molekülen abhebt, ist seine Fähigkeit hohe Konzentrationen im Bereich der Mitochondrien zu bilden.

Dieser Sachverhalt konnte auch für die Leber belegt werden (222). Lowes et al. konnten einen positiven Effekt von Melatonin auf typische Marker der mitochondrialen Funktion, des oxidativen Stresses und der hepatischen Organschädigung belegen. Dieser war im Vergleich mit den synthetischen Molekülen MitoQ und MitoE, welche sich ebenfalls in den Mitochondrien konzentrieren, ähnlichen und in Bezug auf Carbonylproteine und Lipidperoxidation deutlicher ausgeprägt. Diese Beobachtungen wurden anhand eines Sepsismodells mit Verabreichung von LPS und Peptidoglykan gemacht (139). Oxidativer Stress und mitochondriale Dysfunktion spielen in der Pathophysiologie der Sepsis eine entscheidende Rolle (siehe oben).

#### **2.6.4. Melatonin in der Sepsis**

Ein positiver Effekt von Melatonin unter Zuständen erhöhten zellulären Stresses konnte wiederholt in der Sepsis gezeigt werden. So konnte anhand verschiedener Sepsismodelle eine verbesserte Hämodynamik, eine Organprotektion u.a. von Leber und Nieren, sowie ein verlängertes Gesamtüberleben gezeigt werden (182, 232, 233). Diese Ergebnisse werden neben der Protektion vor oxidativem und nitrosativem Stress, der Erhaltung der mitochondrialen Funktion und einem antiinflammatorischem Effekt zugeschrieben (104). Sepsis führt zu einer mitochondrialen Dysfunktion mit gestörter oxidativer Phosphorylierung und verminderter ATP-Produktion. Dieser Zustand scheint durch die Gabe von Melatonin reversibel zu sein (104). Wie oben ausgeführt kommt einer überschießenden Inflammation eine zentrale Rolle in der Pathophysiologie der Sepsis zu. Die Daten zur Beeinflussung von Zytokinpiegeln durch Melatonin sind heterogen. In einigen Studien an septischen Ratten gelang es den Anstieg der Plasmaspiegel von Zytokinen, darunter IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF $\alpha$ , durch die Gabe von Melatonin zu reduzieren und den von IL-10 zu erhöhen (37, 71, 139, 232, 233). Es liegen jedoch auch entgegengesetzte Ergebnisse vor. So konnte von Carrillo-Vico und Kollegen neben der positiven Beeinflussung von IL-10 in derselben Arbeit keinerlei Effekt auf die systemischen Spiegel von TNF $\alpha$ , INF- $\gamma$  und IL-12 festgestellt werden (37). Eine Arbeit, in der gesunde männliche Probanden nach intravenöser (i.v.) Melatoninapplikation ebenfalls i.v. verabreichtem Endotoxin ausgesetzt wurden, erbrachte ähnliche Ergebnisse. Einer Reduktion von IL-1 $\beta$  standen unveränderte Konzentrationen an TNF $\alpha$ , IL-10, IL-6 und weiteren Markern gegenüber (3). In einer vorangegangenen Studie gelang unserer Arbeitsgruppe der Nachweis einer verbesserten Überlebenszeit durch eine Melatoninapplikation während einer polymikrobiellen Sepsis bei Ratten. Die Ergebnisse lieferten zudem deutliche Hinweise auf eine rezeptorvermittelte Genese dieser Beobachtung (77). Die untersuchten Marker der Inflammation IL-6, TNF $\alpha$  und IL-10 blieben jedoch auch hier unbeeinflusst. Einen bisher wenig

beachteten Bereich zur Vermittlung eines protektiven Effekts von Melatonin stellen ER-Stress und UPR dar. Eine Studie, welche sich mit durch LPS verursachtem zellulärem Stress in der Placenta von Mäusen befasst, war in der Lage, positive Auswirkungen von Melatonin auf ER-Stress und oxidativen Stress zu belegen. Dem Effekt der LPS-Applikation auf typische Marker beider Bereiche, wie Glutathionkonzentration, GRP78 und CHOP, konnte durch intraperitoneale Injektion von Melatonin entgegengewirkt werden (227).

Der Notwendigkeit die Mechanismen hinter der protektiven Wirkung von Melatonin zu klären, wird weiterer Nachdruck verliehen, da sich diese inzwischen auch in vereinzelt klinischen Studien zeigte. Die Aussagekraft der bisher vorliegenden Studien wird durch ein Studiendesign ohne Randomisierung und eine niedrige Probandenzahl im zweistelligen Bereich limitiert. Erstmals gelang es Gitto et al. 2001 durch orale Melatoninsubstitution eine verminderte Sterblichkeit und reduzierten oxidativen Stress gemessen an Lipidperoxidation in septischen Neugeborenen zu zeigen (91). In einer weiteren Arbeit an septischen Neugeborenen konnte ebenso ein positiver Effekt nachgewiesen werden. Nach oraler Applikation bei 25 Patienten zeigte sich, im Vergleich zu einer gleich großen Kontrollgruppe, ein positiver Krankheitsverlauf gemessen an einer signifikanten Verbesserung eines Sepsis-Scores. Dieser beinhaltete klinische und laborchemische Parameter wie hochsensitives CRP und Vitalzeichen (68). Hierbei weist Melatonin eine ausgesprochen gute Verträglichkeit auf. Bisher sind keine relevanten Nebenwirkungen bekannt. Die in Europa als Neurohormon klassifizierte Substanz, ist in Amerika als Nahrungsergänzungsmittel verfügbar und wird in Dosen bis 5 mg zur Behandlung von Schlafstörungen eingesetzt. Eine Phase I Studie mit Dosissteigerungen oral applizierter Einzeldosen bis 100mg konnte bei gesunden, erwachsenen, männlichen Probanden kein Auslösen subjektiver Beschwerden oder relevanter Abweichung von Vitalparameter oder Laborparametern wie Elektrolyten oder Blutbild feststellen (85).

In Zusammenschau der beschriebenen Sachverhalte handelt es sich bei Melatonin um eine vielversprechende potentielle Zusatztherapie der Sepsis mit guter Verträglichkeit und leichter Verfügbarkeit. Die mechanistische Vermittlung positiver Effekte sowie deren Übertragbarkeit auf menschliche Patienten bedürfen jedoch weiterer Eruierung.

## 2.7. Ziel der Arbeit

Sepsis ist ein Krankheitsbild mit hoher Bedeutung und komplexer Pathophysiologie. Bisher war es nicht möglich spezifische supportive Therapien erfolgreich zu etablieren. Melatonin stellt aufgrund der vorhandenen experimentellen und klinischen Daten einen vielversprechenden Kandidaten für ein derartiges Medikament dar.

Die positiven Effekte einer Melatoninapplikation und die zugrundeliegenden Mechanismen sind zum jetzigen Zeitpunkt nur unzureichend verstanden. Aufgrund der Eigenschaften des Indolamins und der bisher erhobenen Studiendaten, wurde oxidativer Stress als wichtiger Ansatzpunkt einer Melatonin-induzierten Protektion identifiziert. ER-Stress und die darauf ausgerichtete Unfolded Protein Response stellen einen weiteren wichtigen zellulären Prozess mit möglicher Relevanz in der Sepsis dar. Erste Erkenntnisse lassen eine Verknüpfung beider pathophysiologischer Prozesse mit Melatonin möglich erscheinen.

Daher sollen in der vorliegenden Arbeit folgende Fragestellungen beantwortet werden:

- Welche Auswirkungen hat die Applikation von Melatonin auf das Redoxgleichgewicht verschiedener Organe in der murinen Sepsis?
- Lassen sich etwaige Veränderungen der zellulären Stressantwort auf Ebene der für Inflammation und Antioxidation bedeutsamen Adhäsionsmoleküle und SOD-1 nachvollziehen?
- Wie werden Marker der Unfolded Protein Response in der Leber durch Sepsis allein und in Kombination mit der Verabreichung von Melatonin beeinflusst?
- Ist eine Korrelation der Beeinflussung von oxidativem Stress und ER-Stress möglich und können mögliche Schnittpunkte identifiziert werden?

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Material

##### 3.1.1. Geräte

<b>Gerätebezeichnung</b>	<b>Hersteller / Vertrieb</b>
<i>Analysenwaage ABS 120-4</i>	<i>Kern &amp; Sohn GmbH, Albstadt</i>
<i>CFX 96 Real-Time PCR Detection Systems</i>	<i>Bio-Rad Laboratories, Kalifornien, USA</i>
<i>Druckabnehmer BD DTXPlusTM</i>	<i>BD Diagnostics, Heidelberg</i>
<i>Easia Shaker</i>	<i>Medgenix Diagnostic, Biosource GmbH, Ratingen</i>
<i>Elektrophorese Stromquelle E452 / E865</i>	<i>Consort nv, Turnhout, Belgien</i>
<i>Elektrophoresekammern</i>	<i>Novex Elektrophoresis GmbH, Frankfurt</i>
<i>Elektronische Kälteplatte</i>	<i>Noxygen Science Transfer &amp; Diagnostics GmbH, Elzach</i>
<i>E-Scan System</i>	<i>Bruker Corporation, Billerica, Massachusetts, USA</i>
<i>Geldokumentationssystem Felix 2020</i>	<i>biostep GmbH, Jahnsdorf</i>
<i>GeneAmp PCR System 2400</i>	<i>Perkin Elmer Corporate Headquarters, Massachusetts, USA</i>
<i>Heizmatte Terra-Exotica Comfort</i>	<i>Terra-Exotica, Alfeld</i>
<i>Homogenisator Ultra-Turrax T25</i>	<i>IKA Labortechnik, Staufen</i>
<i>Kaltlichtquelle KL 1500 LCD 150 Watt</i>	<i>Schott AG, Mainz</i>
<i>Kühlzentrifuge Z 233 MK-2</i>	<i>HERMLE Labortechnik GmbH, Wehingen</i>
<i>Magnetrührer Ikamag RET-GS</i>	<i>IKA Labortechnik, Staufen</i>
<i>MicroChemi Chemiluminescence Imaging System 4.2</i>	<i>DNR Bio-Imaging Systems, Jerusalem, Israel</i>
<i>Mikrowellenherd</i>	<i>Panasonic, Hamburg</i>
<i>Monitor Hewlett Packard M1166A, Model 66S</i>	<i>Hewlett-Packard Company, Kalifornien, USA</i>
<i>Nanophotometer P330</i>	<i>Implen GmbH, München</i>
<i>PerfectBlue Tank-Elektroblotter</i>	<i>Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen</i>
<i>PerfectBlue Vertikale Doppelgelsysteme</i>	<i>Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen</i>
<i>Perfusor Secura FT</i>	<i>B.Braun Melsungen AG, Melsungen</i>
<i>pH-Meter, pH 523</i>	<i>WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim</i>
<i>Photometer Ultrospec 2000</i>	<i>Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden</i>
<i>Pipetten</i>	<i>Eppendorf AG, Hamburg</i>
<i>Pipettierhelfer accu-jet</i>	<i>Brand GmbH, Wertheim</i>
<i>Quarzküvette</i>	<i>Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden</i>
<i>Sterile Werkbank, Labcaire Model 3650</i>	<i>PuriCore's Labcaire Laboratory Business, Levedon, England</i>
<i>Stromquelle Power Supplies EV200 Serie</i>	<i>Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen</i>
<i>Tischzentrifuge ProFuge 10K</i>	<i>Stratagene, Kalifornien, USA</i>
<i>TissueLyser LT</i>	<i>QIAGEN GmbH, Hilden</i>
<i>Universal Thermostat</i>	<i>Conrad Electronic SE, Hirschau</i>
<i>UV-Transilluminator</i>	<i>biostep GmbH, Jahnsdorf</i>

Vortexer L46	GLW mbH, Würzburg
Vortexer Labnet VX100	MO BIO Laboratories, Kalifornien, USA
Vortexer Vortex-Genie 2	Scientific Industries Inc., New York, USA
Waage Kern 470	Kern & Sohn GmbH, Albstadt
Wasserbad Typ 1002	GFL mbH, Hannover
Zentrifuge Megafuge 1.0 R	Heraeus, Berlin

### 3.1.2. Verbrauchsmaterialien

Nicht gesondert aufgeführte Verbrauchsartikel aus Kunststoff wurden von der Firma Sarstedt, Nümbrecht, bezogen.

Artikel	Hersteller/Vertrieb
6-Well-Platten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
96-Well-PCR-Platte, 0,2 ml	Axon Labortechnik, Kaiserslautern
Combi-Stopper	B.Braun Melsungen AG, Melsungen
Einmalspritze, 1 ml, Plastipak TM	BD Diagnostics, Heidelberg
Faltenfilter	Macherey-Nagel GmbH, Düren
Filterpapier	Schleicher & Schuell GmbH, Dassel
Gefäßkatheter: Fine-Bore Polythene Tubing, ID 0,28 mm, OD 0,61 mm	Smiths Medical, New Hampshire, USA
Kanüle BD MicrolanceTM 3	BD Diagnostics, Heidelberg
Nahtmaterial PremiCron	B.Braun Melsungen AG, Melsungen
Obergarn NE 50/3 100 % Baumwolle	Fa. Globus, St. Wendel
PCR-Abdeckfolie	Axon Labortechnik, Kaiserslautern
PVDF Western Blotting Membranes	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim
Rollenpflaster Leukoplast	BSN medical, Hamburg
Saran Verpackungsfolie	Dow Chemical Company, Schwalbach am Taunus
Trachealkanüle: Venenverweilkatheter, Venflon TM Pro Safety 20 G	BD Diagnostics, Heidelberg

### 3.1.3. Reagenzien und Chemikalien

Nicht gesondert aufgeführte Chemikalien wurden von der Firma Carl Roth GmbH, Karlsruhe, bezogen.

Chemikalie / Reagenz	Hersteller / Vertrieb
10x Reaktionspuffer mit MgCl <sub>2</sub> für DNase	Fermentas GmbH, St.Leon-Rot
5x Hot Start Taq EvaGreen qPCR Mix	Axon Labortechnik, Kaiserslautern
5x Reaktionspuffer für RT	Fermentas GmbH, St.Leon-Rot
Anti-rabbit IgG Sekundär-AK #7074	Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA
Bovines Serum Albumin (BSA)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich

Bupicacain (Bupivan) 5 mg/ml	PUREN Pharma GmbH & Co. KG, München
Carbostesin 0,5 % Injektionslösung	AstraZeneca, Wedel
Caspase-3 Antibody, Rabitt, #9662	Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA
Caspase-12 Antibody, Rabitt, #2202	Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA
Cleaved Caspase-3 (Asp 162) Antibody, Rabbit mAb, #9664	Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA
Cell Lysis Buffer (10x)	Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA
CMH (1-Hydroxy-3-methoxycarbonyl - 2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine)	Noxygen Science Transfer & Diagnostics GmbH, Elzach
Deferoxaminmethansulfonat	Noxygen Science Transfer & Diagnostics GmbH, Elzach
DEPC (Diethyldicarbonat)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
DETC (Diethyldithiocarbamat)	Noxygen Science Transfer & Diagnostics GmbH, Elzach
DNase I, RNase-frei, 1U/ul	Fermentas GmbH, St.Leon-Rot
dNTP Mix, je 10mM	Axon Labortechnik, Kaiserslautern
ECLTM Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
EDTA 50mM	Fermentas GmbH, St.Leon-Rot
ESR-Krebs HEPES Buffer	Noxygen Science Transfer & Diagnostics GmbH, Elzach
Ethidiumbromid	Axon Labortechnik, Kaiserslautern
FastTri RNA Extraction Reagent	Axon Labortechnik, Kaiserslautern
Fetales Kälberserum Standard	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Formamide Redestilled UltraPure	GiscoBRL Life Tech., Paisley, UK
GeneRuler™ 100bp DNA Ladder	Fermentas GmbH, St.Leon-Rot
ICAM-1 (M-19): sc-1511	Santa Cruz Biotechnology, INC., Dallas, Texas, USA
Isotone Kochsalzlösung, NaCl 0,9 %	B.Braun Melsungen AG, Melsungen
Loading Dye Solution 6x	Fermentas GmbH, St.Leon-Rot
Magermilchpulver	J. M. Gabler Saliter GmbH, Obergünzburg
Melatonin	Apotheke des Universitätsklinikums des Saarlandes, Homburg Saar
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Oligo(dT)18 Primer, 0,5 ug/ul	Fermentas GmbH, St.Leon-Rot
p44/42 MAPK (Erk1/2) (137F5), Rabbit mAb, #4695P	Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA
Pentobarbital-Natrium „Narcoren“	Merial GmbH, Hallbergmoos
PeqGold TriFast	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
peqGold Universal-Agarose	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Phenylmethanesulfonylfluorid, ≥ 98.5 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) XP, Rabbit mAb, #4370S	Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA

Primer, salzfreie Oligos, lyophilisiert, 100uM	Eurofins MWG GmbH, Ebersberg
Protein Molecular Weight Marker	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, USA
RevertAid Reverse Transkriptase 200U/ul	Fermentas GmbH, St.Leon-Rot
RiboLock RNase Inhibitor	Fermentas GmbH, St.Leon-Rot
Schwefelsäure (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Merck KGAA, Darmstadt
Sevofluran Baxter	Baxter GmbH, Unterschleißheim
SlimFast Milchshake Pulver	Allpharm Vertriebs GmbH, Messel
SOD-1 (FL-154): sc-11407, Rabitt	Santa Cruz Biotechnology INC., Dallas, Texas, USA
Sterofundin ISO	B.Braun Melsungen AG, Melsungen
Trypan Blue Solution 0,4 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
VCAM-1 (C-19): sc-1504	Santa Cruz Biotechnology INC., Dallas, Texas, USA

### 3.1.4. Lösungen und Puffer

Alle Lösungen wurden unter Verwendung von zweifach destilliertem Wasser (aqua bidest.) hergestellt. Verwendete Behältnisse und sonstige wiederverwendbare Materialien wurden durch Autoklavieren sterilisiert und anschließend wiederholt mit aqua bidest gespült.

<b>Bromphenolblau-Lösung</b>	
10x MOPS Pufferan (ohne EDTA)	0,94 ml
H <sub>2</sub> O-DEPC	2,27 ml
Sucrose	4 g
Bromphenolblau	50 mg
<b>Carbonat-/Bicarbonat-Puffer (0,1 M), pH 9,5</b>	
NaHCO <sub>3</sub>	8,4 g
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	3,56 g
H <sub>2</sub> O	1000 ml
<b>Coomassie-Brillant-Blau Färbelösung</b>	
Brillant Blau R250	1,25 g
Methanol 100 %	227 ml
Essigsäure	46 ml
H <sub>2</sub> O	227 ml
<b>DNA-Elektrophoreseigel 2 %</b>	
Agarose	2 g
1x TAE-Puffer	100 ml

Ethidiumbromid-Lösung	1 µl / 100 ml
<b>EDTA (250 mM)</b>	
EDTA	4,7 g
H <sub>2</sub> O	50 ml
<b>Ethidiumbromid-Lösung</b>	
H <sub>2</sub> O-DEPC	1 ml
Ethidiumbromid	10 mg
<b>Laufpuffer Elektrophorese</b>	
1x MOPS-Puffer	80 ml
H <sub>2</sub> O	720 ml
<b>10x LLP-Elektrophoresepuffer</b>	
SDS	10 g
Tris base	29 g
Glycin	144 g
H <sub>2</sub> O	1000 ml
<b>Lösung A (Trenngel Puffer), pH 8,9</b>	
Tris HCl	2,88 g
Tris base	15,96 g
SDS	0,4 g
H <sub>2</sub> O	100 ml
<b>Lösung B (Sammelgel Puffer)</b>	
Tris base	6,057 g
H <sub>2</sub> O	100 ml
SDS	0,4 g
Bromphenolblau	geringe Menge
<b>Lyse-Puffer (Western Blot)</b>	
Unmittelbar vor Gebrauch 20 µl 100 mM PMSF-Lösung / ml Puffer hinzugegeben	
Tris pH 7,5, 1 M	2 ml
NaCl, 5 M	0,4 ml
EDTA 250 mM	80 µl
Triton X 100, 10 %	10 ml
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> ) 4 %	1 ml

<b>1x MOPS-Puffer (3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure-Puffer), pH 7,0</b>	
Einstellen des pH mit NaOH 10 M	
MOPS Pufferan	104,7 g
EDTA	3,7 g
<b>10x PBS (phosphate buffered saline), pH 7,4</b>	
Kochsalz (NaCl)	80 g
Kaliumchlorid (KCl)	2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> – 2H <sub>2</sub> O	14,4 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,4 g
H <sub>2</sub> O	1000 ml
<b>PMSF-Lösung (100mM)</b>	
PMSF	174,2 mg
Isopropanol 100 %	10 ml
<b>2x Probenpuffer (Lämmli-puffer)</b>	
Tris 0,5 M, pH 6,8	2,5 ml
Glycerin 20 %	2 ml
SDS 20 %	2 ml
Bromphenolblau	20 mg
H <sub>2</sub> O	3,5 ml
Mercaptoethanol	10 µl / ml
<b>RNase-freies Wasser (H<sub>2</sub>O-DEPC)</b>	
H <sub>2</sub> O	1000 ml
DEPC-Lösung	1 ml
<b>RNA-Elektrophoresegel 1,2 %</b>	
Agarose	10 g
H <sub>2</sub> O	86 ml
10x MOPS-Puffer	12 ml
Formaldehyd 37 % p.a.	22 ml
<b>RNA-Probenpuffer</b>	
10x MOPS-Puffer ohne EDTA	30 µl
1x MOPS-Puffer mit EDTA	30 µl
Formamid	150 µl
Formaldehyd 37 % p.a.	54 µl
Bromphenolblau-Lösung	10 µl

Ethidiumbromid-Lösung	1 µl
<b>Sammelgel, Western Blot (5 %)</b>	
Lösung B	2,5 ml
Rotiphorese Gel 30	1,33 ml
H <sub>2</sub> O	6,17 ml
APS 10 %	100 µl
Temed	10 µl
<b>50x TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA), pH 8,3</b>	
TRIS Pufferan 121,14 g / mol	121 g
Essigsäure (99 %)	22 ml
EDTA 0,5 M, pH 8,0	50 ml
H <sub>2</sub> O	500 ml
<b>10x TBS-Puffer</b>	
Tris HCl	25,4 g
Tris base	4,72 g
NaCl	292,2 g
H <sub>2</sub> O	1000 ml
<b>10x Transferpuffer</b>	
Tris base	30,3 g
Glycin	144,1 g
H <sub>2</sub> O	1000 ml
<b>1x Transferpuffer</b>	
10x Transferpuffer	100 ml
Methanol	200 ml
H <sub>2</sub> O	700 ml
<b>Trenngel, Western Blot (12 %)</b>	
Lösung A	7,5 ml
Rotiphorese Gel 30	9,6 ml
H <sub>2</sub> O	12,9 ml
APS 10 %	300 µl
Temed	30 µl
<b>1 M Tris-Puffer (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-Puffer), pH 7,5</b>	
Tris HCl	6,35 g
Tris base	1,18 g

H <sub>2</sub> O	50 ml
<b>5 % Trockenmilch</b>	
Trockenmilchpulver	5 g
1x TTBS	100 ml
<b>1x TTBS-Puffer</b>	
10x TBS-Puffer	100 ml
Tween20	1 ml
H <sub>2</sub> O	900 ml

### 3.2. Methoden

#### 3.2.1. Tierexperimenteller Teil

##### 3.2.1.1. Versuchstiere

Alle Tierversuche wurden gemäß dem deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt und von der zuständigen Tierschutzkommission genehmigt (Nr. 36/2012 und 02/2013, Landesamt für Verbraucherschutz, Saarbrücken, Deutschland). Männliche C3H / HeN Mäuse (Wildtyp, 6 Wochen alt, > 20 g) wurden von Janvier (Saint-Berthevin Cedex, Frankreich) bezogen und in der Abteilung für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes (Direktor: Prof. Dr. med. Michael D. Menger), Homburg/Saar bis zur Versuchsdurchführung gehalten. Dabei wurde ein Tag-Nacht-Rhythmus mit einer Hell-Dunkel-Phase von 12 Stunden eingehalten. Bis zum Vorabend der Versuche bestand freier Zugang zu Nager-Standard-Diät sowie bis zum Präparationsbeginn zu Wasser.

##### 3.2.1.2. Narkoseeinleitung und Lagerung

Nach inhalativer Narkoseeinleitung mittels Sevofluran wurden 1,6 mg / 20 g KG Pentobarbital intraperitoneal injiziert. Pentobarbital wurde zu diesem Zweck auf eine Konzentration von 8 mg / ml mit isotoner Kochsalzlösung verdünnt. Nach Injektion wurde die Zeit bis zum Wirkungseintritt unter erhaltener Spontanatmung abgewartet. Die Tiere wurden gewogen und in Rückenlage mittels Pflasterstreifen an Kopf, Extremitäten und Schwanz an einer beheizbaren Aluminiumplatte (42°C) befestigt. Die Körpertemperatur wurde kontinuierlich durch rektale Messung überwacht und mittels beheizter Unterlage und Lichtquelle (40 W, ca. 20 cm oberhalb des Tieres) konstant bei etwa 37°C gehalten.

### 3.2.1.3. Chirurgische Präparation

Im Rahmen der Präparation erfolgte die Anlage einer Trachealkanüle, sowie eines arteriellen und eines venösen Gefäßkatheters.

Nach örtlicher Betäubung mittels subkutaner Applikation von Bupivacain wurde ein etwa 1 cm langer medianer Hautschnitt oberhalb des Sternums gesetzt. Speicheldrüsen und prätracheale Muskulatur wurden durch stumpfe Präparation nach lateral verlagert und die Trachea freigelegt. Diese wurde zur Tracheotomie durch Querinzision eröffnet und mit einem ca. 2 cm langen Kunststoffkatheter (durch kürzen angepasste BD Venflon Pro Safety) gesichert, welcher kranial und kaudal durch Fäden fixiert wurde. Die Vena jugularis interna wurde auf der rechten Halsseite aufgesucht und kranial ligiert. Unter Verwendung eines Mikroskops wurde das Gefäß eröffnet, katheterisiert und der eingebrachte Katheter (ID: 0,28 mm, OD: 0,61 mm) kranial und kaudal der Öffnung durch Umschlingen befestigt. An diesem zentralvenösen Zugang wurde ein Perfusorsystem angeschlossen, welches zur kontinuierlichen Infusion von 10 ml / kg / Stunde Ringer-Acetat-Lösung genutzt wurde. Um die Allgemeinanästhesie aufrechtzuerhalten wurde bedarfsadaptiert, intermittierend Pentobarbital (20 - 30 µl einer 8 mg / ml Pentobarbital-Lösung in 0,9 % Natriumchlorid per Bolus) über den venösen Zugang appliziert. Die Arteria carotis communis wurde in der linken Vagina carotica freigelegt, vorsichtig vom Nervus vagus getrennt und kranial abgebunden. Nach kaudalem Abklemmen erfolgte eine Katheterisierung entsprechend dem Vorgehen bei der Vena jugularis interna. Folgend wurde der Katheter (ID: 0,28 mm, OD: 0,61 mm) mit Fäden kranial der Inzision, sowie kranial und kaudal der Klemmstelle gesichert. Ein mit diesem arteriellen Zugang verbundenes Druckabnehmersystem diente in Verbindung mit einem Überwachungsmonitor zur Registrierung des arteriellen Mitteldrucks (MAP) und der Herzfrequenz.

Die Induktion der polymikrobiellen Sepsis erfolgte mittels Coecum Ligatur und Inzision (CLI) nach Scheiermann et al. (194). Hierzu wurde durch eine 1 cm lange mediane Laparotomie das Abdomen eröffnet. Das Coecum wurde aufgesucht, mobilisiert und unter Erhalt der Darmassage, mit Unterbindung der mesenterialen Gefäßversorgung, ligiert. An der abmesenterialen Seite des ligierten Bereichs erfolgte mittels Skalpells eine 0,5 cm lange Inzision. Im Folgenden wurde das Coecum rückverlagert und die abdominelle Wand durch Einzelknopfnähte verschlossen. Scheinoperierte (sham) Tiere wurden wie oben beschrieben behandelt, jedoch wurde das Coecum nur aufgesucht und keine CLI durchgeführt.

### 3.2.1.4. Versuchsgruppen

Die Versuchstiere wurden durch Randomisierung auf die vier Versuchsgruppen verteilt (Tabelle 5).

Versuchsgruppen	Bezeichnung	Anzahl der Tiere
Scheinoperation + Melatoninlösung	Sh-M	n = 8
Scheinoperation + Vehikellösung	Sh-V	n = 8
CLI + Melatoninlösung	CLI-M	n = 10
CLI + Vehikellösung	CLI-V	n = 10
		Gesamt n = 36

**Tabelle 5.** Versuchsgruppen. CLI: Coecum Ligatur und Inzision; n: Anzahl.

### 3.2.1.5. Versuchsprotokoll

Melatonin- oder Vehikellösung wurden im direkten Anschluss an die Präparation über den zentralvenösen Katheter (ZVK) injiziert. Dabei wurden 1mg / kg / KG Melatonin verabreicht. Melatonin wurde als Reinsubstanz bezogen und in Dimethylsulfoxid gelöst. Diese Stammlösung wurde bei - 20 °C gelagert und am Versuchstag mit 0,9 % NaCl zu einer Applikationslösung verdünnt. Die Applikation geschah verblindet. Der Zeitpunkt der Medikamentenapplikation markierte den Beginn des Beobachtungszeitraums, dessen Dauer auf 5 Stunden festgesetzt war. Während dieser Zeit wurde in 15-minütigen Abständen MAP, Herzfrequenz und Temperatur gemessen.

Am Ende des Beobachtungszeitraums wurden den Versuchstieren in tiefer Narkose das gesamte Blutvolumen entzogen. Dies geschah unter Verwendung einer mit unfraktioniertem Heparin benetzten Spritze über den in der Arteria carotis communis platzierten Katheter. 15 Minuten zuvor waren 12,5 IE unfraktioniertes Heparin (250 µl einer Lösung mit 50 IE / ml in 0,9 % NaCl) intravenös verabreicht worden. Das gewonnene Vollblut wurde in ein Mikroreaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (5000 rpm, 10 min, 4 °C). Plasma und zelluläre Bestandteile wurden getrennt und separat bei - 80 °C gefroren und aufbewahrt. Unverzüglich nach Tötung der Tiere wurden Thorax und Abdomen eröffnet und die inneren Organe entnommen. Diese wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und zur späteren Analyse bei - 80 °C gelagert.

### **3.2.2. Molekularbiologischer Teil**

#### **3.2.2.1. Western Blot**

#### **3.2.2.2. Funktionsprinzip**

Der Western Blot ist ein Verfahren zum Nachweis spezifischer Proteine. Das Verfahren besteht im Wesentlichen aus zwei Schritten. Zunächst erfolgt die Auftrennung der im Probengemisch enthaltenen Proteine nach Molekülgröße mittels Gelelektrophorese. Anschließend erfolgt die Übertragung auf eine Membran, die die Bindung spezifischer Antikörper ermöglicht. Ein primärer Antikörper bindet direkt an das nachzuweisende Protein. Durch Verwendung eines enzymgekoppelten, gegen den Primärantikörper gerichteten, sekundären Antikörpers lässt sich nun der entstandene Antigen-Antikörper-Komplex darstellen. Das mit dem Sekundärantikörper verbundene Enzym erzeugt bei Umsetzung eines entsprechenden Substrats eine Lichtreaktion. Diese Chemilumineszenz kann mittels Filmes oder einer entsprechend konfigurierten Kamera detektiert werden.

##### **3.2.2.2.1. Probenaufarbeitung**

Die im Folgenden beschriebenen Schritte wurden zur Qualitätssicherung und Minimierung der Proteinaseaktivität soweit möglich auf Eis durchgeführt. Von dem zuvor bei - 80 °C gelagertem Gewebe wurden Proben mit einem Gewicht von ca. 100 mg abgewogen, mit 1 ml Lysepuffer verdünnt und homogenisiert. Das Homogenisat wurde für 5 min bei 10.000 g zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde zur weiteren Analyse auf 200 µl Aliquote aufgeteilt und bei - 20 °C gelagert.

Die quantitative Bestimmung des Proteingehalts erfolgte nach Bradford (26). Hierzu wurde 1 µl der aliquotierten Lösungen mit 1 ml einer Coomassie-Brilliant-Blau-Lösung (Rotiquant Reagenz 1 : 5 verdünnt in aqua dest.) verdünnt. Nach fünfminütiger Reaktionszeit wurde photometrisch die Extinktion bei 595 nm gegen einen Leerwert bestimmt. Die Einordnung der Ergebnisse erfolgte in Bezug auf eine Standardkurve unter Verwendung von BSA als Eichprotein.

##### **3.2.2.2.2. SDS-PAGE**

Bei diesem von Laemmli (122) entwickelten Verfahren werden Proteine durch Erhitzen und die Zugabe von Natriumdodecylsulfat linearisiert und erhalten eine konstante negative Ladung. Durch Zusatz von  $\beta$ -Mercaptoethanol werden vorhandene Disulfidbrücken mittels Reduktion

gespalten. Auf diese Weise wird die Auftrennung der Proteine in einem Polyacrylamidgel nach Molekülmasse ermöglicht. Das Verfahren wurde nach dem Protokoll von Sambrook und Russell (190) durchgeführt. Eine entsprechende Menge (ca. 50 - 100 µg Protein) des Probenmaterials wurde mit Lysepuffer auf 10 µl Volumen aufgefüllt und anschließend mit 2x Laemmli-Puffer 1:1 versetzt. Die entstandene Lösung wurde für 10 min auf 95 °C erhitzt. Zur Auftrennung dienten ein Trenngel mit 12 % und ein Sammelgel mit 5 % Polyacrylamidanteil. Diese wurden unter Verwendung einer dreißigprozentigen Acrylamid / Bisacrylamidlösung hergestellt. Die Polymerisation wurde durch Zugabe von Ammoniumpersulfat und Tetramethylethyldiamin (TEMED) erreicht. Ein im Sammelgel platzierter Kunststoffkamm diente der Ausformung von Probenfächern, welche mit 20 µl Probenlösung geladen wurden. Um die spätere Orientierung zu erleichtern wurde zudem eine Tasche mit 5 µl Molekularmarker bestückt. Der Lauf erfolgte in 1x LLP-Elektrophoresepuffer zunächst bei 50 V Spannung, diese wurde nach Erreichen des Trenngels auf 70 V erhöht und für 60 min beibehalten.

#### **3.2.2.2.3. Blot**

Für diesen Schritt wurde das sogenannte Tank-Blot-Verfahren angewandt. Eine aus Polyvinylidenfluorid (PVDF) bestehende Membran wurde mit Methanol aktiviert und mit dem die aufgetrennten Proteine enthaltenden Trenngel in Kontakt gebracht. Anschließend wurden Gel und Membran mit Schichten von Filterpapier und Fasermatten angefeuchtet mit Transferpuffer in eine Kompressionskassette gespannt. Diese wurde in das Transfermodul eingelegt, welches mit eiskaltem Transferpuffer gefüllt wurde. Die Übertragung wurde unter Kühlung mit einer Stromstärke von 250 mA für 2 Stunden durchgeführt. Eine Qualitätssicherung der Übertragung erfolgte durch anschließende Anfärbung der Gele mit Coomassie-Brillant-Blau um verbliebenes Protein auszuschließen.

#### **3.2.2.2.4. Antigen-Antikörper-Reaktion und Detektion**

Um unspezifische Bindungsreaktionen zwischen Antikörpern und der Membran zu unterdrücken wurde diese, beginnend direkt im Anschluss an das Blotting, über Nacht in Trockenmilchlösung geblockt. Es schloss sich die Inkubation mit den jeweiligen Primärantikörpern (Tabelle 6) für 1,5 h in 1x TTBS an.

Zielstruktur	Katalognummer	Lösung
<b>SOD-1</b>	sc-11407	1:1000 in 1xTTBS
<b>VCAM-1</b>	sc-1504	1:200 in 1xTTBS
<b>ICAM-1</b>	sc-1511	1:200 in 1xTTBS
<b>ERK1/2</b>	#4695	1:1000 in 1xTTBS
<b>phospho-ERK1/2</b>	#4370	1:2000 in 1xTTBS
<b>Caspase-3</b>	#9665	1:1000 in 1xTTBS
<b>cleaved Caspase-3</b>	#9664	1:1000 in 1xTTBS
<b>Caspase-12</b>	#2202	1:1000 in 1xTTBS

**Tabelle 6.** Aufstellung der für den Western-Blot verwendeten Antikörper. TTBS: Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween20; SOD: Superoxiddismutase; VCAM: Vasculäres Zelladhäsionsmolekül; ICAM: Intrazelluläres Adhäsionsmolekül; ERK: extracellular-signal regulated kinase.

Überschüssiger Antikörper wurde im Anschluss durch dreimaliges Waschen für 5 min in 1x TTBS unter Schütteln entfernt. Die Detektion wurde durch die Verwendung eines mit Meerrettichperoxidase gekoppelten Sekundärantikörpers ermöglicht. Bei dessen Antigen handelt es sich um einen Bereich des Fc-Fragments des Primärantikörpers. Hiermit wurde die Membran ebenfalls für 1,5 h in TTBS inkubiert. Die Anregung zur Chemilumineszenz erfolgte durch den Einsatz von Luminol und Peroxidlösung, welche in Form des Amersham Enhanced Chemiluminescence Reagenz nach Angaben des Herstellers verwendet wurden.

### 3.2.2.2.5. Strippen der Membran

Als Strippen der Membran bezeichnet man das Entfernen des primären und sekundären Antikörpers von der Western-Blot-Membran um die Detektion weiterer Antigene zu ermöglichen, ohne alle vorangegangenen Schritte erneut durchführen zu müssen. Die Membranen wurden hierzu zweimal in 1x TTBS-Puffer für jeweils 5 min gewaschen und anschließend für 30 min bei 56 °C in Stripping Puffer unter schütteln inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit TTBS für je 20 min wurden die Membranen über Nacht in einer fünfprozentigen Milchproteinlösung geblockt. Am Folgetag schloss sich die Inkubation mit dem zweiten Primärantikörper an.

### **3.2.2.2.6. Auswertung des Western Blots**

Die Banden wurden mit dem Chemiluminescence Imaging System 4.2 detektiert und densitometrisch mit der Software TotalLab Quant analysiert. Hintergrundartefakte wurden nach dem Rolling-ball-Algorithmus korrigiert. Eine Normalisierung der Intensitäten erfolgte gegen eine auf jedes Gel geladene Kontrollprobe. Zusätzlich wurde die Probe gegen die entsprechende Bandenintensität des Gels nach dem Blot normalisiert.

### **3.2.2.3. RNA-Expressionsanalyse**

Um eine Kontamination der Proben mit RNasen und eine Degradation zu vermeiden wurden alle Schritte der RNA-Analysen auf Eis oder in einer auf 4 °C gekühlten Zentrifuge durchgeführt. Zudem wurde ein eigener Satz Pipetten und RNase-freie Verbrauchsmaterialien benutzt.

#### **3.2.2.3.1. RNA-Isolierung**

Die RNA wurde mittels der von Chomczynski und Sacchi (44) beschriebenen Single-Step-Methode unter Verwendung des Reagenz FastTri aus Lebergewebe gewonnen. Die Proben wurden in flüssigem Stickstoff zerkleinert, so dass je 10 - 15 mg in 1 ml des Reagenzes homogenisiert wurden. In der Lösung enthalten sind Phenol und Guanidinisothiocyanat in einphasiger Lösung. Guanidinisothiocyanat denaturiert Protein und inaktiviert RNasen. Nach 5-minütiger Inkubation zur Dissoziation von Nukleotidkomplexen wurden 0,2 ml Chloroform pro ml FastTri zugegeben und das Produkt gründlich durch Vortex vermischt. Nach 10 min Ruhezeit und 5-minütiger Zentrifugation bei 12.000 g bilden sich 3 Phasen. In der unteren organischen Phenol-Chloroform-Phase konzentriert sich Protein. In der oberen wässrigen Phase sammelt sich die enthaltene RNA. Da durch das Reagenz ein saures Milieu erzeugt wird reichert sich DNA in der Interphase und unteren Phase an. Zur Präzipitation der RNA wurde die obere Phase vorsichtig entnommen und mit 0,5 ml pro ml FastTri Isopropanol für 15 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (10 min, 12.000 g) bildete sich ein die RNA enthaltendes Pellet. Der Isopropanolüberstand wurde abgenommen und das Pellet zweimal mit je 1 ml 75 % Ethanol gewaschen. Nach leichtem Antrocknen bei Raumtemperatur wurde das RNA-Präzipitat in RNase-freiem und Diethylpyrocarbonat (DEPC)-behandeltem Wasser gelöst und bei – 80 °C aufbewahrt.

### 3.2.2.3.2. RNA-Aufarbeitung

#### 3.2.2.3.2.1. Konzentrationsbestimmung

Nukleinsäuren weisen bei photometrischer Messung ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260 nm auf. Unter Kenntnis dieser Tatsache lässt sich, durch Zuhilfenahme folgender Zusatzinformationen, deren Konzentration nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz berechnen. Die Extinktion  $E_{\lambda 260}$  bei einem pH von 7, einer Stoffmengenkonzentration von 40  $\mu\text{g} / \text{ml}$  und einer Schichtdicke von 1 cm beträgt in diesem Fall 1. Dies führt zu folgender Formel:

$$\text{Konzentration } [\mu\text{g} / \text{ml}] = E_{\lambda 260} \times 40 \mu\text{g} / \text{ml}$$

Die Messung erfolgte in TRIS-HCl, sodass ein entsprechender Verdünnungsfaktor (hier 50) berücksichtigt werden muss.

#### 3.2.2.3.2.2. Bestimmung der Reinheit

Wie Nukleinsäuren haben auch Proteine ein Absorptionsmaximum, dieses liegt bei  $\lambda = 280 \text{ nm}$ . Durch Messung der Extinktion bei beiden Wellenlängen lässt sich der Quotient  $E_{\lambda 260} / E_{\lambda 280}$  berechnen. Dieser ist ein Maß für die Verunreinigung der isolierten RNA und sollte über 1,8 liegen.

#### 3.2.2.3.2.3. Einschätzung der RNA-Integrität

Die Agarosegel-Elektrophorese ermöglicht es Rückschlüsse auf die Integrität der RNA zu ziehen. Um ein korrektes Wanderungsverhalten zu ermöglichen ist es nötig eine Bildung von Sekundärstrukturen durch die RNA-Einzelstränge zu verhindern. Hierzu wurde Formaldehyd 37 % in Probenpuffer und Gel verwendet. Je eine 2  $\mu\text{g}$  RNA enthaltende Menge Lösung wurde mit 9  $\mu\text{l}$  Probenpuffer vermengt, 30 min bei 65 °C im Wasserbad inkubiert, gevortext, zentrifugiert und in die Taschen des Gels geladen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 100 V Gleichspannung in 1x MOPS Laufpuffer für 45 min. Die entstandenen Banden konnten durch das im Probenpuffer enthaltene Ethidiumbromid detektiert werden. Dieses interkaliert in die RNA-Stränge und fluoresziert nach Anregung mit UV-Licht. Die Integrität kann nun anhand der dargestellten Banden evaluiert werden. Es sollten sich zwei deutlich abgrenzbare Banden gebildet haben, welche den 18S- und 28S-Untereinheiten der rRNA entsprechen. Diese machen quantitativ den größten Teil der Gesamt-RNA aus. Bei sehr

niedriger Degradation kann zusätzlich eine der 5S-Untereinheit entsprechende dritte Bande sichtbar werden. Um eine ausreichende Qualität sicherzustellen sollte das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten der 28S- zur 18S-Bande mindestens 2:1 betragen.

#### **3.2.2.3.2.4. Entfernung von DNA-Resten**

Um die aufgereinigten Proben von verbliebener DNA zu befreien wurden diese mit dem Enzym DNase behandelt. 2 µg der isolierten RNA wurden mit DEPC-Wasser auf ein Gesamtvolumen von 20 µl verdünnt und 2 µl 10x DNase Puffer, 0,5 µl RNase Inhibitor und 1 µl DNase I hinzugefügt. Während der sich anschließenden Inkubationszeit von 45 min bei 37 ° wurde die enthaltene DNA zersetzt. 1 µl EDTA und das Erhitzen auf 65 °C für 10 min beendeten den Prozess.

#### **3.2.2.3.3. Reverse Transkription**

Zur Durchführung einer quantitativen real-time Polymerasekettenreaktion (RT-qPCR) wurde die gewonnene RNA unter Gebrauch des Enzyms Reverse Transkriptase (RT) in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Da als Matrize die bereits gespleißte mRNA verwendet wurde, enthält die cDNA keine Introns. Als Startpunkt der Polymerisation dienten Primer in Form von Oligo-dT-Nukleotiden (15-25-Desoxythymidine), welche sich an dem Poly-Adenosin(A)-Schwanz der mRNA anlagern. Die entstandenen DNA-RNA-Hybridstränge stellten das Ausgangsprodukt für die PCR dar.

Je 1 µg RNA wurde mit 1 µl Oligo-dT-Primer kombiniert und mit DEPC-Wasser auf 12,5 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Dieser Ansatz wurde für 5 min bei 65 °C inkubiert und nach kurzer Kühlung auf Eis wurde folgendes Reaktionsgemisch als Mastermix hinzugefügt.

*Pro Ansatz:*

4 µl Reaktionspuffer RT-Buffer 5x

2 µl dNTP-Mix, 10 mM je Nukleotid

0,5 µl RiboLock™ RNase Inhibitor

1 µl RevertAid™ Reverse Transkriptase 200 U / µl

Die Umschreibung erfolgte im GeneAmp-PCR-System 2400 unter Verwendung eines zweistufigen Temperaturprofils:

1. 42 °C für 60 min

2. 70 °C für 10 min

Im Anschluss wurden die Proben 1:10 mit aqua dest. verdünnt und entweder bei -20 °C aufbewahrt oder direkt für die RT-qPCR verwendet.

#### **3.2.2.3.4. Quantitative real-time PCR (RT-qPCR)**

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion ist es möglich DNA-Abschnitte in vitro aus kleinsten Mengen Ausgangsmaterial enzymatisch zu vervielfältigen (160). Es wird dabei in mehreren Zyklen mit sich wiederholendem Temperaturprofil vorgegangen. Kurze, zum DNA-Strang komplementäre, Oligonukleotide (Primer) grenzen den gewünschten Bereich ein und dienen als Startpunkt der DNA-Polymerase. Der Doppelstrang musste hierfür zunächst durch Erhitzen (95 °C) in Einzelstränge denaturiert werden, bevor bei einer niedrigeren Temperatur (55 – 60 °C) eine Anlagerung der Primer (Hybridisierung) erfolgen konnte. Die Synthese (Elongation) des Produkts geschah im Temperaturoptimum (72 °C) der verwendeten thermostabilen Taq-DNA-Polymerase, welche einen Ablauf mehrerer Zyklen ohne Inaktivierung des Enzyms ermöglichte. Da sich die Anzahl der Kopien in jedem Lauf verdoppelte und das Produkt wiederum als Ausgangsmaterial diente, erfolgte eine exponentielle Vervielfältigung.

Die RT-qPCR ermöglicht es das Reaktionsprodukt zu quantifizieren. Dies geschieht im Allgemeinen durch Fluoreszenzfarbstoffe, die mit der DNA in Wechselwirkung treten. Im Gegensatz zur Erstbeschreibung von 1993 (102) wurde in dieser Arbeit der weniger mutagene Farbstoff EvaGreen verwendet. Während der Phase des exponentiellen Anstiegs der Fluoreszenzintensität besteht eine direkte Korrelation zur relativen Zunahme des Amplifikats. Durch die Anwendung unterschiedlicher Methoden erlaubt dieser Umstand eine relative oder absolute Quantifizierung und damit Aussagen über die Expression der Zielgene (siehe Abschnitt 3.2.2.2.5)

Die Durchführung erfolgte unter Zuhilfenahme des RT-qPCR Reaktionskit (5x Hot Start Taq EvaGreen qPCR Mix), welches den interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff EvaGreen beinhaltet. Das Fluoreszenzsignal wurde am Ende jedes Hybridisierungsschrittes detektiert. Dabei wurde auf ein Intron-überspannendes Primerdesign geachtet um die Amplifikation von genomischer DNA zu verhindern bzw. deren Produkte besser identifizieren zu können (90).

Gen	NCBI Gen ID	Forward (5'–3')	Reverse (5'–3')
<b>vcam-1</b>	22329	ATGGCTCGTACACCATCC	CGATGGCAGGTATTACCAAG
<b>icam-1</b>	15894	ATGGGTTCGAGGGTTTCTCTAC	CATGAGCATGAGGCTCGATTG
<b>perk</b>	13666	ATGCACAGGGACCTCAAG	CTGCTCTGGGCTCATGTATAG
<b>chop</b>	13198	CAGGAGAACGAGCGGAAAGTGG	TGCTGGGTACACTTCCGGAGAG
<b>arf6</b>	226641	TTCGAGGCTGGGTTCATAG	GGGAGGCGTAATACACTT
<b>ire1<math>\alpha</math></b>	78943	AAGATGGACTGGCGGGAGAAC	GGGAAGCGGGAAGTGAAGTAG
<b>s-xbp1</b>	22433	GCAGCAAGTGGTGGATTTGG	GGCCTGCACCTGCTGCGGACTC
<b>grp78</b>	14828	CAAAGAGCGCATTGACAC	TCTTCAATGTCCGCATCC
<b>crebh</b>	208677	ACTGGGTGGCTTCAGAAC	TGTCTCTGTGCCTGGAAAC
<b>sdha</b>	66945	AGACGTTCGACAGGGGAATG	CATCGACCCGCACTTTGTAATC
<b>rps16</b>	20055	ATATCCGGGTCCGTGTGAAGG	CCGCCAAACTTCTTGGATTCCG

**Tabelle 7.** Auflistung der verwendeten Primer einschließlich Gen ID und Basenfolge. NCBI: National Center for Biotechnology Information.

Die Reagenzien wurden in Form eines Mastermixes angesetzt dessen Aliquote in 96-Well-Platten mit der cDNA zu einem Gesamtvolumen von 20  $\mu$ l zusammengeführt wurden. Ein Ansatz pro Well bestand somit aus:

12 $\mu$ l	aqua dest.
4 $\mu$ l	5x Hot Start Taq EvaGreen qPCR Mix
2 $\mu$ l	Oligo (dT)-Oligonukleotid Primermix (je 2,5 $\mu$ M)
2 $\mu$ l	cDNA (1:10 verdünnt)

Bestandteil eines jeden Laufs war zudem eine Negativkontrolle (NTC, non template control) ohne cDNA. Die Reaktionsschritte, mit den für sie notwendigen 40 Temperaturzyklen, liefen vollautomatisch innerhalb eines Thermocyclers ab (Tabelle 8).

Reaktionsschritt	Temperatur (°C)	Dauer
Initiale Denaturierung	95	15 min
Denaturierung	95	15 s
Hybridisierung	55 – 60	20 s
Elongation	72	20 s
	72	1 min
	10	1 min
Schmelzkurvenanalyse	+ 0,5 °C / 5 s bis 95 °C	

} X 40

**Tabelle 8.** Reaktionsablauf der qRT-PCR mit Temperaturprofil.

Um die Reaktionsspezifität sicherzustellen und Artefakte durch die Bildung von Primerdimeren auszuschließen wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Hierbei wurde nach Abschluss der Kettenreaktion die Temperatur schrittweise erhöht bis sich ein plötzlicher Abfall der Fluoreszenzintensität zeigte. Dies ist durch die Freisetzung des Interkalators im Rahmen der Dissoziation in Einzelstränge bedingt. Der Schmelzpunkt ( $T_m$ ) ist unter anderem von der Länge und Basenzusammensetzung abhängig und ermöglicht eine Unterscheidung von PCR-Produkten. Die Schmelzkurve wird als Fluoreszenzänderung gegen die Zeit graphisch dargestellt. In deren 1. Ableitung zeigt sich der Schmelzpunkt als Peak. Ein entsprechender und singulärer Peak konnte nach jedem Lauf nachgewiesen werden.

Des Weiteren wurde das Amplifikat gelelektrophoretisch untersucht um die korrekte Fragmentlänge sicherzustellen und Nebenprodukte auszuschließen. Den 20  $\mu$ l Ansätzen wurden hierzu im Anschluss an die PCR 4  $\mu$ l Loading Dye Solution 6x hinzugegeben. Mit 10  $\mu$ l der entstandenen Lösung wurde ein mit Ethidiumbromid gefärbtes Agarosegel geladen. Der Größenmarker GeneRule 100bp DNA Ladder diente der Orientierung. Die Auftrennung erfolgte bei 80 V Gleichspannung für 30 min in 1x TAE-Puffer, wonach das Bandenmuster unter UV-Licht ausgewertet wurde. Alle durchgeführten Kontrollen wiesen eine spezifische Bande auf, deren Lage dem jeweils zu erwartendem Produkt entsprach. In den NTCs konnte weder ein Fluoreszenzsignal noch ein gelelektrophoretisch auftrennbares Amplifikat nachgewiesen werden.

### 3.2.2.3.5. Auswertung der RT-qPCR

Die gewonnenen Daten wurden anhand einer relativen Quantifizierung bewertet. Zunächst wurden die  $Cy_0$ -Werte nach Guescini et al. (96) bestimmt. Diese Werte stellen den Schnittpunkt der Abszisse (X-Achse) mit der Tangente des Wendepunkts der Richardskurve dar. Die

gemessenen Fluoreszenzintensitäten werden dabei mittels nicht-linearer Regression an die 5-Parameter-Richardsfunktion angepasst. Da der  $Cy_0$ -Wert anhand der Steigung im Wendepunkt dieser Funktion bestimmt wird, erlaubt er Rückschlüsse auf die Reaktionskinetik und damit auf die zu Beginn vorhandene cDNA-Menge. Dabei ist diese Methode objektiv und weniger abhängig von gleichbleibender Reaktionseffizienz (96).

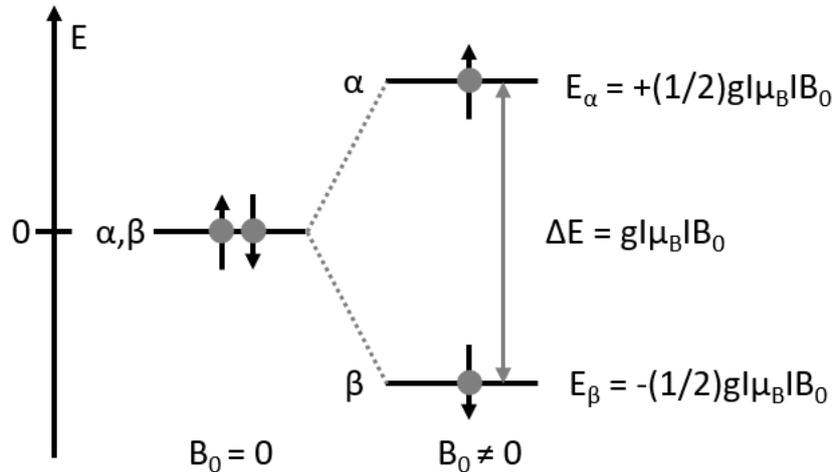
Die  $Cy_0$ -Werte wurden, um eine relative Quantifizierung zu ermöglichen, gegen die Werte für die Untereinheit A des Succinat-Dehydrogenase-Komplexes (SDHA) und das ribosomale Protein S16 (RPS16) normalisiert. Die normalisierten Werte wurden mittels der von Livak et al. beschriebenen  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode in Relation gesetzt (137).

### **3.2.2.4. Elektronenspinresonanz-Spektroskopie**

#### **3.2.2.4.1. Funktionsprinzip**

Die ESR-Spektroskopie beruht auf der Absorption elektromagnetischer Strahlung durch paramagnetische Stoffe in einem Magnetfeld. Paramagnetismus tritt auf, wenn Stoffe ungepaarte Elektronen und ein magnetisches Moment besitzen. Zu den quantenmechanischen Grundlagen gehört der Eigendrehimpuls der Elektronen, auch Spin genannt. Der Drehimpuls ist eine Vektorgröße die durch einen Betrag und eine Richtung gekennzeichnet ist. Der Elektronenspin kann in zwei Zuständen vorliegen, welche sich durch ihre Richtung, jedoch nicht durch ihren Betrag unterscheiden. Der Spinvektor in der Z-Achse ( $S_z$ ) eines kartesischen Koordinatensystems beträgt für den Zustand  $\alpha = \frac{1}{2} \hbar$  und für  $\beta = -\frac{1}{2} \hbar$ . Solange der Spin nicht mit seiner Umgebung interagiert, ist jede Ausrichtung in der Z-Achse möglich und die Zustände  $\alpha$  und  $\beta$  besitzen dieselbe Energie (49).

Der Elektronenspin-Drehimpuls ist mit einem magnetischen Moment in entgegengesetzter Richtung assoziiert. Die Anlage eines externen Magnetfelds  $B$  zieht aufgrund dieses magnetischen Moments eine Separation der Energieniveaus nach sich. Wenn die Ausrichtung von  $B$  mit der Z-Achse übereinstimmt kommt es unter Beachtung der Tatsache, dass  $S_z$  nur die zwei Werte  $\frac{1}{2}$  und  $-\frac{1}{2}$  einnehmen kann, zu einer Aufspaltung auf zwei Energieniveaus. Dies wird als Zeeman Effekt bezeichnet (49) (Abbildung 2).



**Abbildung 2.** Der Elektronenspin Zeeman-Effekt nach Corvaja (49). In Abwesenheit eines Magnetfelds ( $B_0 = 0$ ) ist die Energie  $E$  der Zustände  $\alpha$  und  $\beta$  identisch, was zu einer Aufhebung führt. Die Anlage eines statischen Magnetfelds ( $B_0 \neq 0$ ) führt zu einer Verlagerung von  $\alpha$  auf ein hochenergetisches und  $\beta$  auf ein niedrigenergetisches Niveau. Der Energieunterschied  $\Delta E$  ist proportional zur Feldintensität und linear abhängig vom Landé-Faktor  $g$ .  $\mu_B$  = bohrsche Magneton,  $B_0$  Feldintensität.

Es resultieren ein hoch- ( $\alpha$ ) und niedrigenergetisches ( $\beta$ ) Energieniveau, zwischen denen unter bestimmten Bedingungen ein Übergang möglich ist. Dies spiegelt sich in folgender Gleichung [Gleichung 1] wider, welche für die ESR-Spektroskopie fundamental ist:

$$h\nu = E_\alpha - E_\beta = g|\mu_B|B_0 \quad [1]$$

Hierbei entsprechen  $h$  dem planckschen Wirkungsquantum  $6.626 \times 10^{-34}$  Js,  $\nu$  der Frequenz,  $\mu_B$  dem bohrschen Magneton und  $B_0$  der magnetischen Feldintensität. Der Landé-Faktor  $g$  oder kurz  $g$ -Faktor ist eine Konstante die vom betrachteten Teilchen abhängt und für ein freies Elektron 2.002319 beträgt (49).

Wird ein oszillierendes Magnetfeld mit entsprechender Frequenz angelegt, ist ein Übergang vom höheren auf das niedrigere Energieniveau durch Emission, oder von einem niedrigeren auf ein höheres Niveau durch Absorption eines Quants  $h\nu$  möglich. Hierzu wird ein veränderliches Mikrowellenmagnetfeld  $B_1$  in rechtem Winkel zum statischen Magnetfeld  $B_0$  angelegt. Bezogen auf ein Elektron gleichen sich Emission und Absorption aus und der Nettoeffekt ist Null. Dasselbe gilt für mehrere Elektronen, welche keinem Magnetfeld ausgesetzt sind. Hier stellt sich eine gleichmäßige Verteilung aus  $\alpha$  und  $\beta$  Zuständen ein. Wird jedoch ein Magnetfeld angelegt ist die Verteilung abhängig von der Feldintensität und der Temperatur. So liegen bei Raumtemperatur und der Verwendung eines 0,3 T ESR-Spektrometers beispielsweise ein Tausendstel mehr  $\beta$ -spins vor. Dies führt unter bestimmten Resonanzbedingungen zu einem messbaren Absorptionssignal. Nach der oben genannten

Gleichung kann dies durch Veränderung der Intensität bei konstanter Frequenz des Mikrowellenfeldes, oder durch Veränderung der Frequenz bei konstanter Intensität erreicht werden. Aus technischen Gründen findet Ersteres in ESR-Spektrometern Anwendung (49).

Die Resonanzbedingungen werden zudem vom Magnetfeld benachbarter Nuclei beeinflusst, deren Spin ebenfalls zum Auftreten eines magnetischen Moments führt. Dieses Phänomen wird als hyperfine coupling bezeichnet. Je nach Art und Anzahl der mit einem ungepaarten Elektron interagierenden Kerne wird das Absorptionssignal in mehrere Linien aufgespalten. Deren Anzahl berechnet sich nach folgender Formel (49, 58) [Gleichung 2]:

$$\text{Anzahl der Linien} = 2nI + 1 \quad [2]$$

I steht hierbei für die Kernspinquantenzahl des entsprechenden Nucleus und n für deren Anzahl. I beträgt für ein  $^{14}\text{C}$ , ein  $^1\text{H}$  oder ein  $^{15}\text{N}$  Atom  $\frac{1}{2}$  und für ein  $^{14}\text{N}$  Atom 1 (49).

Eine weitere Möglichkeit, Hinweise auf die Umgebung von Elektronen zu gewinnen, sind Abweichungen des g-Wertes vom oben genannten Wert für ein freies Elektron. Durch die Spin-Orbit-Interaktion in Molekülen kommt es zu einer Abweichung von g, welche in Gleichung [1] einfließt und über Abweichungen der gemessenen Resonanzintensität bestimmt werden kann (49).

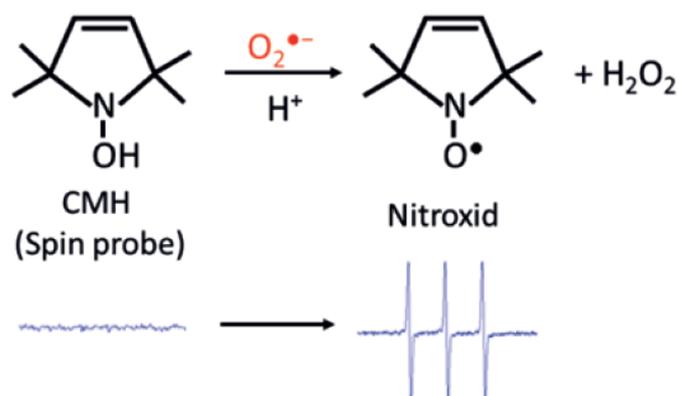
#### 3.2.2.4.2. Spin trapping and probing

Bei der Charakterisierung und insbesondere der Quantifizierung von Radikalen erweist sich deren kurze Halbwertszeit als ein kritischer, die Messung erschwerender Faktor. Die Halbwertszeit zweier Hauptvertreter der ROS ist mit unter 1 s für  $\text{O}_2^-$  und  $10^{-9}$  s für  $\text{OH}^\cdot$  zu kurz um Messungen im Zusammenhang mit biologischen Systemen zu ermöglichen (17).

Um dieses Problem zu umgehen kommen sogenannte spin traps zur Anwendung. Hierbei handelt es sich um Moleküle, die mit den kurzlebigen Radikalen zu langlebigeren Verbindungen reagieren. Die genutzten Reagenzien wurden kontinuierlich weiterentwickelt. Neben der Halbwertszeit stellt die Reaktionsgeschwindigkeit einen weiteren wichtigen Parameter dar. Haltbare Verbindungen, welche rasch aus den vorliegenden Radikalen gebildet werden ermöglichen eine Quantifizierung geringerer Mengen an Ausgangsmaterial (58).

Zu den am weitesten verbreiteten Stoffen gehören Nitron- und Nitrosoverbindungen. Die Auswahl richtet sich nach den Eigenschaften in Bezug auf die Interaktion mit bestimmten Radikalen und das zu untersuchende Medium. Die einzelnen spin traps unterscheiden sich insbesondere in der Struktur des Produkts und den daraus resultierenden g-Werten und hyperfine couplings. Dies ist für eine etwaige Identifizierung des Radikals entscheidend (58).

Eine spezielle Gruppe an Reagenzien stellen die cyclischen Hydroxylamine dar. Sie werden im Rahmen der Reaktion oxidiert und gehen keine Verbindung mit den Radikalen ein. Aus diesem Grund werden sie in Unterscheidung zu den spin traps teils als spin probes bezeichnet. Die entstandenen Produkte zeichnen sich durch eine hohe Stabilität und die Reaktion durch eine schnelle Kinetik aus. Da jedoch Reaktionen mit verschiedenen ROS möglich sind und zu einem identischen Produkt führen, sind weitere Untersuchungen notwendig um Hinweise auf die Edukte zu gewinnen. 1-Hydroxy-3-carboxy-2,2,5,-tetramethylpyrrolidinhydrochlorid (CPH) und 1-Hydroxy-3-methoxycarbonyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine (CMH) zählen zu den am häufigsten genutzten Vertretern dieser Stoffklasse (63). In der ESR-Messung ist nach Gleichung [2] bei einem beteiligtem  $^{14}\text{N}$  Atom ein Spektrum von drei Linien mit gleichem Abstand ableitbar. Dieses entspricht der ersten Ableitung der Absorptionslinie. Der doppelte Integral des Spektrums verhält sich direkt proportional zur Spinkonzentration (58).



**Abbildung 3.** Reaktion von CMH mit Superoxid unter Entstehung von Wasserstoffperoxid. Darunter das ableitbare ESR-Spektrum mit drei Linien nach Bildung des Nitroxids nach Bruker Corporation (28). CMH: 1-Hydroxy-3-methoxycarbonyl - 2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine;  $\text{H}_2\text{O}_2$ : Wasserstoffperoxid;  $\text{O}_2^{\bullet-}$ : Superoxidationion;  $\text{H}^+$ : Proton.

### 3.2.2.4.3. Versuchsdurchführung

Zunächst wurde eine Chelatorenlösung auf Basis eines Krebs-HEPES-Puffers hergestellt. Diese enthielt DETC in  $5\ \mu\text{M}$  und Deferoxamin in  $25\ \mu\text{M}$  Konzentration. Der Puffer wurde vor jeder Anwendung auf das Vorliegen eines pH von 7,4 geprüft und wenn nötig mit Salzsäure oder Natriumhydroxid eingestellt. Es folgte eine 20-minütige Begasung mit Stickstoff. Zeitgleich wurde eine Lösung der spin trap CMH in  $600\ \mu\text{M}$  Konzentration in der Chelatorenlösung angesetzt. Die entnommenen Gewebeproben wurden mittels Skalpell in einem 6 cm Dish auf einer Kälteplatte in kleine Würfel bzw. Ringe zerteilt. Etwa 4 - 5 Gewebestücke bzw. Ringe wurden in einer 12-Well Platte mit  $400\ \mu\text{l}$  der entgasten Chelatorenlösung auf Eis inkubiert. Es folgte die Zugabe von  $200\ \mu\text{l}$  CMH-Lösung (Endkonzentration  $200\ \mu\text{M}$  CMH) und eine

Inkubation bei 37 °C im Wärmeschrank für eine Stunde. Danach wurde die Reaktion auf Eis gestoppt. Je 50 µL der inkubierten Lösung wurden anschließend in eine Kapillare überführt und zur Messung in das ESR-Spektroskop eingebracht. Die Messung erfolgte mit folgenden Einstellungen: Center field 3484,5 G, microwave power 18,11 mW, modulation amplitude 2,3 G, sweep time 5,24 s, field sweep 16 G. Die Ergebnisse wurden auf das Trockengewicht der Proben normalisiert.

### **3.2.3. Software und Statistik**

#### **3.2.3.1. Statistische Analyse und Graphische Darstellung**

Die Fallzahlenanalyse und die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software SigmaPlot (Version 9.0; Systat Software Erkrath, Germany). Die zugrunde liegenden Gruppengrößen bezieht sich auf Daten unserer Arbeitsgruppe zur Letalität von C3H / HeN Mäuse in der Sepsis nach Melatonintherapie (77). Aufgrund sehr feiner Unterschiede musste biomathematisch von einer Gruppengröße  $n = 10$  für die Sepsisgruppe und  $n = 8$  für die scheinoperierte Tiere ausgegangen werden, um eine Power von 0,8 und einen  $\alpha$ -Fehler von 0,05 zu erreichen.

Zur statistischen Auswertung erfolgten die Normalisierung und Kalibrierung auf die unbehandelten Kontrollgruppen (Sh-V). Zudem wurden die phosphorylierte Form von ERK1/2 und die gespaltene Form der Caspase 3 gegen deren jeweiliges Gesamtprotein normalisiert. Zunächst erfolgte die Überprüfung der Messwerte auf Normalverteilung durch den Shapiro-Wilk-Test. Wurde diese bestätigt schloss sich eine einfaktorielles Varianzanalyse (ANOVA) mit nachfolgender post-hoc-Analyse nach Holm-Sidak an. Lag keine Normalverteilung vor, wurden Gruppenunterschiede durch eine zweistufige Abfolge nichtparametrischer Testverfahren eruiert. Als erste Stufe wurde mittels einer nichtparametrischen Einweg-Varianzanalyse (one-way ANOVA on ranks, Kruskal-Wallis-Test) festgestellt, ob signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen nachweisbar sind. P-Werte  $< 0,05$  wurden hier als statistisch signifikant definiert. In der zweiten Stufe wurde durch post-hoc-Testung nach signifikanten Unterschieden in den Gruppenmittelwerten gesucht. Im Falle gleicher Gruppengrößen wurde Fisher's Least-Significant-Difference (LSD)-Test angewandt. Unterschied sich die Größe erfolgte ein nichtparametrischer Test für Mehrfach-Vergleiche (Multiple-Comparisons-Test) nach Dunn. Die graphische Darstellung erfolgte als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (MW  $\pm$  SE).

### **3.2.3.2.            Verwendete Software**

Diese Dissertation wurde mit Microsoft Office Word 2016 (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA) verfasst. Zur Erstellung der Grafiken wurde Microsoft PowerPoint 2016 (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA) verwendet.

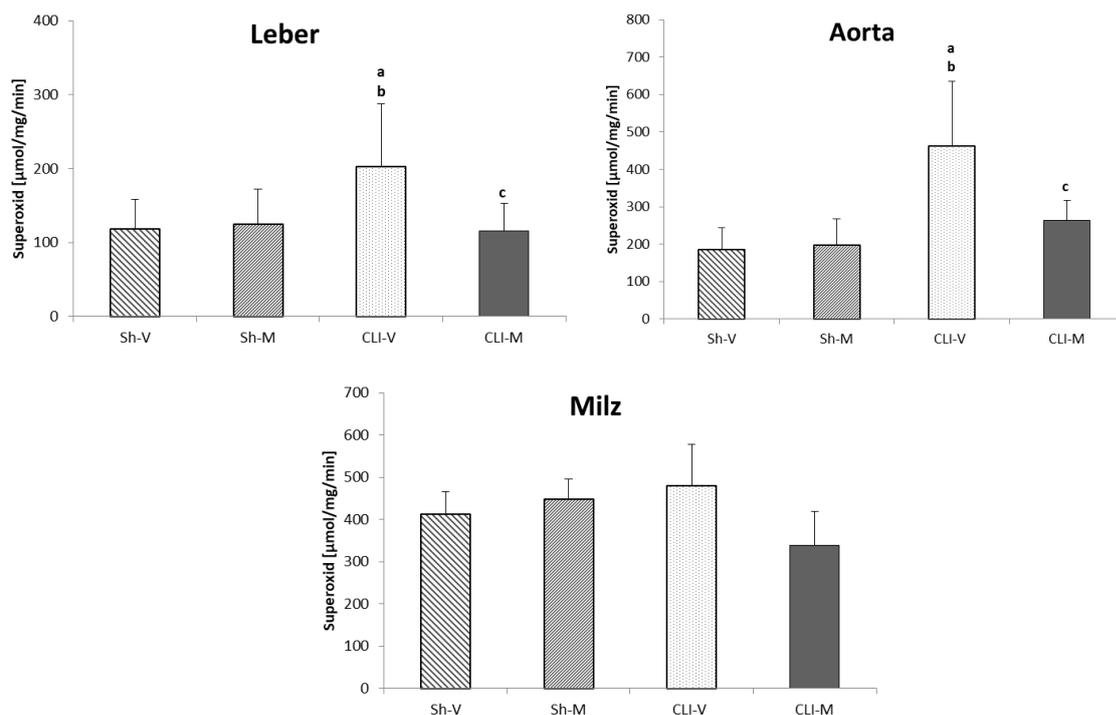
Die Primer wurden anhand der in der Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) hinterlegten Sequenzen mit der Software Clone Manager Suite 7 (Sci-Ed Software, Cary, North Carolina, USA) gestaltet. RT-qPCR-Rohdaten, Cq-Werte und Schmelzpunkte wurden mittels des Softwarepakets Bio-Rad CFX Manager Version 1.6.541.1028 (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Kalifornien, USA) erhoben. Die quantitative Bildanalyse der Bandenintensitäten im Western Blot wurde mittels des Kern-Analyse-Tool TotalLab Quant Version, 11 (TotalLab Ltd., Newcastle, UK) durchgeführt. Die ESR-Spektren wurden mit der Software WinEPR, Version 2.11 (Bruker Corporation, Billerica, Massachusetts, USA) aufgezeichnet und ausgewertet.

Auswertungen und statistischen Analysen erfolgten mit den Programmen SigmaPlot für Windows mit SigmaStat-Integration, Version 9.0 (Systat Software, Inc., Chicago, USA) und Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA).

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Superoxidgehalt der untersuchten Organe

Die Mäuse bei denen eine Scheinoperation durchgeführt wurde wiesen unabhängig von Therapie in Leber und Aorta konstant niedrige ROS-Konzentrationen auf. Im Milzgewebe lagen bereits hier 2- bis 4-fach höhere Konzentrationen vor. Die Gabe von Melatonin führte in scheinoperierten Tieren zu keiner signifikanten Änderung des Superoxidspiegels. Nach CLI kam es zu einer Verdopplung des Gehalts in Leber und Aorta. In der Milz führte eine CLI-Sepsis zu keinen signifikanten Veränderungen. In Leber und Aorta konnten die Werte während der Sepsis durch Verabreichung von Melatonin auf das Niveau der sham-operierten Tiere gesenkt werden. Melatonin verursachte im Milzgewebe septischer Mäuse keine signifikante Reduktion an Superoxid.



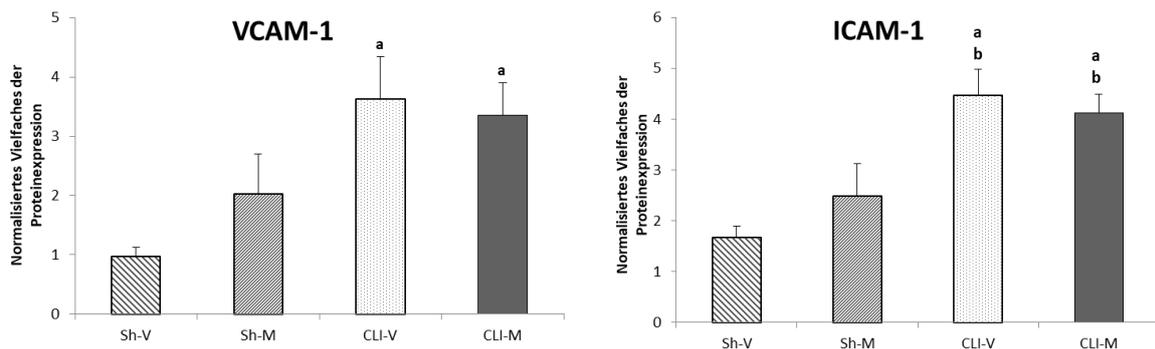
**Abbildung 4.** Superoxid in Aorta, Leber- und Milzgewebe durch Elektronenspinresonanz-Spektroskopie gemessen. Dargestellt als MW±SE (n=8 für sham, n=10 für CLI). Signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) sind wie folgt gekennzeichnet: (a) vs. Sh-V, (b) vs. Sh-M, und (c) vs. CLI-V. CLI: Coecum Ligatur und Inzision, MW: Mittelwert, SE: Standardfehler, Sh-M: Scheinoperation + Melatoninlösung, Sh-V: Scheinoperation + Vehikellösung, CLI-M: CLI + Melatoninlösung, CLI-V: CLI + Vehikellösung.

## 4.2. Westernblot-Analysen

### 4.2.1. Expression von VCAM-1 und ICAM-1

In den scheinoperierten Tieren führte eine Melatoninapplikation nicht zu signifikanten Unterschieden im VCAM-1 Proteingehalt. Die Expression von VCAM-1 im Lebergewebe lag in septischen Mäusen auf signifikant höherem Niveau verglichen mit scheinoperierten, mit Vehikel behandelten Tieren. Die Gabe von Melatonin zog innerhalb CLI Gruppen keine signifikanten Veränderungen nach sich.

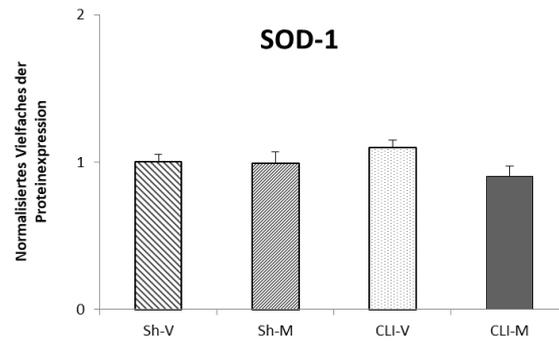
Melatonin verursachte auch für ICAM-1 in scheinoperierten Tieren keinen signifikanten Unterschieden im Proteingehalt. Bezogen auf beide scheinoperierte Gruppen wurde die Expression von ICAM-1 durch Sepsis signifikant erhöht. Eine Melatonintherapie führte in septischen Tieren nicht zu signifikanten Veränderungen der ICAM-1 Expression auf Proteinebene.



**Abbildung 5.** Proteinexpression von VCAM-1 und ICAM-1 im Lebergewebe. Dargestellt als  $MW \pm SE$  ( $n=8$  für sham,  $n=10$  für CLI). Signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) sind wie folgt gekennzeichnet: (a) vs. Sh-V, (b) vs. Sh-M. VCAM-1: Vaskuläres Zelladhäsionsmolekül-1, ICAM-1: Intrazelluläres Adhäsionsmolekül-1, CLI: Coecum Ligatur und Inzision, MW: Mittelwert, SE: Standardfehler, Sh-M: Scheinoperation + Melatoninlösung, Sh-V: Scheinoperation + Vehikellösung, CLI-M: CLI + Melatoninlösung, CLI-V: CLI + Vehikellösung.

### 4.2.2. Expression der SOD-1

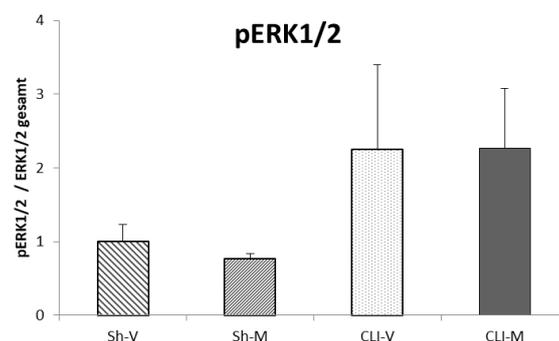
Die Analyse von SOD-1 zeigte keinen signifikanten Unterschied der SOD-Expression im Lebergewebe zwischen den scheinoperierten und CLI Gruppen. Die Melatonintherapie hatte weder in sham-operierten noch in septischen Tieren Auswirkungen auf die Expression von SOD-1.



**Abbildung 6.** Proteinexpression von SOD-1 im Lebergewebe. Dargestellt als  $MW \pm SE$  ( $n=8$  für sham,  $n=10$  für CLI). Signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) traten nicht auf. SOD-1: Superoxiddismutase-1 CLI: Coecum Ligatur und Inzision, MW: Mittelwert, SE: Standardfehler, Sh-M: Scheinoperation + Melatoninlösung, Sh-V: Scheinoperation + Vehikellösung, CLI-M: CLI + Melatoninlösung, CLI-V: CLI + Vehikellösung.

#### 4.2.3. Expression von ERK1/2 und Phosphorylierung

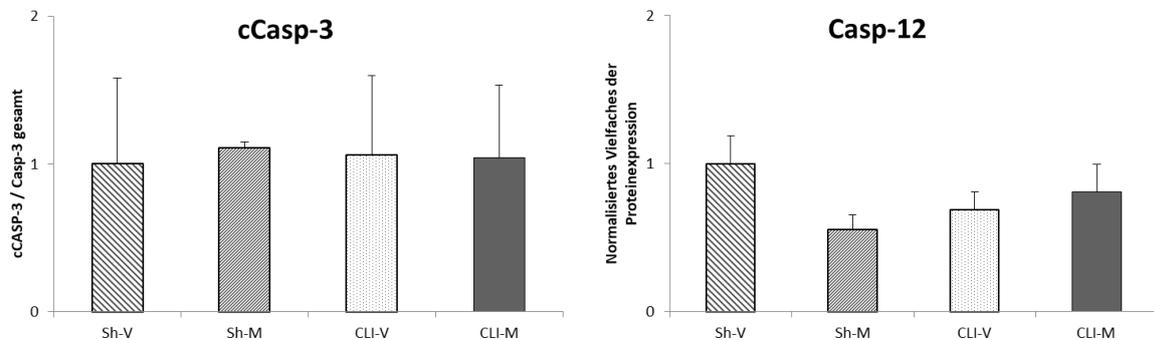
Die Menge an pERK1/2 in den Lebern der Mäuse wurde bestimmt und gegen das Gesamtvorkommen von ERK1/2 in den entsprechenden Proben normalisiert. Der Anteil an phosphoryliertem Protein im Verhältnis zum Gesamtprotein war nicht signifikant unterschiedlich zwischen den verschiedenen Gruppen. Es zeigte sich ein nicht-signifikanter Trend für einen höheren Anteil an pERK1/2 nach Induktion der CLI-Sepsis. In den CLI Gruppen zeigt sich eine breite Streuung der Werte, mit einer SD von 2,29 bei einem Mittelwert von 2,25 für CLI-V bzw. einer SD von 1,62 bei einem Mittelwert von 2,27 für CLI-M. Die Gabe von Melatonin führte weder innerhalb der CLI- noch der scheinoperierten Gruppe zu einem signifikanten Unterschied.



**Abbildung 7.** Phosphorylierung von ERK1/2 normalisiert auf ERK1/2 Gesamtprotein im Lebergewebe. Dargestellt als  $MW \pm SE$  ( $n=8$  für sham,  $n=10$  für CLI). Signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) traten nicht auf. ERK1/2: extracellular signal-regulated kinase 1/2, pERK1/2: phosphorylated extracellular signal-regulated kinase 1/2, CLI: Coecum Ligatur und Inzision, MW: Mittelwert, SE: Standardfehler, Sh-M: Scheinoperation + Melatoninlösung, Sh-V: Scheinoperation + Vehikellösung, CLI-M: CLI + Melatoninlösung, CLI-V: CLI + Vehikellösung.

#### 4.2.4. Expression von gespaltener Caspase-3 und Caspase-12

Der Gehalt an gespaltener (aktivierter) Caspase-3 normalisiert auf Caspase-3 Gesamtprotein und an Caspase-12 Gesamtprotein im Lebergewebe wurde mittels Western-Blot-Analyse untersucht. Hier zeigte sich ein konstanter, niedriger Wert für gespaltene Caspase-3, deren Expression gegen den Gesamtproteingehalt an Caspase-3 normalisiert wurde. Weder die Verabreichung von Melatonin noch die Durchführung einer CLI-Sepsis führten zu signifikanten Veränderungen des Proteinvorkommens an gespaltener Caspase-3 oder von Caspase-12 Gesamtprotein.



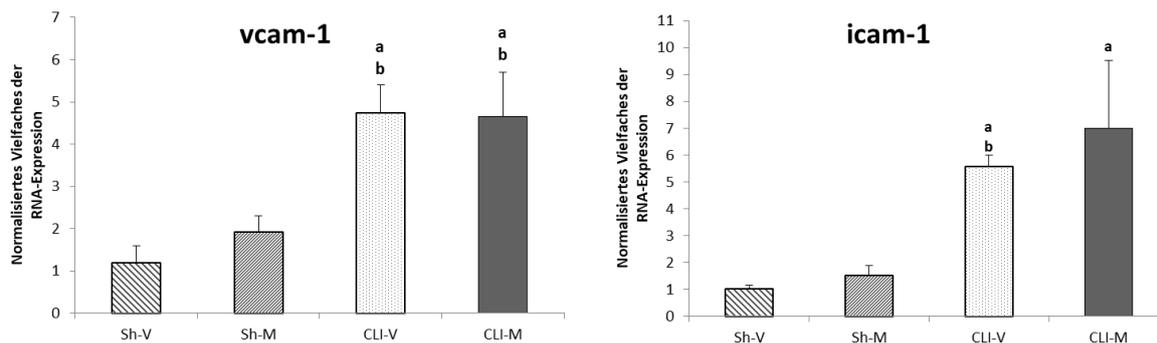
**Abbildung 8.** Gespaltene Caspase-3 normalisiert auf Caspase-3 Gesamtprotein und Caspase-12 Gesamtprotein im Lebergewebe. Dargestellt als  $MW \pm SE$  ( $n=8$  für sham,  $n=10$  für CLI). Signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) traten nicht auf. cCasp-3: Gespaltene Caspase-3, Casp-12: Caspase-12, CLI: Coecum Ligatur und Inzision, MW: Mittelwert, SE: Standardfehler, Sh-M: Scheinoperation + Melatoninlösung, Sh-V: Scheinoperation + Vehikellösung, CLI-M: CLI + Melatoninlösung, CLI-V: CLI + Vehikellösung.

### 4.3. Genexpressionsanalyse

#### 4.3.1. Expressionsanalyse von vcam-1 und icam-1

Nach Scheinoperation kam es durch die Verabreichung von Melatonin nicht zu signifikanten Unterschieden der Expression von vcam-1 im Lebergewebe. Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg in den CLI Gruppen bezogen auf beide sham-Gruppen. Die Therapie mit Melatonin nach CLI verursachte keine signifikante Veränderung der vcam-1 Expression.

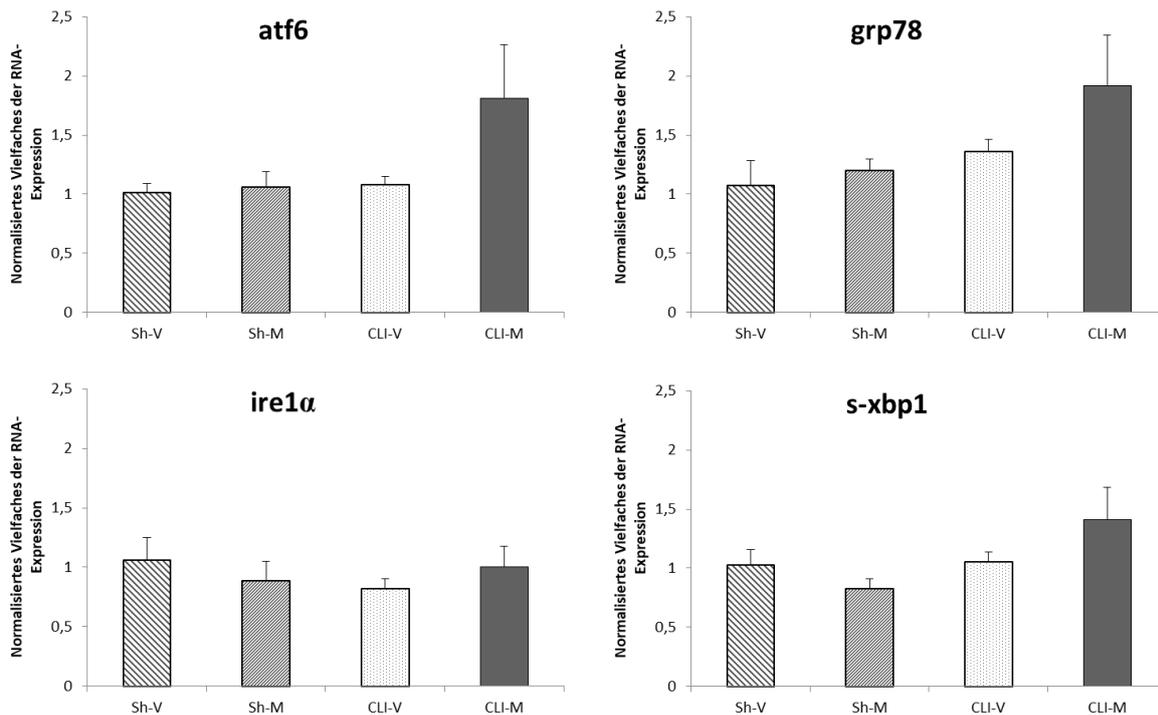
Die Applikation von Melatonin ging in scheinoperierten Tieren nicht mit signifikanten Veränderungen an icam-1 einher. Die Expression von icam-1 zeigte einen Anstieg nach Induktion einer CLI-Sepsis, der in beiden Gruppen bezogen auf Sh-V signifikant war. Der Anstieg an icam-1 in der CLI-M Gruppe war bei breiter Streuung mit einer SD von 6,19 in Bezug auf Sh-M nicht signifikant. Eine Melatonintherapie führte in septischen Tieren nicht zu signifikanten Veränderungen an icam-1 RNA.



**Abbildung 9.** RNA-Expression von vcam-1 und icam-1 im Lebergewebe. Dargestellt als MW±SE (n=8 für sham, n=10 für CLI). Signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) sind wie folgt gekennzeichnet: (a) vs. Sh-V, (b) vs. Sh-M. vcam-1: Vaskuläres Zelladhäsionsmolekül-1, icam-1: Intrazelluläres Adhäsionsmolekül-1, CLI: Coecum Ligatur und Inzision, MW: Mittelwert, SE: Standardfehler, Sh-M: Scheinoperation + Melatoninlösung, Sh-V: Scheinoperation + Vehikellösung, CLI-M: CLI + Melatoninlösung, CLI-V: CLI + Vehikellösung.

### 4.3.2. Expressionsanalysen von *atf6*, *ire1 $\alpha$* , *s-xbp1* und *grp78*

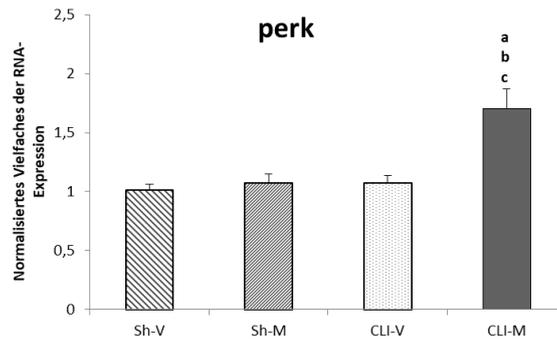
Die Expression der an der Unfolded Protein Response beteiligten Gene *atf6*, *ire1 $\alpha$* , *s-xbp1* und *grp78* in der Leber zeigte sich zwischen den Sham Gruppen unbeeinflusst. Auch die Induktion einer Sepsis zog keine signifikante Veränderung nach sich. Tendenziell erhöhte Werte für *atf6*, *s-xbp1* und *grp78* in den CLI-M Gruppen wiesen eine breite Streuung auf, sodass die Unterschiede bezogen auf die anderen Gruppen keine Signifikanz aufwiesen.



**Abbildung 10.** Einfluss von Melatonin auf die Genexpression UPR-assoziiierter Gene im Lebergewebe. Dargestellt als  $MW \pm SE$  ( $n=8$  für sham,  $n=10$  für CLI). Signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) traten nicht auf. *Atf6*: activating transcription factor 6, *grp78*: 78 kDa glucose-regulated protein, *ire1 $\alpha$* : irinositol-requiring enzyme 1  $\alpha$ , *s-xbp1*: spliced X-box binding protein 1, CLI: Coecum Ligatur und Inzision, MW: Mittelwert, SE: Standardfehler, Sh-M: Scheinoperation + Melatoninlösung, Sh-V: Scheinoperation + Vehikellösung, CLI-M: CLI + Melatoninlösung, CLI-V: CLI + Vehikellösung.

### 4.3.3. Expressionsanalyse von *perk*

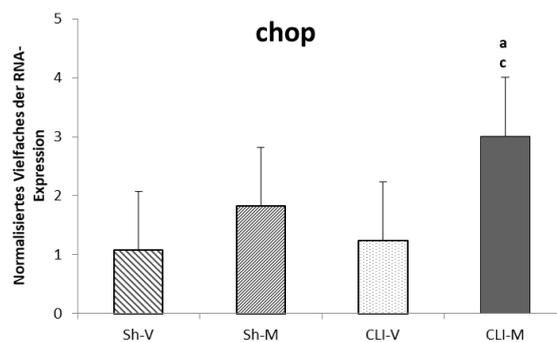
Die Behandlung von sham-operierten Tieren mit Melatonin oder eine CLI ohne Melatonin führten zu keinen signifikanten Veränderungen im Vergleich zur Kontrollgruppe Sh-V. Die Verabreichung von Melatonin führte bei septischen Tieren zu einer signifikanten Erhöhung von *perk* in Bezug auf alle weiteren Gruppen. In Mäusen der CLI-M Gruppe konnte eine siebzigprozentige RNA-Erhöhung nachgewiesen werden.



**Abbildung 11.** RNA-Expression von perk im Lebergewebe. Dargestellt als  $MW \pm SE$  ( $n=8$  für sham,  $n=10$  für CLI). Signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) sind wie folgt gekennzeichnet: (a) vs. Sh-V, (b) vs. Sh-M, (c) vs. CLI-V. perk: protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase, CLI: Coecum Ligatur und Inzision, MW: Mittelwert, SE: Standardfehler, Sh-M: Scheinoperation + Melatoninlösung, Sh-V: Scheinoperation + Vehikellösung, CLI-M: CLI + Melatoninlösung, CLI-V: CLI + Vehikellösung.

#### 4.3.4. Expressionsanalyse von chop

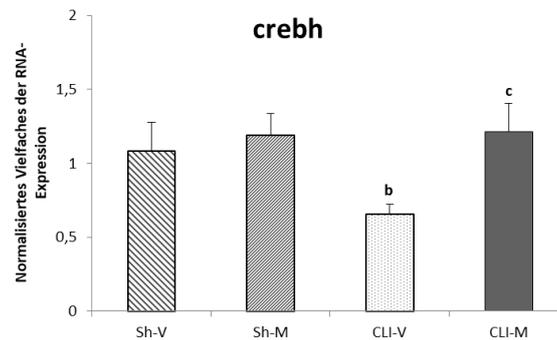
In der Sh-M Gruppe deutete sich eine Erhöhung bezogen auf die mit Vehikellösung behandelten Gruppen an, diese war jedoch nicht signifikant. Eine CLI ohne Melatoningabe führte nicht zu signifikanten Veränderungen im Vergleich zur Kontrollgruppe Sh-V. Melatonin führte nach CLI-Sepsis zu einer annähernden Verdreifachung der Expression von chop im Vergleich zur Behandlung mit Vehikellösung.



**Abbildung 12.** RNA-Expression von chop im Lebergewebe. Dargestellt als  $MW \pm SE$  ( $n=8$  für sham,  $n=10$  für CLI). Signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) sind wie folgt gekennzeichnet: (a) vs. Sh-V, (c) vs. CLI-V. chop: CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) homologous protein, CLI: Coecum Ligatur und Inzision, MW: Mittelwert, SE: Standardfehler, Sh-M: Scheinoperation + Melatoninlösung, Sh-V: Scheinoperation + Vehikellösung, CLI-M: CLI + Melatoninlösung, CLI-V: CLI + Vehikellösung.

#### 4.3.5. Expressionsanalyse von crebh

In scheinoperierten Tieren führte Melatonin zu keinen signifikanten Veränderungen der crebh RNA. Eine CLI-Sepsis mit Gabe von Vehikel zog eine Reduktion des hepatischen RNA-Gehalts von crebh nach sich. Die RNA-Expression war signifikant niedriger als in der Sh-M Gruppe. Bezogen auf die Kontrollgruppe Sh-V erreicht der Abfall das Signifikanzniveau nicht. Eine Therapie mit Melatonin führte zu einem signifikanten Anstieg des crebh-RNA Gehalts zwischen den CLI Gruppen.



**Abbildung 13.** RNA-Expression von chop im Lebergewebe. Dargestellt als  $MW \pm SE$  ( $n=8$  für sham,  $n=10$  für CLI). Signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) sind wie folgt gekennzeichnet: (b) vs. Sh-M, (c) vs. CLI-V. crebh: Cyclic-adenosine-monophosphate-responsive-element binding protein H, CLI: Coecum Ligatur und Inzision, MW: Mittelwert, SE: Standardfehler, Sh-M: Scheinoperation + Melatoninlösung, Sh-V: Scheinoperation + Vehikellösung, CLI-M: CLI + Melatoninlösung, CLI-V: CLI + Vehikellösung.

## 5. Diskussion

Die Ergebnisse belegen einen positiven Effekt von Melatonin auf das Redoxgleichgewicht in der murinen Sepsis mit Reduktion der ROS-Konzentration in Leber und Aorta. In der Milz konnte dieser Effekt bei bereits erhöhten Basalspiegeln nicht beobachtet werden.

Die Expression der untersuchten Adhäsionsmoleküle in der Leber zeigte zwar wie die ROS-Konzentration einen Anstieg nach CLI, eine gleichgerichtete Veränderung nach Verabreichung von Melatonin trat jedoch nicht auf. Die Proteinexpression der Superoxiddismutase blieb unbeeinflusst.

Die CLI übte keinen Einfluss auf die Expression der betrachteten zentralen Bestandteile der Unfolded Protein Response in der Leber aus. Jedoch führte Melatonin in der Sepsis zu einem signifikanten Anstieg der mRNA von perk und dem in dessen Signalweg nachgeschalteten chop.

Nach erster Interpretation der Ergebnisse ergeben sich keine offensichtlichen Zusammenhänge zwischen dem positiven Effekt von Melatonin auf oxidativen Stress, den Effektoren der zellulären Stressantwort und der UPR. Durch detaillierte Recherche der zu diesen Themen vorliegenden Literatur lassen sich dennoch einige der gefundenen Zusammenhänge erklären.

### 5.1. Wertung der Methodik

#### 5.1.1. Tiermodell

Um den Effekt von Melatonin in der Sepsis beurteilen zu können, wurde für diese Untersuchung das Modell der polymikrobiellen CLI-Sepsis gewählt, welches die untersuchten Zusammenhänge in Bezug auf die humane Pathophysiologie möglichst gut wiedergibt. Der Versuch die komplexe Pathophysiologie auf experimentell reproduzierbare Weise zu vereinfachen hat eine Vielzahl von Modellen hervorgebracht, deren Nutzen und Übertragbarkeit weiterhin Thema intensiver Diskussion sind (67, 134). In vitro Sepsis-Modelle sind nur ungenügend geeignet das Zusammenspiel dieses systemischen Krankheitsbildes adäquat wiederzugeben und bleiben bestimmten Fragestellungen vorbehalten (136). In vivo wird aufgrund des großen Erfahrungsschatzes und der einfachen Durchführbarkeit meist auf Nagetiere und insbesondere Mäuse zurückgegriffen. Ein in diesem Zusammenhang häufig genannter Kritikpunkt ist die mangelnde Suszeptibilität von Mäusen gegenüber Endotoxin, welches in der Praxis häufig mit Lipopolysaccharid gleichgesetzt wird. Diese ist im Vergleich

zu Menschen um mehr als das 1000-fache erniedrigt, wobei große Unterschiede zwischen einzelnen Stämmen bestehen, von denen manche als resistent eingestuft werden (75). Der in unserer Arbeit verwendete Stamm C3H / HeN ist generell als sensibel anzusehen (110).

Mangelnde Vergleichbarkeit zum Krankheitsbild der Sepsis stellt einen der Hauptkritikpunkte von Modellen dar, welche ein Sepsis-ähnliches Bild durch die Injektion von LPS oder intakten Bakterien verursachen. Diese vereinfachte und standardisierte Herangehensweise bringt zwar den Vorteil einer hohen Reproduzierbarkeit mit sich, es konnte jedoch wiederholt gezeigt werden, dass sich die ablaufenden Prozesse deutlich von denen der Sepsis unterscheiden (67). Das meist als Bolus verabreichte LPS führt zu einer raschen und massiv ausgeprägten Inflammation. Das Zytokinprofil unterscheidet sich jedoch deutlich von dem der humanen Sepsis oder auch anderer experimentellen Modelle der polymikrobiellen Sepsis (195). Ähnliches trifft häufig auch bei der Applikation von intakten Bakterien zu, da diese meist sehr schnell eliminiert werden, wobei es, je nach Bakterium, ebenfalls zur Freisetzung von Bestandteilen wie LPS kommt (50). In alternativen Modellen soll ein lokalisierter Fokus zu einer kontinuierlichen Exposition mit dem Pathogen führen und so dem tatsächlichen Krankheitsverlauf einer humanen Sepsis näherkommen. Bei der kontrollierten Inokulation (CI) geschieht dies durch die Injektion einer Erregerkombinationen unter Beimengung von Matrix wie Fibrin, Galle oder sterilem Faeces beispielsweise in das Peritoneum (81). Die Zusammensetzung der Darmflora und weitere Einflussfaktoren können so jedoch nur eingeschränkt reproduziert werden (31). Verschiedene Perforationsmodelle spiegeln die Veränderungen während einer humanen Sepsis am besten wider, unter denen die coecale Ligatur und Punktion (CLP) am weitesten verbreitet ist und häufig als Goldstandard bezeichnet wird (230). Als Kritikpunkte werden bei der CLP immer wieder der langsame Krankheitsverlauf (65, 189) und die Abhängigkeit des Verlaufs von der Punktionsgröße und -häufigkeit (167) angeführt. Es konnte gezeigt werden, dass es bei der CLP zur Bildung von Abszessen mit eher niedriger entzündlicher Aktivität kommt (146). Ein Ansatz der dieses Problem aufgreift ist der des Colon ascendens Stents (CASP) (214). Hier wird eine kontinuierliche Leckage durch das Einsetzen eines Stents in die Darmwand gewährleistet. Durch unterschiedliche Durchmesser kann die Ausprägung der resultierenden diffusen Peritonitis besser gesteuert werden (146).

Die in dieser Arbeit angewendete Coecum Ligatur und Inzision (CLI) stellt eine direkte Abwandlung der CLP dar und beabsichtigt neben der Vermeidung der oben genannten Kritikpunkte die Induktion eines fulminanteren Krankheitsbildes mit akutem Beginn und hoher Mortalität (194).

Die zum Zeitpunkt der Etablierung des Modells gültige Sepsisdefinition berücksichtigte die SIRS-Kriterien deren Verifizierung im Rahmen der vorliegenden Versuche nicht möglich war, da die Körpertemperatur von uns konstant gehalten wurde und sich die Narkoseführung u.a. am Blutdruckverhalten orientierte. Scheiermann et al. zeigten jedoch, dass sich die zeitliche Entwicklung von mittlerem arteriellen Druck, Basenüberschuss und pH sowie die Mortalität in einem ähnlichen Rahmen bewegen, wie bei der Sepsis mit Organdysfunktion (194). Somit entspricht der beobachtete Verlauf den aktuell gültigen SEPSIS-3 Kriterien deren zentraler Punkt das Vorliegen einer durch Infekt verursachten Organdysfunktion ist (203). Um hormonelle Einflüsse so gering wie möglich zu halten wurden ausschließlich männliche Mäuse verwendet. Es wurde in der Vergangenheit gezeigt, dass das Geschlecht Einfluss auf den Verlauf von Infektionskrankheiten nimmt. Dies wurde unter anderem auf einen protektiven Effekt von Östrogen zurückgeführt. Erhöhte Östrogenspiegel und Östrogenrezeptoragonisten zeigten experimentell positive Effekte auf Signalkaskaden und das Outcome in Modellen einer systemischen Inflammation und Infektion (10).

Zusammenfassend ist die CLI für die vorliegende Fragestellung gut geeignet, da der Krankheitsverlauf fulminanter als bei CLP oder CASP ist. Außerdem ist, durch die resultierende polymikrobielle Sepsis, eine bessere Vergleichbarkeit zum klinischen Bild als bei der Anwendung einer Inflammation mit LPS gewährleistet.

Unserer Arbeitsgruppe war es bereits möglich unterschiedliche Sachverhalte anhand der CLI zu beleuchten. Hervorzuheben ist hier eine Vorstudie, welche als Grundlage für diese Arbeit diente und eine dosisabhängige Lebensverlängerung durch exogene Melatoninapplikation in septischen Ratten zeigte (77). Durch die Untersuchung von Knock-out Mäusen zeigten wir eine erhöhte proinflammatorische Aktivität in Melatoninrezeptor-defizienten Milzzellen, wobei die Milzzellen von Mäusen gewonnen wurden, bei denen eine CLI induziert wurde (114). Weitere Daten zeigen ein verlängertes Überleben nach einer Dobutaminbehandlung vor CLI-Sepsis, sowie eine verbesserte Leberfunktion und Mikrozirkulation in der Leber von Ratten (76). Weiter ist die CLI zwischenzeitlich ein etabliertes Modell zur Analyse flüchtiger organische Verbindungen durch Ionenmobilitätsspektrometrie während der Sepsis und Inflammation in der Ausatemluft der Ratte (78).

### **5.1.2. Melatoninkonzentration und Art der Applikation**

In Studien zum hepatoprotektiven Effekt von Melatonin fand ein breiter Dosisbereich Anwendung. Bei Sichtung der vorliegenden Literatur umfasst dieser Dosierungen zwischen 0,1 und 100 mg / kg / KG. Als Applikationswege wurden die orale, subkutane, intraperitoneale und

intravenöse Zufuhr genutzt. Der Applikationsweg wirkt sich stark auf die Bioverfügbarkeit von Melatonin aus. Dieser variiert insbesondere bei oraler Gabe deutlich. Fourtillan et al. beschrieben diese im Menschen als 1 – 37 % nach Einnahme von 250 µg gelöstem Melatonins mit großen Unterschieden zwischen Individuen und Geschlechtern (79). Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen Andersen et al. mit einer absoluten Bioverfügbarkeit von 3 % beim Menschen nach oraler Gabe von 10 mg Melatonin mit ebenfalls großen interindividuellen Unterschieden (7). Ein hoher First-Pass-Effekt gilt als verantwortlich für die niedrige Verfügbarkeit nach oraler Zufuhr von Melatonin (61). Eine genaue Ursache für die Abweichungen zwischen Individuen ist jedoch bisher nicht bekannt (7). Um eine Beeinflussung der Ergebnisse durch diese potentiellen Störfaktoren zu vermeiden wählten wir den intravenösen Applikationsweg. Die gewählte Dosis von 1 mg / kg / KG wurde von uns im Rahmen einer Dosisfindungsstudie etabliert. Ein Dosisbereich von 1 - 10 mg / kg / KG führt bei Ratten mit CLI-Sepsis zu einer maximalen Lebensverlängerung. Hierbei zeigte die Steigerung von 1 auf 10 mg / kg / KG keine signifikante Verlängerung der Überlebenszeit (77, 79). Maestroni et al. beschrieben bei subkutaner Verabreichung in einem Endotoxinmodell an der Maus denselben Konzentrationsbereich, wobei der größte Effekt bei 5mg / kg / KG beschrieben wurde (145). In der vorliegenden Arbeit erfolgt die Gabe von Melatonin als einmaliger intravenöser Bolus. Da in pharmakokinetischen Studien eine Halbwertszeit zwischen 28 und 60 Minuten wiederholt bestätigt wurde (7, 79), entschieden sich andere Autoren für eine repetitive Verabreichung. So konnten Wu et al. zeigen, dass intravenös appliziertes Melatonin in einer Dosis von 3 mg / kg / KG nach Induktion einer CLP zu einer niedrigeren Letalität und vermindertem oxidativen Stress gemessen als NO und O<sub>2</sub><sup>-</sup> in der Aorta im Vergleich zur Kontrollgruppe führt. Melatonin wurde hier 3, 6 und 12 Stunden nach CLP injiziert (233).

Die meisten pharmakokinetischen Studien vernachlässigen den Hauptmetabolit 6-Hydroxymelatonin. Dessen sulfatierte Form konnte im Serum gesunder Probanden für mehr als 6 Stunden in hoher Konzentration nachgewiesen werden (85). Ex vivo konnte gezeigt werden, dass Hydroxymelatonin und andere strukturell verwandte Indolamine unter Sepsis-ähnlichen Bedingungen, wie Melatonin, zu einer Reduktion von NF-κB, IL-6 und IL-8 führen (138). Erhöhte Werte dieser Zytokine werden mit erhöhter Mortalität in septischen Patienten in Verbindung gebracht (125, 152). Zudem wurde 6-Hydroxymelatonin als Antioxidans gegenüber Melatonin als überlegen beschrieben (6).

Die auf Basis der genannten Überlegungen gewählte Kombination einer CLI-Sepsis bei der Maus und der Behandlung mit einer einmaligen intravenösen Gabe von 1 mg / kg / KG

Melatonin konnte bereits in vorangegangenen Studien erfolgreich angewendet werden, sodass der Versuchsaufbau für die vorliegende Fragestellung beibehalten wurde (77).

### 5.1.3. Genexpressionsanalyse mittels RT-qPCR

Die Expressionsanalyse der RNA mittels RT-qPCR ermöglicht den hochspezifischen und sensitiven Nachweis bereits weniger RNA-Kopien in einer Probe und damit eine absolute wie auch relative Quantifizierung (101). Trotz vieler positiver Eigenschaften und der weiten Verbreitung der Technik weist die RT-qPCR eine Vielzahl von Fallstricken auf, zu deren Überwindung die Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments(MIQE)-Leitlinien definiert wurden (32). In diesen werden als potentielle Fehlerquelle u.a. die Bereiche RNA-Qualitätskontrolle, Normalisierung und die Anwendung adäquater statistischer Methoden genannt. Zur Qualitätskontrolle erfolgte wie gefordert, neben der Bestimmung der A260/A280-Ratio, eine gelelektrophoretische Auftrennung der RNA. Die Berechnung der Expressionsunterschiede erfolgte anhand der  $\Delta\Delta Cq$ -Methode nach Livak und Schmittgen (137). Hierbei wird im ersten Schritt die Differenz aus den cycle quantification (Cq)-Werten des Zielgenes und von Referenzgenen bestimmt. Der Cq-Wert gibt den PCR-Zyklus an in dem eine je nach Methode unterschiedlich gesetzte Schwelle überschritten wird. Die Leitlinie identifiziert die Verwendung singulärer Referenzgene und deren unkritische Auswahl als wichtige Fehlerquelle (32). In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Referenzgene, Ribosomales Protein S16 (*rps16*) und Succinatdehydrogenase Untereinheit A (*sdha*), verwendet. In einer Überprüfung von Referenzgenen, welche häufig in Hepatotoxizitätsmodellen der Ratte verwendet werden, konnte gezeigt werden, dass die Succinatdehydrogenase Untereinheit A zu den Genen mit der stabilsten Expression zählt. Zudem wurde eine Kombination von zwei Referenzen als ideal erachtet, ohne entscheidenden Zusatznutzen bei weiterer Erhöhung der Anzahl (124). Zur Auswertung der gewonnenen Fluoreszenzkurven wurde die Cy0-Methode nach Guescini et al. verwendet (96). Hierbei wird durch die Verwendung der 5-Parameter-Richards-Funktion die Kinetik der Amplifikationskurve miteinbezogen. Die Position des Umschlagpunktes und die Steigung der Fluoreszenzkurve an diesem verschieben sich in Abhängigkeit der Effizienz. Die Schnittpunkte der Tangenten, die zur Festlegung des Cy0-Wertes herangezogen werden, verändern sich dabei jedoch nur gering. Die Autoren konnten zeigen dass diese Methode signifikant weniger durch Effizienzabweichungen beeinflusst wird als die am weitesten verbreitete Cycle-Threshold-Methode (96).

Die RT-qPCR stellt aus oben genannten Gründen aktuell das Standardverfahren zur Genexpressionsanalyse auf RNA-Ebene dar. Durch Berücksichtigung der MIQE-Leitlinien konnte die Methode für die durchgeführte Studie optimiert werden.

#### **5.1.4. Proteinanalytik mittels Western Blot**

Nach der Entwicklung des Western Blots vor etwa 40 Jahren wurde diese Technik rasch zu einer Standardmethoden der Proteomik. Seither wurde der Western Blot ständig weiterentwickelt. Ziele waren zum einen die Erhöhung der Effektivität der einzelnen Schritte und Verkürzung der Durchführungszeit, zum anderen wurden Komponenten und Abläufe zur Beantwortung spezieller Fragestellungen angepasst (119).

Trotz hoher Sensitivität, mit der Möglichkeit zum Nachweis von wenigen Picogramm an Antigen, unterliegt der Western Blot in dieser Hinsicht der qPCR als alternativer Methode der Expressionsanalyse. Das Detektionslimit (LOD) der PCR, definiert als minimale RNA-Konzentration, bei der 95 % der positiven Proben erkannt werden, liegt theoretisch bei 3 Kopien pro Ansatz und somit deutlich niedriger (32, 87). Dennoch erscheint der Nachweis auf Proteinebene als vorteilhaft, da der bloße Nachweis von RNA eine eingeschränkte Aussage über die definitive Synthese des Produkts ermöglicht (8).

Ein weiterer Punkt, welcher im Zuge der Planung und Diskussion von Western Blot Analysen beachtet werden muss, bezieht sich insbesondere auf Enzyme. Hier kann neben der absoluten Menge an Protein die Aktivität des untersuchten Enzyms von entscheidender Rolle sein. Messungen der Enzymaktivität erfolgen meist über Konzentrationsänderungen der entsprechenden Substrate oder Produkte. Dies kann unter anderem durch Spektroskopie oder Fluoreszenzbestimmung geschehen (100). Im Rahmen der aktuellen Fragestellung waren Aussagen über das Gesamtprotein vorrangig.

#### **5.1.5. Elektronenspinresonanz-Spektroskopie**

Es steht eine große Bandbreite an Methoden zur genaueren Untersuchung des Redoxstatus in verschiedenen Arten von Probematerialien zur Verfügung. Diese nutzen unter anderem Spektrophotometrie, Chemilumineszenz, Fluoreszenz und die Elektronenspinresonanz (94).

Es besteht die Möglichkeit zur Quantifizierung unterschiedlicher ROS, wobei das primäre Augenmerk meist auf  $O_2^{\cdot-}$  liegt, welches den Vorläufer der meisten anderen ROS darstellt (27). Aufgrund physiologischer Zusammenhänge werden stets in gewissem Maß andere Spezies mit erfasst (94).

Bei der Auswahl der Methode muss eine von der Fragestellung und untersuchtem Material abhängige Anwendbarkeit berücksichtigt werden. Im Fall der vorliegenden Studie standen primär quantitative Aspekte im Vordergrund, um einen Vergleich der Ausprägung des oxidativen Stresses in den Versuchsgruppen zu ermöglichen. Zudem musste eine Anwendbarkeit auf Gewebeproben gegeben sein.

Das Cytochrom-c-Reduktions-Assay und das Nitroblautetrazolium-Assay sind Beispiele für photometrische Messmethoden. Sie zeichnen sich durch eine einfache Anwendbarkeit mit weithin verfügbaren Mitteln aus. Beide Methoden nutzen die Reduktion eines Reagenz durch Reaktion mit ROS mit resultierendem Farbumschlag (94). Die Anwendbarkeit wird jedoch durch die mangelnde Zellpermeabilität von Ferricytochrom c und Nitroblautetrazolium begrenzt. Ein weiterer Nachteil ist eine mögliche enzymatische Reduktion beider Stoffe, welche Messabweichungen begünstigen kann. Das Cytochrom-c-Reduktions-Assay weist zudem eine relativ hohe Nachweisgrenze für ROS auf (63, 94).

Ein kritischer Punkt der bei der Messung von ROS berücksichtigt werden muss, ist die kurze Halbwertszeit (17). Im Fall der Lucigenin-Lumineszenz Methode wird hierdurch die Verwendung höherer Konzentrationen an Reagenz notwendig. Dies begünstigt einen der Hauptkritikpunkte an dem auf Chemilumineszenz beruhenden Verfahren. In der beabsichtigten Reaktion wird Lucigenin zunächst durch ein Molekül  $O_2^-$  zu einem kationischen Radikal reduziert, welches mit einem weiteren  $O_2^-$  zu einem energiereichen Dioxetan reagiert. Dieses zerfällt unter Abgabe eines mit einem Luminometer detektierbaren Photons. Beim sogenannten redox cycling reagieren Lucigeninradikale mit molekularem Sauerstoff. Hierbei entstehen Superoxidradikale was zu einer Überschätzung der ursprünglich vorhandenen Konzentration an ROS führen kann (63). Die Relevanz dieses Effekts wird kontrovers diskutiert, es wird jedoch angenommen, dass er insbesondere bei Konzentrationen über 5 mmol/l Lucigenin von Bedeutung ist (73).

Die ESR-Spektroskopie stellt das einzige zur Verfügung stehende Verfahren dar, welches in der Lage ist, Radikale direkt nachzuweisen. Leider wird auch dies prinzipiell in seiner Anwendbarkeit von der Konzentration der nachzuweisenden paramagnetischen Stoffe begrenzt (58). Spin traps und spin probes können diesen Umstand durch ihre längere Halbwertszeit auszugleichen (17). Der im Austausch auftretende Informationsverlust über die ursprüngliche Natur des Radikals war im Zusammenhang mit dieser Studie vertretbar, da quantitative Aspekte im Vordergrund standen. Die genutzte spin probe CMH, bei der es sich um ein cyclisches Hydroxylamin handelt, besitzt im Vergleich zu alternativen Verbindungen vorteilhafte

Eigenschaften. Im Gegensatz zu ebenfalls zur Verfügung stehenden Nitroxiden oder Nitrosoverbindungen wird keine kovalente Verbindung mit dem ROS-Molekül eingegangen, sondern die spin probe selbst in ein stabiles Radikal umgewandelt (64). Der Nachweis dieses Radikals liefert keine Information über die oxidierende ROS Spezies (120), wobei entsprechend des Vorkommens und der Affinität ein hoher Prozentsatz auf  $O_2^{\cdot-}$  zurückzuführen ist (19). Ein weiterer Vorteil der cyclischen Hydroxylamine gegenüber den klassischen Nitroxid spin traps ist deren Reaktionskinetik mit  $O_2^{\cdot-}$ . Für die dem CMH verwandte Verbindung 1-Hydroxy-3-carboxy-2,2,5,-tetramethyl-pyrrolidin-hydrochlorid (CPH) konnte eine deutlich über den Werten für Nitron spin traps liegende Geschwindigkeitskonstante von  $k = 3,2 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  gemessen werden. Für das Nitron DMPO liegt die Konstante bei  $k = 35 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  (62). Höhere Reaktionsgeschwindigkeiten ermöglichen es dem Reagenz mit endogenen Antioxidantien zu konkurrieren und  $O_2^{\cdot-}$  nachzuweisen, welches ansonsten Abbauvorgängen zum Opfer fallen würde (244).

Resultierend aus der höheren Halbwertszeit, der schnelleren Reaktionskinetik und einer größeren Stabilität gegenüber Bioreduktion durch beispielsweise Flavine, Thiole und Ascorbat, ergibt sich die verbesserte Anwendbarkeit der cyclischen Hydroxylamine auf Gewebeproben und andere biologische Systeme (63). Entgegen anderer Methoden, deren Anwendbarkeit wie bereits genannt auf extrazelluläre Räume beschränkt bleibt, ermöglicht die ESR-Spektroskopie, je nach genutzter spin probe, eine Betrachtung unterschiedlicher Kompartimente. Aufgrund ihrer Lipophilie und anderer bisher nicht genau definierter Eigenschaften penetrieren einige spin probes die Zellmembran und verteilen sich teils auch innerhalb der Zelle inhomogen. Beispielsweise akkumuliert die modifizierte spin probe 1-Hydroxy-4-[2-(triphenylphosphonio)-acetamido]-2,2,6,6-tetramethylpiperidin (mitoTEMPO-H) innerhalb von Mitochondrien, wohingegen diese Organellen impermeabel für CPH sind. CMH weist eine hohe Zellpermeabilität und intrazelluläre Akkumulation auf. Es eignet sich zudem wie mitoTEMPO-H zur Messung selektiv intramitochondrialer Anstiege von  $O_2^{\cdot-}$ , aber bildet im Gegensatz zu diesem auch den restlichen Intrazellularraum ab (64). Die Erfassung des mitochondrialen Kompartiments erscheint im Zusammenhang mit oxidativem Stress im Rahmen der Sepsis von besonderer Bedeutung (84). Zusätzlich wies CMH unter den von Dikalov et al. untersuchten Hydroxylaminen die höchste Reaktivität auf (64).

Zusammengefasst stellt die ESR-Spektroskopie unter Verwendung von CMH eine besonders geeignete Methode zur vergleichenden, quantitativen Erfassung von oxidativem Stress in strukturell erhaltenen Gewebeproben dar.

## 5.2. Wertung der Ergebnisse

### 5.2.1. Oxidativer Stress

Fünf Stunden nach Induktion einer CLI-Sepsis kam es in Leber und Aorta zu einem signifikanten Anstieg der ROS-Konzentration, wohingegen der ROS-Gehalt in der Milz auf unverändert hohem Niveau lag. Das Milzgewebe wies hierbei die höchsten Basalwerte aller untersuchten Organe auf. Eine mögliche Ursache hierfür könnte die Reservoirfunktion der Milz mit Speicherung großer Mengen an undifferenzierten Monozyten sein. Swirski et al. konnten zeigen, dass diese in einem Myokardinfarkt-Modell der Maus mobilisiert werden und zum Ort der Inflammation migrieren (209). Zum Migrationsverhalten splenischer Monozyten während bakterieller Infektionen liegen entsprechende Daten nicht vor. Einen der am besten untersuchten Erreger mit besonderem Zusammenhang mit der Milz stellt *Listeria monocytogenes* dar. Eine Infektion mit dem Bakterium führt zu einer ausgeprägten Monozytose. Allerdings stellt im Fall dieses Erregers die Milz zusammen mit der Leber einen primären Infektfokus dar und die Monozytose geht größtenteils auf das Knochenmark zurück. Die Rolle der in der Milz vorkommenden Monozyten bei der Infektabwehr in anderen Organen ist unklar (105). Ob selbige Zellen im Falle eines infektiösen Geschehens von der Milz in andere Organe, z.B. Leber oder Aorta, abwandern ist bisher nicht ausreichend untersucht.

Hoffmann et al. lieferten den Nachweis einer durch Scheinoperation hervorgerufenen Veränderung der Blutkonzentration von Immunzellen in der Maus. Im analysierten Myokardinfarktmodell war insbesondere eine Beeinflussung der Monozytenkonzentration im Blut auffällig, welche die Verhältnisse nach Koronarligatur imitierte (103). Eine Aktivierung splenischer Monozyten bereits durch die Scheinoperation könnte eine mögliche Erklärung für die beobachteten erhöhten basalen Superoxidkonzentrationen ohne Abweichungen zwischen den Versuchsgruppen in der Milz liefern (237).

Eine verringerte  $O_2^-$  Konzentration und ein reduzierter oxidativer Stress durch die Gabe von Melatonin während einer Sepsis konnten sowohl systemisch als auch in verschiedenen Organen, wie z.B. der Aorta, durch mehrere vorangegangenen Studien nachgewiesen werden (180, 199, 233). Die an der antioxidativen Wirkung von Melatonin beteiligten Mechanismen wurden oben bereits dargestellt. Um einen Kontext zwischen veränderten ROS-Konzentrationen und der Stressantwort auf diesen pathophysiologischen Stimulus herzustellen,

wurde in der vorliegenden Arbeit die hepatische Expression der Superoxiddismutase-1 (SOD-1) und den Zelladhäsionsmolekülen VCAM-1 und ICAM-1 untersucht.

Die SOD-1 ist ein zytoplasmatisches, am Abbau von  $O_2^-$  beteiligtes Enzym. Das Gesamtvorkommen dieses Proteins in den untersuchten Leberproben unterschied sich nicht, jedoch ist neben der Menge die Aktivität des Enzyms entscheidend. Vorangegangene Untersuchungen konnten eine gesteigerte Aktivität verschiedener Isoenzyme der SOD durch Melatonin nach LPS-Injektion und CLP zeigen (9, 169, 242). Bezüglich des Effekts von Melatonin auf die Expression der SOD auf Protein- oder mRNA-Ebene liegen nur wenige Daten vor und diese beziehen sich nicht auf die Sepsis. Mauriz et al. beobachteten eine reduzierte mRNA Expression der SOD in gealterten Ratten. Die orale Substitution von Melatonin über vier Wochen führte zu einem Anstieg auf das Niveau jüngerer Tiere (154). In einem in vitro Modell von Morbus Parkinson war Melatonin ebenfalls in der Lage einer Reduktion der mRNA Menge für SOD entgegenzuwirken (155).

Neben einer Expressionsänderungen der SOD kommt posttranslationale Modifikation als Ursache für veränderte Aktivität des antioxidativen Enzyms in Betracht (83). Reaktive Verbindungen sind durch Veränderungen der Proteinstruktur in der Lage die SOD zu inaktivieren. Dies wurde für Acrolein, ein reaktives Aldehyd und Produkt der Lipidperoxidation, beschrieben (109). Lipidperoxidation bezeichnet einen Prozess bei dem mehrfach ungesättigte Fettsäuren durch reaktive Sauerstoffspezies in hochreaktive Aldehyde umgewandelt werden. Zu dieser Gruppe zählen neben Acrolein auch die bekannteren Malondialdehyde (MDA), welche häufig als Maß für oxidativem Stress herangezogen werden (180). Die Inaktivierung der SOD durch Acrolein konnte erfolgreich durch den Einsatz von Radikalfängern und Kupferchelatoren unterbunden werden (109). Melatonin, als ein Molekül welches beide dieser Eigenschaften in sich vereint, könnte durch diesen Effekt in der Sepsis eine Steigerung der Enzymaktivität trotz gleichbleibender Expression vermitteln (181). Eine Reduktion der Lipidperoxidation durch Melatonin konnte anhand verminderter MDA-Konzentrationen im Tiermodell der Endotoxinämie, der CLP Sepsis und am Menschen in einer Untersuchung von septischen Neugeborenen belegt werden (91, 139, 199). Ob jedoch tatsächlich ein direkter Zusammenhang zwischen Melatoninapplikation in der Sepsis, Lipidperoxidation und Aktivität der SOD besteht kann anhand der erhobenen Daten nicht beurteilt werden und bedarf gesonderter Erueierung.

Reaktive Sauerstoffspezies wie  $O_2^-$  wurden als wichtiger Induktor für verschiedene Adhäsionsmoleküle wie VCAM-1 und ICAM-1 identifiziert (42). Yang et al. konnten eine

Inhibition von RAC1 durch Melatonin zeigen (236), wobei eine Interaktion der GTPase mit dem Melatoninrezeptor MT1 besteht (57). RAC1 führt zu einer Aktivierung der NADPH-Oxidase (23), welche wiederum eine Schlüsselrolle in der Produktion von  $O_2^{\cdot-}$  in Endothelzellen zukommt (159). Trotz Reduktion des  $O_2^{\cdot-}$  Gehalts nach Gabe von Melatonin konnte eine verminderte Expression von VCAM-1 oder ICAM-1 in unserer Studie weder auf Protein- noch auf RNA-Ebene gezeigt werden. Einige Autoren konnten eine Aktivierung der Transkription dieser Adhäsionsmoleküle durch das ERK1/2 nachgeschaltete EGR1 nachweisen (107). Im Gegensatz zu Untersuchungen mit anderen Endpunkten, konnte in der vorliegenden Arbeit weder ein hemmender (236), noch ein aktivierender (202) Effekt von Melatonin auf die Phosphorylierung von ERK festgestellt werden. Bei tendenziell erhöhter Expression lässt dies, eine auf anderem Wege vermittelte Aktivierung von ERK, unbeeinflusst von Melatonin als Induktionsmechanismus von VCAM-1 und ICAM-1, während einer Sepsis möglich erscheinen. Über die Regulation der Expression von Adhäsionsmolekülen wie VCAM-1 und ICAM-1 existieren bisher widersprüchliche Angaben. Luo et al. konnten eine Beteiligung von NF- $\kappa$ B und aller drei MAPK-Signalwege an der TNF $\alpha$  vermittelten Induktion von VCAM-1 nachweisen (142). Zu einem entgegengesetzten Ergebnis kamen Zhou und Kollegen, welche Hinweise auf eine ausschließlich durch NF- $\kappa$ B vermittelte Regulation ohne Beteiligung von ERK und anderen MAPK fanden (243). Die große Streuung der Ergebnisse in unserer Studie, bei jedoch tendenziell erhöhten Werten und die scheinbar widersprüchlichen Resultate vorangegangener Studien, könnten auf eine Involvierung von ERK unter bisher jedoch nicht bekannten Regulationsmechanismen beruhen. Um diese Vermutung zu untermauern bedürfen die beteiligten Signalwege jedoch genauerer Untersuchung.

## **5.2.2. ER-Stress**

### **5.2.2.1. Aktivierung der Unfolded Protein Response**

Entgegen früheren Beobachtungen, konnte in der vorliegenden Arbeit kein generell induzierender Effekt einer polymikrobiellen Sepsis auf typische Marker der UPR zum Zeitpunkt der Untersuchung nachgewiesen werden. Dies überrascht, da unter verschiedenen anderen verbreiteten Sepsismodellen ein Effekt auf alle drei Hauptsignalwege beschrieben wurde (111, 143). Hierbei sind jedoch einige entscheidende Faktoren zu bedenken. Neben den unterschiedlichen Modellen erweisen sich unterschiedliche Zellpopulationen und Untersuchungszeitpunkte als auffällig. ATF4 und XBP-1 zeigten in der Lunge von Mäusen bereits zwei Stunden nach LPS-Injektion einen deutlichen Anstieg (69). Von Ma und Kollegen konnte auch in der CLP-Sepsis, nach 24 Stunden ein Anstieg von GRP78 und sXBP-1-RNA

verzeichnet werden (143). Daten bezüglich der Induktion der UPR in der CLI-Sepsis liegen bisher nicht vor. Ein Ansprechen innerhalb des von uns gesetzten Zeitrahmens erschien jedoch aufgrund früherer Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe wahrscheinlich. So konnte von uns eine Einschränkung der Leberfunktion und Schädigung von Hepatozyten nach 5 Stunden CLI-Sepsis in der Ratte gezeigt werden (76).

Einen möglichen Erklärungsansatz liefert ein heterogenes Ansprechen verschiedener Zelltypen auf eine Simulation durch LPS. In einem in vivo Modell der Maus bestand ein Ansprechen der GRP78 Expression auf eine intraperitoneale Injektion von LPS. Dieses war mit 128 %, bezogen auf die Kontrollgruppe, nach 24 Stunden jedoch relativ gering ausgeprägt (89). LPS scheint zudem in der Lage zu sein, eine Fehlfunktion der physiologischen Abläufe der ER-Stressantwort zu verursachen. Ein gemessener Anstieg von GRP78 mRNA in der Leber von Ratten spiegelte sich hierbei auf Proteinebene nicht wider. Die Autoren interpretierten dies und weitere Abweichungen als Korrelat des Multiorganversagens im Rahmen überschießender Inflammation (117). An HepG2 Zellen konnte sogar eine Reduktion der Expression von GRP78, XBP1 und CHOP durch LPS auf mRNA-Ebene gezeigt werden. Dieser als TLR4-vermittelt beschriebene Effekt konnte auch auf Proteinebene nachvollzogen werden, so dass sich nach 24-stündiger Inkubation mit LPS eine signifikante Reduktion von GRP78, XBP1, CHOP, ATF6 und ATF4 zeigte (108).

Die Frage nach dem Einfluss einer Sepsis auf die UPR erscheint komplexer als bisher beschrieben und sollte Faktoren wie Besonderheiten des Modells und des untersuchten Organs bzw. der Zellart genauer berücksichtigen.

#### **5.2.2.2. Aktivierung von PERK und CHOP**

Eine Behandlung septischer Tiere mit Melatonin führte unter den vorliegenden Untersuchungsbedingungen zu einer signifikanten Erhöhung der Expression von PERK und dem hauptsächlich durch diesen Arm der UPR kontrollierten CHOP.

Der Initiator des PERK-Signalwegs, weist in Bezug auf oxidativen Stress und insbesondere dessen Prävention und Bewältigung einige relevante Effekte auf. Der für die meisten mRNAs geltende Translationsarrest führt zu einer Reduktion des Verbrauchs an Reduktionsäquivalenten. Diese werden unter anderem bei der Auflösung inkorrekt gebildeter Disulfidbrücken und dem Abbau fehlgefalteter Proteine verbraucht (99). An PERK und ATF4 Knock-out(-/-)-Fibroblasten der Maus konnte die wichtige Rolle dieses Signalwegs im Metabolismus von Aminosäuren und in der Bewältigung von oxidativem Stress belegt werden.

Im Falle von PERK<sup>-/-</sup> ist eine Substitution von Aminosäuren und Substanzen mit reduzierender Wirkung zur Abwendung des Zelltodes unter Stressbedingungen notwendig. Für ATF4<sup>-/-</sup> ist diese sogar notwendig, um ein Überleben unter physiologischen Bedingungen zu gewährleisten. Eine besondere Rolle spielen hierbei schwefelhaltige Aminosäuren. Die an Cystin und Cystein gemachten Beobachtungen sprechen für eine gewichtige Beteiligung am Gluthationstoffwechsel (99).

Einblick in die Hintergründe geben Untersuchungen, die ATF4 als Induktor der xCT Untereinheit des Glutamat/Cystin-Antiportersystems X<sub>c</sub> identifizierten (193). Dieser Effekt wird durch Nrf2 multipliziert (133). Nrf2 stellt einen Interaktionspartner sowohl von ATF4 als auch von PERK dar. PERK führt durch Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors Nrf2 zur Dissoziation von dessen Inhibitor Keap1, wodurch die Translokation in den Zellkern ermöglicht wird. Dort heterodimerisiert Nrf2 mit kleinen Maf Proteinen oder ATF4 und übt so seine Expressionsregulation aus (53). Zu den Zielgenen zählen die antioxidative Hämooxygenase-1 und Untereinheiten der  $\gamma$ -Glutamylcysteinsynthetase (208, 231). Die  $\gamma$ -Glutamylcysteinsynthetase ist, ebenso wie das von dem oben genannten Antiporter gelieferte Cystin, an der Glutathionbiosynthese und somit an der Protektion vor oxidativem Stress beteiligt. Die nach Gabe von Melatonin festgestellte Reduktion erhöhter ROS-Konzentrationen bei septischen Tieren könnte somit durch die in dieser Gruppe erhöhte PERK-Expression mit bedingt sein.

Die zu einer Aktivierung von CHOP führenden Signalwege sind gut definiert und weitgehend akzeptiert (135). Als Zielmoleküle wurden mehrere pro- und antiapoptotische Faktoren identifiziert, wobei schlussendlich der proapoptotische Effekt in der bisher vorliegenden Literatur klar überwiegt (82, 97, 135, 168, 212). Zum Effekt von Melatonin auf diesen Signalweg existieren bisher widersprüchliche Daten. So konnte eine durch verschiedene Stimuli ausgelöste Aktivierung der UPR, welche auch CHOP beinhaltet, in unterschiedlichen Geweben reduziert werden. Unter anderem wurde dies bei der fulminanten Virushepatitis (216), der neuronalen Ischämie (35) und der toxischen Leberfibrose (191) beobachtet. Die Behandlung mehrerer Zelllinien des hepatozellulären Karzinoms führte jedoch zu entgegengesetzten Ergebnissen. Hier konnte unter Tunicamycin-induziertem ER-Stress eine vermehrte Expression von CHOP erzielt werden, was zu einer gesteigerten Apoptose von ansonsten unter ER-Stress hierfür resistenten Zellen führte (239).

Der Weg vom ER-Stress zum programmierten Zelltod ist komplex. Hierbei wurden verschiedene Signalwege identifiziert, wobei sich die Mechanismen zwischen Spezies und

Zellarten unterscheiden (77). CHOP beeinflusst die Expression der downstream-of-CHOP (DOC)-Moleküle, mehrerer Mitglieder der B-Zell-Lymphom-2 (Bcl-2) Molekülfamilie, TRB3 (tribbles-related protein 3) und von growth-arrest-and-DNA-damage-inducible protein34 (GADD34) (135). Die Aufzählung beinhaltet sowohl pro- als auch antiapoptotische Faktoren, deren Expression hauptsächlich in Richtung eines proapoptotischen Effekts modifiziert wird (77). Beispielsweise wird durch CHOP eine Reduktion von Bcl-2 bei gleichbleibender Expression von Bcl-X bewirkt und so ein Übergang zur Apoptose gefördert (135). Auch einzelne Zielgene können situativ unterschiedliche Endpunkte begünstigen. GADD34 bewirkt eine Dephosphorylierung von eIF2 $\alpha$  und eine Beendigung des Translationsarrestes (96). Dies kann im Sinne einer negativen Rückkopplung gesehen werden und sich je nach Rahmenbedingungen positiv oder negativ auf das Zellüberleben auswirken.

Die Apoptose wird von CHOP auch durch eine Induktion der ER-Oxidase1 (ERO1) begünstigt (54). Von besonderem Interesse für die in dieser Arbeit beobachteten Zusammenhänge könnte die CHOP-ERO1 $\alpha$ -IP3R-CaMKII-Signalkaskade sein. ER-Stress führt zu einem vermehrten Anfall inkorrekt ausgebildeter Disulfidbrücken. Proteindisulfidisomerasen (PDI) katalysieren deren Neubildung unter Verbrauch von Glutathion. Die Reoxidation der PDI wird von der ERO1 $\alpha$  vermittelt, welche wiederum durch CHOP induzierbar ist (63).

Marciniak et al. gelang der Nachweis einer Verknüpfung zwischen der durch ER-Stress ausgelösten und durch CHOP vermittelten ERO1 $\alpha$ -Induktion und einer Aktivierung des Inositol-Triphosphat-Rezeptors (IP3R) durch einen bisher nicht genau definierten Mechanismus (148). Es resultiert eine Calciumfreisetzung aus dem ER-Lumen in das Cytosol, welche über CaMKII zur Apoptose führt (76). Ausgelöst wird diese durch den mitochondrialen und den Fas-Signalweg (124). Die Kaskade konnte erfolgreich durch RNA-Interferenz an ERO1 $\alpha$  und IP3R1 sowie Funktionsverlustmutationen ERO1 $\alpha$  und CHOP unterbunden werden. Andererseits ließ sie sich durch Transfektion von CHOP $^{-/-}$  Makrophagen mit ERO1 $\alpha$ -cDNA wiederherstellen (148).

Diese Beobachtung stellt eine Verbindung zwischen oxidativem Stress und durch ER-Stress verursachter Apoptose her. Ein Zusammenhang des beobachteten positiven Effekts von Melatonin auf das Vorkommen von ROS und einer trotz erhöhter CHOP-Expression zumindest auf Ebene der Caspasen-12, -9 und -3 nicht erhöhten Apoptoseneigung scheint möglich. Alternativ besteht jedoch ebenfalls die Möglichkeit, dass fünf Stunden nach Induktion einer CLI Sepsis eine nicht ausreichende Zeitspanne sind, um eine Apoptose in Hepatozyten einzuleiten. Die Annahme wird von Nishitoh et al. unterstützt, welche postulierten, dass die

UPR-Signaltransduktion einschließlich CHOP darauf abzielt zelluläre Stresszustände zu beheben und die Apoptose nur dann einzuleiten, wenn diese fortbestehen (92). Um diesen Sachverhalt zu klären sind weitere Untersuchungen, insbesondere über den Einfluss von Melatonin auf die ER-Calciumhomöostase nötig.

### **5.2.2.3. CREBH**

Das Expressionsverhalten von CREBH während zellulärem Stress ist bisher nur unzureichend verstanden und die Datenlage inhomogen. In der vorliegenden Studie beobachteten wir eine Reduktion der CREBH Expression bei septischen Tieren, was sich mit den Erkenntnissen von Yang et al. deckt, die in einer Microarray-basierten Analyse eine Verminderung unter systemischer Inflammation durch CLP feststellten (237).

In einer frühen und sehr umfassenden Arbeit von Zhang et al. zum Thema CREBH und dessen Reaktion auf eine Inflammation und ER-Stress konnte gezeigt werden, dass IL-6, LPS, Tunicamycin, Thapsigargin und Dithiothreitol in fetalen mureinen Leberzellen zu einer erhöhten Expression und nukleären Translokation von CREBH führen (241). In Leberzellkarzinomzellen hingegen führten die proinflammatorischen Zytokine und LPS ausschließlich zu einer gesteigerten Expression, zur Translokation zeigte sich ER-Stress als notwendig (241).

Inzwischen konnten mechanistische Erkenntnisse gewonnen werden, welche an der Übertragbarkeit experimenteller Daten durch bestimmte Induktoren von ER-Stress zweifeln lassen. So ist zur proteolytischen Spaltung und Freisetzung des aktiven CREBH-Fragments eine N-Glykosylierung am C-Terminus notwendig. Wird diese unterdrückt, unterbleibt die Freisetzung und somit die nukleäre Translokation. Tunicamycin, einer der am weitesten verbreiteten Induktoren von ER-Stress, erzielt seinen Effekt durch eine Hemmung der Glykosylierung. Chan et al. konnten nachweisen das trotz vermehrten ER-Stress, mit unter anderem Aktivierung von ATF6, so eine Aktivierung von CREBH durch Tunicamycin unterbleibt (40). Ein weiteres Beispiel für das Auseinanderweichen von physiologischen und experimentellen ER-Stress-Bedingungen liefert das Lacton-Antibiotikum Brefeldin A. Dessen Anwendung führt zur Fusion von ER und Golgi. Hierdurch wird die Endstrecke der CREBH Aktivierung vorweggenommen, indem das membranständige Protein direkt in Kontakt mit den ansonsten nur im Golgi Apparat lokalisierten Site-1- und Site-2-Proteasen gebracht wird (40). Diese Beispiele illustrieren, dass das gewählte Modell eine Beeinflussung von CREBH in eine bestimmte Richtung begünstigen kann, unabhängig von der beabsichtigten Induktion von ER-Stress. Möglicherweise sind die unterschiedlichen Daten zum Expressionsverhalten von

CREBH auf solche Mechanismen zurückzuführen. Das von uns gewählte physiologischere Tiermodell scheint für solche Effekte weniger anfällig.

In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich die Menge an mRNA des Transkriptionsfaktors gemessen. Da über das Vorkommen von CREBH hinaus dessen Phosphorylierungszustand und nukleäre Translokation entscheidend sind, wird hierdurch die Interpretation deutlich erschwert (16).

Die Beziehung zwischen Inflammation und der Akute Phase Reaktion ist als gesichert anzusehen und seit langem z.B. in Form von Messungen des C-reaktiven Proteins (CRP) Teil der klinischen Praxis (22). Neben CRP werden auch Hepcidin und SAP unter proinflammatorischen Bedingungen wie z.B. in der Sepsis vermehrt exprimiert (46, 127). Eine regulatorische Funktion von CREBH auf diese Akute Phase Proteine wurde wiederholt beschrieben, jedoch stets als Induktor deren Transkription (158, 241). Auf den ersten Blick widerspricht dies den von uns gemachten Beobachtungen.

Eine mögliche Erklärung wäre die durch Melatoninapplikation reversible Reduktion der mRNA und ein negativer Feedbackmechanismus auf eine gesteigerte Aktivierung von CREBH. Jedoch liegen hierzu bisher keine ausreichenden Daten vor.

Die relativ kurze Halbwertszeit des Proteins liefert eine Grundvoraussetzung für einen derartigen Mechanismus. Nach Unterbindung der De-novo-Synthese in CREBH exprimierenden COS-1 Zellen kam es zu einem nahezu vollständigen Abbau des Proteins innerhalb von 2 Stunden (15). Zudem konnte gezeigt werden, dass Melatonin in pankreatischen Insulinom  $\beta$ -Zellen zu einer Reduktion an phosphoryliertem CREBH (pCREBH) führt. Dies geschah indem eine Reduktion eines zuvor durch Forskolin oder 3-Isobutyl-1-methylxanthin ausgelösten Anstiegs an nukleären pCREBH nachgewiesen wurde. Interessanterweise konnte dies durch den Melatonin Rezeptorantagonisten Luzindole aufgehoben werden, wodurch eine direkte Vermittlung durch MT1 und MT2 Rezeptoren, im Gegensatz zu einem unspezifischen z.B. antioxidativen Effekt, angenommen werden kann (18). Ein möglicher Feedbackmechanismus könnte auf diesem Wege moduliert werden. Um diese Annahme jedoch mit Fakten zu hinterlegen, sind weitere auf den CREBH-Signalweg fokussierte Studien notwendig.

## 6. Schlussfolgerung

In der vorliegenden Arbeit konnte der protektive Effekt von Melatonin gegenüber oxidativem Stress in der murinen Sepsis bestätigt werden. Die Veränderung des Redoxgleichgewicht ließ sich in Leber und Aorta jedoch nicht in der Milz nachweisen. Untersuchungen zum Migrationsverhalten splenischer Monozyten in anderen pathophysiologischen Modellen liefern einen Ansatzpunkt, die Ursache hierfür auch in der Sepsis zu eruieren.

Die Analysen von Lebergewebe konnten keine Korrelation zwischen der Superoxidkonzentration und der Expression der Superoxiddismutase-1 und der Adhäsionsmoleküle zeigen. Bei gleichbleibender Expression könnte die Protektion vor posttranslationalen Modifikationen, beispielsweise durch Produkte der Lipidperoxidation, eine Erklärung für die vorbeschriebene Aktivitätssteigerung der SOD-1 durch Melatonin in der Sepsis liefern. Zur Bestätigung dieses Zusammenhangs sind Folgestudien notwendig die Expressions- und Aktivitätsanalyse und Messung der Lipidperoxidation umfassen.

Die Adhäsionsmoleküle VCAM-1 und ICAM-1 werden in der Sepsis vermehrt gebildet, dies blieb trotz der Reduktion von  $O_2^-$  durch Melatonin unbeeinflusst. Die Regulation dieser Moleküle in der Sepsis erscheint komplex. Die Untersuchung von ERK1/2 konnte die Abläufe, wie auch vorangegangene Studien, nicht abschließend definieren, sodass weitere Arbeiten zur Bedeutung der MAPK und von NF- $\kappa$ B notwendig sind.

Die Marker der Unfolded Protein Response zeigten entgegen den aus der Literatur ableitbaren Erwartungen in der Leber septischer Tiere nach CLI keine Induktion. Faktoren wie Wahl des Sepsismodells und des untersuchten Organs bzw. der Zellart haben grundlegendere Bedeutung als angenommen und erschweren Vergleichbarkeit und Interpretation bei Experimenten zum Thema ER-Stress.

Der gelungene Nachweis einer Induktion von PERK und CHOP durch die Kombination aus CLI und Melatonin schafft eine Verknüpfung zwischen ER-Stress und oxidativem Stress. Der durch PERK gesenkte Verbrauch an Reduktionsäquivalenten und die Verbindung zum Glutathionstoffwechsel sowie die Induktion der ER-Oxidase1 durch CHOP stellen mögliche Mechanismen zur Vermittlung des positiven Effekts von Melatonin in der Sepsis dar.

Zusammenfassend identifizierte diese Arbeit mehrere Faktoren, welche bei Untersuchungen zu ER-Stress und oxidativen Stress besonderer Berücksichtigung bedürfen. Mehrere konkrete Ansätze für Folgestudien wurden definiert.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Acuna-Castroviejo D, Escames G, Venegas C, et al. (2014) Extrapineal melatonin: sources, regulation, and potential functions. *Cell Mol Life Sci* 71: 2997-3025
2. Adachi Y, Yamamoto K, Okada T, et al. (2008) ATF6 Is a Transcription Factor Specializing in the Regulation of Quality Control Proteins in the Endoplasmic Reticulum. *Cell Structure and Function* 33: 75-89
3. Alamili M, Bendtzen K, Lykkesfeldt J, Rosenberg J, Gögenur I (2014) Melatonin suppresses markers of inflammation and oxidative damage in a human daytime endotoxemia model. *Journal of Critical Care* 29: 184.e189-184.e113
4. Alberts B (2002) *Molecular biology of the cell*. 4th Garland Science, New York
5. Alejandria M M, Lansang M A D, Dans L F, Mantaring Iii J B (2013) Intravenous immunoglobulin for treating sepsis, severe sepsis and septic shock. *Cochrane Database of Systematic Reviews*
6. Álvarez-Diduk R, Galano A, Tan D X, Reiter R J (2015) N-Acetylserotonin and 6-Hydroxymelatonin against Oxidative Stress: Implications for the Overall Protection Exerted by Melatonin. *The Journal of Physical Chemistry B* 119: 8535-8543
7. Andersen L P H, Werner M U, Rosenkilde M M, et al. (2016) Pharmacokinetics of oral and intravenous melatonin in healthy volunteers. *BMC pharmacology & toxicology* 17: 8-8
8. Anderson L, Seilhamer J (1997) A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver. *Electrophoresis* 18: 533-537
9. Andrades M, Ritter C, de Oliveira M R, et al. (2011) Antioxidant Treatment Reverses Organ Failure in Rat Model of Sepsis: Role of Antioxidant Enzymes Imbalance, Neutrophil Infiltration, and Oxidative Stress. *Journal of Surgical Research* 167: e307
10. Angele M K, Pratschke S, Hubbard W J, Chaudry I H (2014) Gender differences in sepsis: Cardiovascular and immunological aspects. *Virulence* 5: 12-19
11. Angus D C, van d P (2013) Severe Sepsis and Septic Shock. *N Engl J Med* 369: 840

12. Angus D C, Barnato A E, Bell D, et al. (2015) A systematic review and meta-analysis of early goal-directed therapy for septic shock: the ARISE, ProCESS and ProMISE Investigators. *Intensive Care Medicine* 41: 1549-1560
13. Ariyasu D, Yoshida H, Hasegawa Y (2017) Endoplasmic Reticulum (ER) Stress and Endocrine Disorders. *International Journal of Molecular Sciences* 18: 382
14. Bai P, Virág L (2012) Role of poly(ADP-ribose) polymerases in the regulation of inflammatory processes. *FEBS letters* 586: 3771
15. Bailey D, Barreca C, O'Hare P (2007) Trafficking of the bZIP Transmembrane Transcription Factor CREB-H into Alternate Pathways of ERAD and Stress-Regulated Intramembrane Proteolysis. *Traffic* 8: 1796-1814
16. Barbosa S, Carreira S, Bailey D, Abaitua F, O'Hare P (2015) Phosphorylation and SCF-mediated degradation regulate CREB-H transcription of metabolic targets. *Molecular Biology of the Cell* 26: 2939-2954
17. Barriga-Gonzalez G, Aguilera-Venegas B, Folch-Cano C, Perez-Cruz F, Olea-Azar C (2013) Electron spin resonance as a powerful tool for studying antioxidants and radicals. *Curr Med Chem* 20: 4731-4743
18. Bazwinsky-Wutschke I, Wolgast S, Mühlbauer E, Albrecht E, Peschke E (2012) Phosphorylation of cyclic AMP-response element-binding protein (CREB) is influenced by melatonin treatment in pancreatic rat insulinoma  $\beta$ -cells (INS-1). *Journal of Pineal Research* 53: 344-357
19. Berg K, Ericsson M, Lindgren M, Gustafsson H (2014) A High Precision Method for Quantitative Measurements of Reactive Oxygen Species in Frozen Biopsies. *PLoS ONE* 9: e90964
20. Berson D M (2003) Strange vision: ganglion cells as circadian photoreceptors. *Trends Neurosci* 26: 314-320
21. Bertolotti A, Zhang Y, Hendershot L M, Harding H P, Ron D (2000) Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol* 2: 326-332
22. Black S, Kushner I, Samols D (2004) C-reactive Protein. *Journal of Biological Chemistry* 279: 48487-48490

23. Bokoch G M (1994) Regulation of the human neutrophil NADPH oxidase by the Rac GTP-binding proteins. *Current Opinion in Cell Biology* 6: 212-218
24. Bone R C, Fisher C J, Jr., Clemmer T P, et al. (1989) Sepsis syndrome: a valid clinical entity. Methylprednisolone Severe Sepsis Study Group. *Critical Care Medicine* 17: 389
25. Bone R C, Sibbald W J, Sprung C L (1992) The accp-sccm consensus conference on sepsis and organ failure. *CHEST Journal* 101: 1481
26. Bradford M M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254
27. Brandes R P, Janiszewski M Direct detection of reactive oxygen species ex vivo. *Kidney International* 67: 1662-1664
28. Bruker C 2015 Biological ROS and RNS Part II. EPR Spin Probes, [https://www.bruker.com/fileadmin/user\\_upload/8-PDF-Docs/MagneticResonance/EPR\\_brochures/EMXnano\\_ROS2\\_T155608.pdf](https://www.bruker.com/fileadmin/user_upload/8-PDF-Docs/MagneticResonance/EPR_brochures/EMXnano_ROS2_T155608.pdf)
29. Brun-Buisson C, Doyon F, Carlet J (1996) Bacteremia and severe sepsis in adults: a multicenter prospective survey in ICUs and wards of 24 hospitals. French Bacteremia-Sepsis Study Group. *Am J Respir Crit Care Med* 154: 617-624
30. Brzezinski A (1997) Melatonin in humans. *N Engl J Med* 336: 186-195
31. Buras J A, Holzmann B, Sitkovsky M (2005) Animal models of sepsis: setting the stage. *Nat Rev Drug Discov* 4: 854-865
32. Bustin S A, Benes V, Garson J A, et al. (2009) The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 55: 611-622
33. Cannon C M, Holthaus C V, Zubrow M T, et al. (2013) The GENESIS Project (GENeralized Early Sepsis Intervention Strategies): A Multicenter Quality Improvement Collaborative. *Journal of intensive care medicine* 28: 355
34. Cardinali D P, Lynch H J, Wurtman R J (1972) Binding of melatonin to human and rat plasma proteins. *Endocrinology* 91: 1213-1218

35. Carloni S, Albertini M C, Galluzzi L, et al. (2014) Melatonin reduces endoplasmic reticulum stress and preserves sirtuin 1 expression in neuronal cells of newborn rats after hypoxia-ischemia. *J Pineal Res* 57: 192-199
36. Carrillo-Vico A, Calvo J R, Abreu P, et al. (2004) Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and its physiological significance: possible role as intracrine, autocrine, and/or paracrine substance. *FASEB J* 18: 537-539
37. Carrillo-Vico A, Lardone P J, Naji L, et al. (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
38. Chakrabarti A, Chen A W, Varner J D (2011) A Review of the Mammalian Unfolded Protein Response. *Biotechnology and bioengineering* 108: 2777-2793
39. Chambers J E, Marciniak S J (2014) Cellular Mechanisms of Endoplasmic Reticulum Stress Signaling in Health and Disease. 2. Protein misfolding and ER stress. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 307: C657-C670
40. Chan C-P, Mak T-Y, Chin K-T, Ng I O-L, Jin D-Y (2010) N-linked glycosylation is required for optimal proteolytic activation of membrane-bound transcription factor CREB-H. *Journal of Cell Science* 123: 1438-1448
41. Chaudhari N, Talwar P, Parimisetty A, Lefebvre d'Hellencourt C, Ravanan P (2014) A Molecular Web: Endoplasmic Reticulum Stress, Inflammation, and Oxidative Stress. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 8: 213
42. Chen X-L, Zhang Q, Zhao R, et al. (2003) Rac1 and Superoxide Are Required for the Expression of Cell Adhesion Molecules Induced by Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  in Endothelial Cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 305: 573-580
43. Chen Y, Brandizzi F IRE1: ER stress sensor and cell fate executor. *Trends in Cell Biology* 23: 547-555
44. Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 162: 156-159
45. Cichoż-Lach H, Michalak A (2014) Oxidative stress as a crucial factor in liver diseases. *World Journal of Gastroenterology* : WJG 20: 8082-8091

46. Cizmeci M N, Kara S, Kanburoglu M K, et al. (2014) Detection of cord blood hepcidin levels as a biomarker for early-onset neonatal sepsis. *Medical Hypotheses* 82: 310-312
47. Cohen J (2002) The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 420: 885-891
48. Cook-Mills J M, Marchese M E, Abdala-Valencia H (2011) Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Expression and Signaling During Disease: Regulation by Reactive Oxygen Species and Antioxidants. *Antioxidants & Redox Signaling* 15: 1607-1638
49. Corvaja C (2008) Introduction to Electron Paramagnetic Resonance. John Wiley & Sons, Inc., Place
50. Cross A S, Opal S M, Sadoff J C, Gemski P (1993) Choice of bacteria in animal models of sepsis. *Infection and Immunity* 61: 2741-2747
51. Crouser E D (2004) Mitochondrial dysfunction in septic shock and multiple organ dysfunction syndrome. *Mitochondrion* 4: 729
52. Crouser E D, Julian M W, Huff J E, et al. (2004) Abnormal permeability of inner and outer mitochondrial membranes contributes independently to mitochondrial dysfunction in the liver during acute endotoxemia. *Critical Care Medicine* 32: 478
53. Cullinan S B, Zhang D, Hannink M, et al. (2003) Nrf2 Is a Direct PERK Substrate and Effector of PERK-Dependent Cell Survival. *Molecular and Cellular Biology* 23: 7198-7209
54. Cutando A, Lopez-Valverde A, Arias-Santiago S, J D E V, R G D E D (2012) Role of melatonin in cancer treatment. *Anticancer Res* 32: 2747-2753
55. Dare A J, Phillips A R J, Hickey A J R, et al. (2009) A systematic review of experimental treatments for mitochondrial dysfunction in sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Free Radical Biology and Medicine* 47: 1517
56. Dasuri K, Zhang L, Keller J N (2013) Oxidative stress, neurodegeneration, and the balance of protein degradation and protein synthesis. *Free Radical Biology and Medicine* 62: 170-185
57. Daulat A M, Maurice P, Froment C, et al. (2007) Purification and Identification of G Protein-coupled Receptor Protein Complexes under Native Conditions. *Molecular & Cellular Proteomics* 6: 835-844

58. Davies M J (2016) Detection and characterisation of radicals using electron paramagnetic resonance (EPR) spin trapping and related methods. *Methods* 109: 21-30
59. Dellinger R P, Levy M M, Rhodes A, et al. (2013) Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012. *Critical Care Medicine* 41: 580
60. Devasagayam T P, Bloor K K, Ramasarma T (2003) Methods for estimating lipid peroxidation: an analysis of merits and demerits. *Indian journal of biochemistry & biophysics* 40: 300
61. Di W L, Kadva A, Johnston A, Silman R (1997) Variable bioavailability of oral melatonin. *N Engl J Med* 336: 1028-1029
62. Dikalov S, Skatchkov M, Fink B, Bassenge E (1997) Quantification of Superoxide Radicals and Peroxynitrite in Vascular Cells Using Oxidation of Sterically Hindered Hydroxylamines and Electron Spin Resonance. *Nitric Oxide* 1: 423-431
63. Dikalov S, Griendling K K, Harrison D G (2007) Measurement of Reactive Oxygen Species in Cardiovascular Studies. *Hypertension* 49: 717-727
64. Dikalov S I, Kirilyuk I A, Voinov M, Grigor'ev I A (2011) EPR Detection of Cellular and Mitochondrial Superoxide Using Cyclic Hydroxylamines. *Free radical research* 45: 417-430
65. Drechsler S, Weixelbaumer K M, Weidinger A, et al. (2015) Why do they die? Comparison of selected aspects of organ injury and dysfunction in mice surviving and dying in acute abdominal sepsis. *Intensive Care Medicine Experimental* 3: 12
66. Dröse S, Brandt U (2012) Molecular mechanisms of superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Adv Exp Med Biol* 748: 145-169
67. Dyson A, Singer M (2009) Animal models of sepsis: Why does preclinical efficacy fail to translate to the clinical setting? *Critical Care Medicine* 37: S30-S37
68. El Frargy M, El-Sharkawy H M, Attia G F (2015) Use of melatonin as an adjuvant therapy in neonatal sepsis. *Journal of neonatal-perinatal medicine* 8: 227-232

69. Endo M, Oyadomari S, Suga M, Mori M, Gotoh T (2005) The ER Stress Pathway Involving CHOP Is Activated in the Lungs of LPS-Treated Mice. *Journal of Biochemistry* 138: 501-507
70. Engel C, Brunkhorst F M, Bone H G, et al. (2007) Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. *Intensive care medicine* 33: 606
71. Erbaş O, Ergenoglu A M, Akdemir A, Yeniel A Ö, Taskiran D (2013) Comparison of melatonin and oxytocin in the prevention of critical illness polyneuropathy in rats with experimentally induced sepsis. *Journal of Surgical Research* 183: 313-320
72. Eskesen T G, Wetterslev M, Perner A (2016) Systematic review including re-analyses of 1148 individual data sets of central venous pressure as a predictor of fluid responsiveness. *Intensive Care Med* 42: 324-332
73. Fan L M, Li J-M (2014) Evaluation of methods of detecting cell reactive oxygen species production for drug screening and cell cycle studies. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 70: 40-47
74. Fink M P (2002) Bench-to-bedside review: Cytopathic hypoxia. *Critical Care (London, England)* 6: 491
75. Fink M P (2014) Animal models of sepsis. *Virulence* 5: 143-153
76. Fink T, Heymann P, Taha-Melitz S, et al. (2013) Dobutamine Pretreatment Improves Survival, Liver Function, and Hepatic Microcirculation After Polymicrobial Sepsis in Rat. *Shock* 40: 129-135
77. Fink T, Glas M, Wolf A, et al. (2014) Melatonin Receptors Mediate Improvements of Survival in a Model of Polymicrobial Sepsis. *Critical Care Medicine* 42: e22-e31
78. Fink T, Wolf A, Maurer F, et al. (2015) Volatile Organic Compounds during Inflammation and Sepsis in Rats: A Potential Breath Test Using Ion-mobility Spectrometry. *Anesthesiology* 122: 117-126
79. Fourtillan J B, Brisson A M, Gobin P, et al. (2000) Bioavailability of melatonin in humans after day-time administration of D(7) melatonin. *Biopharm Drug Dispos* 21: 15-22

80. Francis P L, Leone A M, Young I M, Stovell P, Silman R E (1987) Gas chromatographic-mass spectrometric assay for 6-hydroxymelatonin sulfate and 6-hydroxymelatonin glucuronide in urine. *Clin Chem* 33: 453-457
81. Freise H, Bruckner U B, Spiegel H U (2001) Animal models of sepsis. *J Invest Surg* 14: 195-212
82. Fu H Y, Okada K-i, Liao Y, et al. (2010) Ablation of C/EBP Homologous Protein Attenuates Endoplasmic Reticulum-Mediated Apoptosis and Cardiac Dysfunction Induced by Pressure Overload. *Circulation* 122: 361-369
83. Furukawa Y, O'Halloran T V (2006) Posttranslational modifications in Cu,Zn-superoxide dismutase and mutations associated with amyotrophic lateral sclerosis. *Antioxid Redox Signal* 8: 847-867
84. Galley H F (2011) Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in sepsis. *British journal of anaesthesia* 107: 57
85. Galley H F, Lowes D A, Allen L, et al. (2014) Melatonin as a potential therapy for sepsis: a phase I dose escalation study and an ex vivo whole blood model under conditions of sepsis. *Journal of Pineal Research* 56: 427-438
86. Genestra M (2007) Oxy radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cellular signalling* 19: 1807
87. Ghosh R, Gilda J E, Gomes A V (2014) The necessity of and strategies for improving confidence in the accuracy of western blots. *Expert review of proteomics* 11: 549-560
88. Giannoulia-Karantana A, Vlachou A, Polychronopoulou S, Papassotiriou I, Chrousos G P (2006) Melatonin and immunomodulation: connections and potential clinical applications. *Neuroimmunomodulation* 13: 133-144
89. Gilmore W J, Hartmann G, Piquette-Miller M, Marriott J, Kirby G M (2003) Effects of lipopolysaccharide-stimulated inflammation and pyrazole-mediated hepatocellular injury on mouse hepatic Cyp2a5 expression. *Toxicology* 184: 211-226
90. Ginzinger D G (2002) Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Exp Hematol* 30: 503-512

91. Gitto E, Karbownik M, Reiter R J, et al. (2001) Effects of melatonin treatment in septic newborns. *Pediatr Res* 50: 756-760
92. Glorieux C, Zamocky M, Sandoval J M, Verrax J, Calderon P B (2015) Regulation of catalase expression in healthy and cancerous cells. *Free Radical Biology and Medicine* 87: 84-97
93. GOLIAS C, TSOUTSI E, MATZIRIDIS A, et al. (2007) Leukocyte and Endothelial Cell Adhesion Molecules in Inflammation Focusing on Inflammatory Heart Disease. *In Vivo* 21: 757-769
94. Griendling K K, Touyz R M, Zweier J L, et al. (2016) Measurement of Reactive Oxygen Species, Reactive Nitrogen Species, and Redox-Dependent Signaling in the Cardiovascular System: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation research* 119: e39-e75
95. Gu W-J, Wang F, Bakker J, Tang L, Liu J-C (2014) The effect of goal-directed therapy on mortality in patients with sepsis - earlier is better: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Critical Care* 18: 570
96. Guescini M, Sisti D, Rocchi M B, et al. (2013) Accurate and precise DNA quantification in the presence of different amplification efficiencies using an improved Cy0 method. *PLoS One* 8: e68481
97. Gurlo T, Rivera J F, Butler A E, et al. (2016) CHOP Contributes to, But Is Not the Only Mediator of, IAPP Induced  $\beta$ -Cell Apoptosis. *Molecular Endocrinology* 30: 446-454
98. Halliwell B (1990) How to characterize a biological antioxidant. *Free Radic Res Commun* 9: 1-32
99. Harding H P, Zhang Y, Zeng H, et al. An Integrated Stress Response Regulates Amino Acid Metabolism and Resistance to Oxidative Stress. *Molecular Cell* 11: 619-633
100. Harris T K, Keshwani M M (2009) 2nd Edition Academic Press, Place
101. Heid C A, Stevens J, Livak K J, Williams P M (1996) Real time quantitative PCR. *Genome Res* 6: 986-994
102. 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

103. Hoffmann J, Ospelt M, Troidl C, et al. (2014) Sham surgery and inter-individual heterogeneity are major determinants of monocyte subset kinetics in a mouse model of myocardial infarction. *PloS one* 9: e98456-e98456
104. Hu W, Deng C, Ma Z, et al. (2017) Utilizing melatonin to combat bacterial infections and septic injury. *Br J Pharmacol* 174: 754-768
105. Ingersoll M A, Platt A M, Potteaux S, Randolph G J (2011) Monocyte trafficking in acute and chronic inflammation. *Trends Immunol* 32: 470-477
106. Investigators A, Group A C T, Peake S L, et al. (2014) Goal-directed resuscitation for patients with early septic shock. *The New England journal of medicine* 371: 1496
107. Jiang S-J, Hsu S-Y, Deng C-R, et al. (2013) Dextromethorphan Attenuates LPS-Induced Adhesion Molecule Expression in Human Endothelial Cells. *Microcirculation* 20: 190-201
108. Jiang X, Kanda T, Tanaka T, et al. (2013) Lipopolysaccharide blocks induction of unfolded protein response in human hepatoma cell lines. *Immunology Letters* 152: 8-15
109. Kang J H (2013) Modification and inactivation of Cu,Zn-superoxide dismutase by the lipid peroxidation product, acrolein. *BMB Reports* 46: 555-560
110. Karahashi H, Amano F (2000) Lipopolysaccharide (LPS)-induced cell death of C3H mouse peritoneal macrophages in the presence of cycloheximide: different susceptibilities of C3H/HeN and C3H/HeJ mice macrophages. *J Endotoxin Res* 6: 33-39
111. Khan M M, Yang W L, Wang P (2015) ENDOPLASMIC RETICULUM STRESS IN SEPSIS. *Shock* 44: 294-304
112. Kim I, Xu W, Reed J C (2008) Cell death and endoplasmic reticulum stress: disease relevance and therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov* 7: 1013-1030
113. Kirkham P A, Barnes P J Oxidative Stress in COPD. *CHEST* 144: 266-273
114. Kleber A, Altmeyer S, Wolf B, et al. (2014) Impact of melatonin receptor deletion on intracellular signaling in spleen cells of mice after polymicrobial sepsis. *Inflamm Res* 63: 1023-1033

115. Klein D C, Voisin P, Namboodiri M A A (1985) The pineal family of aromatic amine N-acetyltransferases. *BioEssays* 3: 217-220
116. Koperna T, Schulz F (2000) Relaparotomy in peritonitis: prognosis and treatment of patients with persisting intraabdominal infection. *World J Surg* 24: 32-37
117. Kozlov A V, Duvigneau J C, Miller I, et al. (2009) Endotoxin causes functional endoplasmic reticulum failure, possibly mediated by mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1792: 521-530
118. Kumar A, Roberts D, Wood K E, et al. (2006) Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Critical Care Medicine* 34: 1589
119. Kurien B T, Scofield R H (2015) Western blotting: an introduction. *Methods Mol Biol* 1312: 17-30
120. Kuzkaya N, Weissmann N, Harrison D G, Dikalov S (2003) Interactions of peroxynitrite, tetrahydrobiopterin, ascorbic acid, and thiols: implications for uncoupling endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 278: 22546-22554
121. Kvetnoy I M (1999) Extrapineal melatonin: location and role within diffuse neuroendocrine system. *Histochem J* 31: 1-12
122. Laemmli U K (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
123. Lalor P F, Shields P, Grant A J, Adams D H (2002) Recruitment of lymphocytes to the human liver. *Immunol Cell Biol* 80: 52-64
124. Lardizábal M N, Nocito A L, Daniele S M, et al. (2012) Reference Genes for Real-Time PCR Quantification of MicroRNAs and Messenger RNAs in Rat Models of Hepatotoxicity. *PLoS ONE* 7: e36323
125. Latifi S Q, O'Riordan M A, Levine A D, Stallion A (2004) Persistent elevation of serum interleukin-6 in intraabdominal sepsis identifies those with prolonged length of stay. *Journal of Pediatric Surgery* 39: 1548-1552
126. Lee M-W, Chanda D, Yang J, et al. Regulation of Hepatic Gluconeogenesis by an ER-Bound Transcription Factor, CREBH. *Cell Metabolism* 11: 331-339

127. Lelubre C, Anselin S, Zouaoui Boudjeltia K, Biston P, Piagnerelli M (2013) Interpretation of C-Reactive Protein Concentrations in Critically Ill Patients. *BioMed Research International* 2013: 124021
128. Lentsch A B, Ward P A (2000) Regulation of inflammatory vascular damage. *The Journal of Pathology* 190: 343-348
129. León J, Escames G, Rodríguez M I, et al. (2006) Inhibition of neuronal nitric oxide synthase activity by N1-acetyl-5-methoxykynuramine, a brain metabolite of melatonin. *Journal of Neurochemistry* 98: 2023-2033
130. Levy M, Rhodes A, Phillips G, et al. (2014) Surviving Sepsis Campaign: association between performance metrics and outcomes in a 7.5-year study. *Intensive care medicine* 40: 1623
131. Levy M M, Fink M P, Marshall J C, et al. (2003) 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive care medicine* 29: 530
132. Levy R J (2007) Mitochondrial dysfunction, bioenergetic impairment, and metabolic down-regulation in sepsis. *Shock (Augusta, Ga.)* 28: 24
133. Lewerenz J, Maher P (2009) Basal Levels of eIF2 $\alpha$  Phosphorylation Determine Cellular Antioxidant Status by Regulating ATF4 and xCT Expression. *The Journal of Biological Chemistry* 284: 1106-1115
134. Lewis A J, Seymour C W, Rosengart M R (2016) Current Murine Models of Sepsis. *Surgical Infections* 17: 385-393
135. Li Y, Guo Y, Tang J, Jiang J, Chen Z (2014) New insights into the roles of CHOP-induced apoptosis in ER stress. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 46: 629-640
136. Lilley E, Armstrong R, Clark N, et al. (2015) Refinement of Animal Models of Sepsis and Septic Shock. *Shock* 43: 304-316
137. Livak K J, Schmittgen T D (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

138. Lowes D A, Almawash A M, Webster N R, Reid V L, Galley H F (2011) Melatonin and structurally similar compounds have differing effects on inflammation and mitochondrial function in endothelial cells under conditions mimicking sepsis. *British Journal of Anaesthesia* 107: 193-201
139. Lowes D A, Webster N R, Murphy M P, Galley H F (2013) Antioxidants that protect mitochondria reduce interleukin-6 and oxidative stress, improve mitochondrial function, and reduce biochemical markers of organ dysfunction in a rat model of acute sepsis. *BJA: British Journal of Anaesthesia* 110: 472-480
140. Lu Y-C, Yeh W-C, Ohashi P S (2008) LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* 42: 145-151
141. Lugrin J, Rosenblatt-Velin N, Roumen P, Lucas L (2013) The role of oxidative stress during inflammatory processes. *Biological chemistry* 395: 203
142. Luo S-F, Fang R-Y, Hsieh H-L, et al. (2010) Involvement of MAPKs and NF- $\kappa$ B in tumor necrosis factor  $\alpha$ -induced vascular cell adhesion molecule 1 expression in human rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis & Rheumatism* 62: 105-116
143. Ma T, Han L, Gao Y, et al. (2008) The Endoplasmic Reticulum Stress-Mediated Apoptosis Signal Pathway Is Involved in Sepsis-Induced Abnormal Lymphocyte Apoptosis. *European Surgical Research* 41: 219-225
144. Ma Y, Brewer J W, Alan Diehl J, Hendershot L M (2002) Two Distinct Stress Signaling Pathways Converge Upon the CHOP Promoter During the Mammalian Unfolded Protein Response. *Journal of Molecular Biology* 318: 1351-1365
145. Maestroni G J (1996) Melatonin as a therapeutic agent in experimental endotoxic shock. *J Pineal Res* 20: 84-89
146. Maier S, Traeger T, Entleutner M, et al. (2004) CECAL LIGATION AND PUNCTURE VERSUS COLON ASCENDENS STENT PERITONITIS: TWO DISTINCT ANIMAL MODELS FOR POLYMICROBIAL SEPSIS. *Shock* 21: 505-512
147. Malhi H, Kaufman R J Endoplasmic reticulum stress in liver disease. *Journal of Hepatology* 54: 795-809
148. Marciniak S J, Yun C Y, Oyadomari S, et al. (2004) CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes & Development* 18: 3066-3077

149. Marik P E (2014) Early management of severe sepsis: concepts and controversies. *Chest* 145: 1407
150. Marik P E, Taeb A M (2017) SIRS, qSOFA and new sepsis definition. *J Thorac Dis* 9: 943-945
151. Martinez M L, Ferrer R, Torrents E, et al. (2017) Impact of Source Control in Patients With Severe Sepsis and Septic Shock. *Crit Care Med* 45: 11-19
152. MARTY C, MISSET B, TAMION F, et al. (1994) Circulating interleukin-8 concentrations in patients with multiple organ failure of septic and nonseptic origin. *Critical Care Medicine* 22: 673-679
153. Mathes A M (2010) Hepatoprotective actions of melatonin: Possible mediation by melatonin receptors. *World Journal of Gastroenterology* : WJG 16: 6087-6097
154. Mauriz J L, Molpeceres V, García-Mediavilla M V, et al. (2007) Melatonin prevents oxidative stress and changes in antioxidant enzyme expression and activity in the liver of aging rats. *Journal of Pineal Research* 42: 222-230
155. Mayo J C, Sainz R M, Uria H, et al. (1998) Melatonin prevents apoptosis induced by 6-hydroxydopamine in neuronal cells: implications for Parkinson's disease. *J Pineal Res* 24: 179-192
156. Mayr B, Montminy M (2001) Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 599-609
157. Meusser B, Hirsch C, Jarosch E, Sommer T (2005) ERAD: the long road to destruction. *Nat Cell Biol* 7: 766-772
158. Misra J, Chanda D, Kim D-K, et al. (2014) Orphan Nuclear Receptor Erry Induces C-Reactive Protein Gene Expression through Induction of ER-Bound Bzip Transmembrane Transcription Factor CREBH. *PLoS ONE* 9: e86342
159. Mohazzab K M, Kaminski P M, Wolin M S (1994) NADH oxidoreductase is a major source of superoxide anion in bovine coronary artery endothelium. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 266: H2568-H2572

160. Mullis K, Faloona F, Scharf S, et al. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1: 263-273
161. Nee P A, Rivers E P (2011) The end of the line for the Surviving Sepsis Campaign, but not for early goal-directed therapy. *Emergency Medicine Journal* 28: 3
162. Niki E (2014) Antioxidants: basic principles, emerging concepts, and problems. *Biomed J* 37: 106-111
163. Ogata M, Hino S-i, Saito A, et al. (2006) Autophagy Is Activated for Cell Survival after Endoplasmic Reticulum Stress. *Molecular and Cellular Biology* 26: 9220-9231
164. Oliveira C F, Botoni F A, Oliveira C R, et al. (2013) Procalcitonin versus C-reactive protein for guiding antibiotic therapy in sepsis: a randomized trial. *Crit Care Med* 41: 2336-2343
165. Omori Y, Imai J-i, Watanabe M, et al. (2001) CREB-H: a novel mammalian transcription factor belonging to the CREB/ATF family and functioning via the box-B element with a liver-specific expression. *Nucleic Acids Research* 29: 2154-2162
166. Ortiz F, García J A, Acuña-Castroviejo D, et al. (2014) The beneficial effects of melatonin against heart mitochondrial impairment during sepsis: inhibition of iNOS and preservation of nNOS. *Journal of Pineal Research* 56: 71-81
167. Otero-Anton E, Gonzalez-Quintela A, Lopez-Soto A, et al. (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
168. Oyadomari S, Mori M (2003) Roles of CHOP//GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ* 11: 381-389
169. Ozdemir D, Uysal N, Tugyan K, et al. (2007) The effect of melatonin on endotoxemia-induced intestinal apoptosis and oxidative stress in infant rats. *Intensive Care Medicine* 33: 511-516
170. Pablos M I, Reiter R J, Ortiz G G, et al. (1998) Rhythms of glutathione peroxidase and glutathione reductase in brain of chick and their inhibition by light. *Neurochemistry International* 32: 69-75

171. Pacher P, Beckman J S, Liaudet L (2007) Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiological Reviews* 87: 315
172. Pandi-Perumal S R, Trakht I, Srinivasan V, et al. (2008) Physiological effects of melatonin: Role of melatonin receptors and signal transduction pathways. *Progress in Neurobiology* 85: 335-353
173. Pisoschi A M, Pop A (2015) The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry* 97: 55-74
174. Poeggeler B, Reiter R J, Tan D X, Chen L D, Manchester L C (1993) Melatonin, hydroxyl radical-mediated oxidative damage, and aging: A hypothesis. *Journal of pineal research* 14: 151-168
175. Pro C I, Yealy D M, Kellum J A, et al. (2014) A randomized trial of protocol-based care for early septic shock. *The New England journal of medicine* 370: 1683
176. Puskarich M A, Trzeciak S, Shapiro N I, et al. (2011) Association between timing of antibiotic administration and mortality from septic shock in patients treated with a quantitative resuscitation protocol. *Critical Care Medicine* 39: 2066
177. Ramachandran G (2014) Gram-positive and gram-negative bacterial toxins in sepsis: A brief review. *Virulence* 5: 213-218
178. Reinhart K, Brunkhorst F M, Bone H G, et al. (2010) Prävention, Diagnose, Therapie und Nachsorge der Sepsis. *Der Anaesthetist* 59: 347
179. Reiter R J (1991) Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr Rev* 12: 151-180
180. Reiter R J, Paredes S D, Manchester L C, Tan D X (2009) Reducing oxidative/nitrosative stress: a newly-discovered genre for melatonin. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 44: 175-200
181. Reiter R J, Mayo J C, Tan D X, et al. (2016) Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers. *J Pineal Res* 61: 253-278
182. Reynolds F D, Dauchy R, Blask D, et al. (2003) The pineal gland hormone melatonin improves survival in a rat model of sepsis/shock induced by zymosan A. *Surgery* 134: 474-479

183. Rhodes A, Phillips G, Beale R, et al. (2015) The Surviving Sepsis Campaign bundles and outcome: results from the International Multicentre Prevalence Study on Sepsis (the IMPReSS study). *Intensive Care Medicine* 41: 1620-1628
184. Rhodes A, Evans L E, Alhazzani W, et al. (2017) Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. *Crit Care Med* 45: 486-552
185. Rivers E, Nguyen B, Havstad S, et al. (2001) Early Goal-Directed Therapy in the Treatment of Severe Sepsis and Septic Shock. *N Engl J Med* 345: 1368
186. Rivers E P, Coba V, Whitmill M (2008) Early goal-directed therapy in severe sepsis and septic shock: a contemporary review of the literature. *Current opinion in anaesthesiology* 21: 128
187. Rodriguez C, Mayo J C, Sainz R M, et al. (2004) Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *Journal of Pineal Research* 36: 1-9
188. Russell J A, Boyd J, Nakada T, Thair S, Walley K R (2011) Molecular mechanisms of sepsis. *Contributions to microbiology* 17: 48
189. Šafránek R, Ishibashi N, Oka Y, et al. (2006) Modulation of inflammatory response in sepsis by proteasome inhibition. *International Journal of Experimental Pathology* 87: 369-372
190. Sambrook J, Russell D W (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*.
191. San-Miguel B, Crespo I, Sanchez D I, et al. (2015) Melatonin inhibits autophagy and endoplasmic reticulum stress in mice with carbon tetrachloride-induced fibrosis. *J Pineal Res* 59: 151-162
192. Sano R, Reed J C (2013) ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1833: 3460-3470
193. Sato H, Nomura S, Maebara K, et al. (2004) Transcriptional control of cystine/glutamate transporter gene by amino acid deprivation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 325: 109-116
194. Scheiermann P, Hoegl S, Revermann M, et al. (2009) Cecal Ligation and Incision: An Acute Onset Model of Severe Sepsis in Rats. *Journal of Surgical Research* 151: 132

195. Scheiermann P, Hoegl S, Hofstetter C, et al. (2011) Comparing hemodynamics, blood gas analyses and proinflammatory cytokines in endotoxemic and severely septic rats. *International Immunopharmacology* 11: 719-723
196. Schnoor M, Alcaide P, Voisin M-B, van Buul J D (2015) Crossing the Vascular Wall: Common and Unique Mechanisms Exploited by Different Leukocyte Subsets during Extravasation. *Mediators of Inflammation* 2015: 946509
197. Schottmüller H (1914) Wesen und Behandlung der Sepsis. *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin* 31: 257
198. Schroder M, Kaufman R J (2005) ER stress and the unfolded protein response. *Mutat Res* 569: 29-63
199. Şener G, Toklu H, Kapucu C, et al. (2005) Melatonin Protects Against Oxidative Organ Injury in a Rat Model of Sepsis. *Surgery Today* 35: 52-59
200. Shao D, Oka S-i, Brady C D, et al. (2012) Redox modification of cell signaling in the cardiovascular system. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology; Special Section on Post-translational Modification* 52: 550
201. Sheng Y, Abreu I A, Cabelli D E, et al. (2014) Superoxide Dismutases and Superoxide Reductases. *Chemical Reviews* 114: 3854-3918
202. Shin E-J, Chung Y H, Le H-L T, et al. (2015) Melatonin Attenuates Memory Impairment Induced by Klotho Gene Deficiency Via Interactive Signaling Between MT2 Receptor, ERK, and Nrf2-Related Antioxidant Potential. *International Journal of Neuropsychopharmacology* 18: pyu105
203. Singer M, Deutschman C S, Seymour C W, et al. (2016) The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 315: 801-810
204. Siti H N, Kamisah Y, Kamsiah J (2015) The role of oxidative stress, antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease (a review). *Vascular Pharmacology* 71: 40-56
205. Sommansson A, Nylander O, Sjoblom M (2013) Melatonin decreases duodenal epithelial paracellular permeability via a nicotinic receptor-dependent pathway in rats in vivo. *J Pineal Res* 54: 282-291

206. Sozen E, Karademir B, Ozer N K (2015) Basic mechanisms in endoplasmic reticulum stress and relation to cardiovascular diseases. *Free Radical Biology and Medicine* 78: 30-41
207. Strassman R J, Qualls C R, Lisansky E J, Peake G T (1991) Elevated rectal temperature produced by all-night bright light is reversed by melatonin infusion in men. *J Appl Physiol* (1985) 71: 2178-2182
208. Suragani R N V S, Zachariah R S, Velazquez J G, et al. (2012) Heme-regulated eIF2 $\alpha$  kinase activated Atf4 signaling pathway in oxidative stress and erythropoiesis. *Blood* 119: 5276-5284
209. Swirski F K, Nahrendorf M, Etzrodt M, et al. (2009) Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science* 325: 612-616
210. Takeuchi O, Akira S (2010) Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell* 140: 805
211. Tan D-X, Manchester L C, Terron M P, Flores L J, Reiter R J (2007) One molecule, many derivatives: A never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? *Journal of Pineal Research* 42: 28-42
212. Teske B F, Fusakio M E, Zhou D, et al. (2013) CHOP induces activating transcription factor 5 (ATF5) to trigger apoptosis in response to perturbations in protein homeostasis. *Molecular Biology of the Cell* 24: 2477-2490
213. Torres-Farfan C, Richter H G, Rojas-Garcia P, et al. (2003) mt1 Melatonin receptor in the primate adrenal gland: inhibition of adrenocorticotropin-stimulated cortisol production by melatonin. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 450-458
214. Traeger T, Koerner P, Kessler W, et al. (2010) Colon ascendens stent peritonitis (CASP)--a standardized model for polymicrobial abdominal sepsis. *J Vis Exp*
215. Trzeciak S, Cinel I, Dellinger R P, et al. (2008) Resuscitating the Microcirculation in Sepsis: The Central Role of Nitric Oxide, Emerging Concepts for Novel Therapies, and Challenges for Clinical Trials. *Academic emergency medicine : official journal of the Society for Academic Emergency Medicine* 15: 399-413
216. Tunon M J, San-Miguel B, Crespo I, et al. (2013) Melatonin treatment reduces endoplasmic reticulum stress and modulates the unfolded protein response in rabbits with lethal fulminant hepatitis of viral origin. *J Pineal Res* 55: 221-228

217. Urata Y, Honma S, Goto S, et al. (1999) Melatonin induces  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase mediated by activator protein-1 in human vascular endothelial cells. *Free Radical Biology and Medicine* 27: 838-847
218. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, et al. (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39: 44-84
219. van Berlo D, Wessels A, Boots A W, et al. (2010) Neutrophil-derived ROS contribute to oxidative DNA damage induction by quartz particles. *Free Radical Biology and Medicine* 49: 1685
220. van Huizen R, Martindale J L, Gorospe M, Holbrook N J (2003) P58IPK, a Novel Endoplasmic Reticulum Stress-inducible Protein and Potential Negative Regulator of eIF2 $\alpha$  Signaling. *Journal of Biological Chemistry* 278: 15558-15564
221. Vecchi C, Montosi G, Zhang K, et al. (2009) ER Stress Controls Iron Metabolism Through Induction of Heparin. *Science (New York, N.Y.)* 325: 877-880
222. Venegas C, Garcia J A, Escames G, et al. (2012) Extrapineal melatonin: analysis of its subcellular distribution and daily fluctuations. *J Pineal Res* 52: 217-227
223. Vestweber D (2003) Commentary Lymphocyte trafficking through blood and lymphatic vessels: more than just selectins, chemokines and integrins. *European Journal of Immunology* 33: 1361-1364
224. Victor V M, Rocha M, De I F (2004) Immune cells: free radicals and antioxidants in sepsis. *International immunopharmacology* 4: 327
225. Vincent J-L, Moreno R, Takala J, et al. (1996) The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. *Intensive care medicine* 22: 707-710
226. von Gall C, Stehle J H, Weaver D R (2002) Mammalian melatonin receptors: molecular biology and signal transduction. *Cell Tissue Res* 309: 151-162
227. Wang H, Li L, Zhao M, et al. (2011) Melatonin alleviates lipopolysaccharide-induced placental cellular stress response in mice. *Journal of Pineal Research* 50: 418-426

228. Wang J E, Dahle M K, McDonald M, et al. (2003) Peptidoglycan and lipoteichoic acid in gram-positive bacterial sepsis: receptors, signal transduction, biological effects, and synergism. *Shock* 20: 402-414
229. Wang X, Ron D (1996) Stress-Induced Phosphorylation and Activation of the Transcription Factor CHOP (GADD153) by p38 MAP Kinase. *Science* 272: 1347-1349
230. Wichterman K A, Baue A E, Chaudry I H (1980) Sepsis and septic shock—A review of laboratory models and a proposal. *Journal of Surgical Research* 29: 189-201
231. Wild A C, Moinova H R, Mulcahy R T (1999) Regulation of  $\gamma$ -Glutamylcysteine Synthetase Subunit Gene Expression by the Transcription Factor Nrf2. *Journal of Biological Chemistry* 274: 33627-33636
232. Wu C-C, Chiao C-W, Hsiao G, Chen A, Yen M-H (2001) Melatonin prevents endotoxin-induced circulatory failure in rats. *Journal of Pineal Research* 30: 147-156
233. Wu J Y, Tsou M Y, Chen T H, et al. (2008) Therapeutic effects of melatonin on peritonitis-induced septic shock with multiple organ dysfunction syndrome in rats. *J Pineal Res* 45: 106-116
234. Yamamoto K, Sato T, Matsui T, et al. Transcriptional Induction of Mammalian ER Quality Control Proteins Is Mediated by Single or Combined Action of ATF6 and XBP1. *Developmental Cell* 13: 365-376
235. Yan W, Frank C L, Korth M J, et al. (2002) Control of PERK eIF2 $\alpha$  kinase activity by the endoplasmic reticulum stress-induced molecular chaperone P58IPK. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99: 15920-15925
236. Yang L, Zheng J, Xu R, et al. (2014) Melatonin suppresses hypoxia-induced migration of HUVECs via inhibition of ERK/Rac1 activation. *Int J Mol Sci* 15: 14102-14121
237. Yang Q, Mattick J S A, Orman M A, et al. (2012) Dynamics of Hepatic Gene Expression Profile in a Rat Cecal Ligation and Puncture Model. *Journal of Surgical Research* 176: 583-600
238. Zapelini P H, Rezin G T, Cardoso M R, et al. (2008) Antioxidant treatment reverses mitochondrial dysfunction in a sepsis animal model. *Mitochondrion* 8: 211-218
239. Zha L, Fan L, Sun G, et al. (2012) Melatonin sensitizes human hepatoma cells to endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *J Pineal Res* 52: 322-331

240. Zhang C, Wang G, Zheng Z, et al. (2012) ER-tethered Transcription Factor CREBH Regulates Hepatic Lipogenesis, Fatty Acid Oxidation, and Lipolysis upon Metabolic Stress. *Hepatology* (Baltimore, Md.) 55: 1070-1082
241. Zhang K, Shen X, Wu J, et al. Endoplasmic Reticulum Stress Activates Cleavage of CREBH to Induce a Systemic Inflammatory Response. *Cell* 124: 587-599
242. Zhao L, An R, Yang Y, et al. (2015) Melatonin alleviates brain injury in mice subjected to cecal ligation and puncture via attenuating inflammation, apoptosis, and oxidative stress: the role of SIRT1 signaling. *Journal of Pineal Research* 59: 230-239
243. Zhou Z, Connell M C, MacEwan D J (2007) TNFR1-induced NF-kappaB, but not ERK, p38MAPK or JNK activation, mediates TNF-induced ICAM-1 and VCAM-1 expression on endothelial cells. *Cell Signal* 19: 1238-1248
244. Zwicker K, Dikalov S, Matuschka S, et al. (1998) Oxygen radical generation and enzymatic properties of mitochondria in hypoxia/reoxygenation. *Arzneimittelforschung* 48: 629-636

## 8. Publikation

Kleber A, Kubulus D, Rössler D, Wolf B, Volk T, Speer T, Fink T (2014) Melatonin modifies cellular stress in the liver of septic mice by reducing reactive oxygen species and increasing the unfolded protein response. *Experimental and molecular pathology* 97:565-571

## 9. Dank

An dieser Stelle möchte ich mich für die Unterstützung der Menschen bedanken, ohne deren Hilfe diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre beziehungsweise nie ihre Vollendung gefunden hätte.

Hier ist zunächst mein früherer Betreuer und nun Doktorvater Herr PD Dr. Tobias Fink zu nennen, ohne dessen anhaltende Unterstützung in allen Phasen der Erstellung dieser Arbeit sie weder zustande gekommen noch ein Ende gefunden hätte. Der Kombination aus unkompliziertem Umgang und höchster Kompetenz gilt meine größte Wertschätzung.

Vielen Dank auch meiner Betreuerin Frau Dr. Astrid Kleber. Ihre guten Ideen, tatkräftige Unterstützung und Expertise waren prägend für mein experimentelles Arbeiten und trugen maßgeblich zu dessen Gelingen bei.

Herrn Prof. Dr. Thomas Volk, dem Direktor der Klinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie am Universitätsklinikum des Saarlandes, gilt mein Dank für die fortwährende Unterstützung der Forschungsarbeiten und die Ermöglichung der Mitarbeit in dieser Arbeitsgruppe.

Bei Herrn Dr. med. Dr. sc. nat. Timo Speer bedanke ich mich vielmals für die freundliche Kooperation in Planung und Durchführung der Elektronenspinresonanz-spektroskopischen Messungen.

Großer Dank gebührt Frau Beate Wolf, deren große Erfahrung, Geduld und umsichtige Art bei der Einweisung in die praktische Durchführung der molekularbiologischen Experimente unschätzbar wertvoll war. Auch Herr Dr. Alexander Wolf, seine Unterstützung bei der Einarbeitung in das tierexperimentelle Arbeiten und hilfsbereite Art müssen hier erwähnt werden.

Zuletzt aber eigentlich an vorderster Stelle ist meine Familie, insbesondere meinen Eltern Gabi und Max Rössler, zu nennen. Ohne ihre bedingungs- und grenzenlose Unterstützung in allen Bereichen wären mein Studium und diese Promotionsarbeit nicht möglich gewesen. Ihnen gilt mein tiefster Dank, nicht nur in diesem Zusammenhang.

## **10. Lebenslauf**