

**Melatoningehalt in marinen Makroalgen.
Entwicklung und Validierung quantitativer Bestimmungen
mittels HPLC und Enzymgekoppeltem Immunoassay.**

**Melatonin in marine macroalgae.
Development and validation of quantitative determinations
by HPLC and enzyme-linked immunosorbent assay**

Carsten Pape

**Ber. Polarforsch. Meeresforsch. 473 (2004)
ISSN 1618 - 3193**

<http://www.awi-bremerhaven.de/Publications/Pap2003a.pdf>

Carsten Pape

Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung
Wattenmeerstation Sylt
Hafenstraße 43
25992 List
Germany

Email: cpape@awi-bremerhaven.de

Die vorliegende Arbeit ist die inhaltlich unveränderte Fassung einer
Dissertation, die 2003 im Fachbereich Biologie der Universität Hamburg
vorgelegt wurde.

I.) Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	7
2	Summary	10
3	Einleitung	13
4	Material und Methoden	24
4.1	Versuchsorganismen.....	24
4.1.1	<i>Porphyra umbilicalis</i> (L.) J. AG.	24
4.1.2	<i>Ulva lactuca</i> (L.)	24
4.1.3	<i>Laminaria saccharina</i> (L.) LAMOUR.	24
4.1.4	<i>Palmaria palmata</i> (L.) O. KUNTZE	25
4.1.5	<i>Kappaphycus alvarezii</i> (DOTY) DOTY	25
4.1.6	<i>Pterygophora californica</i> (RUPR.)	25
4.1.7	<i>Lycopersicon esculentum</i> (MILL.)	25
4.2	Probenaufarbeitung	26
4.2.1	Extraktion mit Perchlorsäure	26
4.2.2	Extraktion mit einem Aceton-Methanol-Gemisch	27
4.2.3	Extraktion mit Ether.....	27
4.2.4	Festphasenextraktion.....	28
4.3	Bestimmung des Melatoningehalts durch Hochdruckflüssigkeits- chromatographie (HPLC) mit Fluoreszenzdetektion	29
4.3.1	HPLC zur direkten Messung des Melatonins (HPLC-1)	29
4.4	Extraktion des Melatonins aus HPLC-1-Fractionen	30
4.5	Messung von Melatonin nach Vorsäulen-Derivatisierung.....	32
4.5.1	Derivatisierung des Melatonins	32
4.5.2	HPLC zur fluorometrischen Messung des Melatoninderivats (HPLC-2).....	33
4.6	Bestimmung von Melatonin mittels Enzym-gekoppeltem Immunoassay (ELISA).....	33
4.6.1	Protokoll für ELISA-Messungen	34
4.7	Standard-Lösungen	34
4.8	Bestimmung der Ausbeute	35
4.9	Vergleich von Extraktionsmethoden	35

4.10	Einfluss der Lichtintensität während der Aufarbeitung.....	36
4.11	Tag-Nacht-Vergleiche.....	36
4.12	Einfluss der Octansulfonsäure-Konzentration auf die Retentionszeiten verschiedener Tryptophanmetabolite im HPLC-1-System	37
4.13	Fluoreszenzspektren	37
4.14	Immunoreaktivität in HPLC-Fractionen um den Melatonin-Peak	38
4.15	Einfluss der Mörserintensität	38
4.16	Stabilität beim Tiefrieren.....	38
4.17	Tagesgang bei <i>Porphyra</i>	39
4.18	Kreuzreaktivität mit N-Acetyltryptamin.....	39
4.19	Chemikalien.....	40
4.20	Statistische Auswertung	40
5	Ergebnisse	41
5.1	Messung von synthetischem Melatonin.....	41
5.1.1	Messung von Melatonin durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie mit Fluoreszenzdetektion (HPLC-1)	41
5.1.2	Auffangen der Melatoninfraktion von HPLC-1-Läufen.....	45
5.1.3	Messung von Melatonin durch Enzym-gekoppelten Immunoassay.....	45
5.1.4	Quantifizierung von Melatonin nach Vorsäulenderivatisierung... ..	49
5.2	Messung von Melatonin in Extrakten von Makroalgen	52
5.2.1	Direkte Messung von Melatonin in Algenextrakten durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie mit Fluoreszenzdetektion	52
5.2.2	Messung von Melatonin in Algenextrakten durch Enzym-gekoppelten Immunoassay nach präparativer HPLC (LC-ELISA)	56
5.2.4	Korrelation zwischen Quantifizierungen des Melatoningehalts durch ELISA und Hochdruckflüssigkeitschromatographie nach Vorsäulenderivatisierung in HPLC-aufgereinigten Extrakten.....	62
5.3	Extraktion von Melatonin aus Makroalgen.....	64
5.3.1	Vergleich der Extraktionsmethoden sowie zwischen HPLC-aufgereinigten und direkten ELISA-Quantifizierungen	64

Inhaltsverzeichnis

5.3.2	Stabilität des Melatonins in Algenproben während der Lagerung bei -80°C unter Lichtausschluss.....	67
5.3.3	Einfluss des Zellaufschlusses auf die gefundenen Melatoninkonzentrationen und auf die Wiederfindungsraten zugesetzten Melatoninstandards	68
5.3.4	Einfluss der Beleuchtungsstärke während der Aufarbeitung auf die beobachteten Melatoninwerte	70
5.4	Melatonin in marinen Makroalgen unter chronobiologischen Gesichtspunkten.....	71
5.5	Melatonin in <i>Lycopersicon</i>	74
6	Diskussion	78
7	Literaturverzeichnis	89
8	Danksagung	103

Verzeichnis der Abkürzungen

%	Prozent
°C	Grad Celsius
5-HT	5-Hydroxytryptophan
5-MT	5-Methoxytryptophan
5-MTL	5-Methoxytryptophol
AAA	Acyl-Acylamidase
AFMK	N ¹ -Acetyl-N ² -formyl-5-methoxykynuramin
amol	atomol; 10 ⁻¹⁸ mol
ECD	elektrochemische Detektion
EDTA	Ethylendiaminotetraacetat
ELISA	enzyme linked immunosorbant assay; (Enzym-gekoppelter Immunoassay)
<i>et al.</i>	et alteri (und Andere)
FD	Fluoreszenzdetektor
FG	Frischgewicht
fmol	femtomol; 10 ⁻¹⁵ mol
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GSH	reduziertes Glutathion
h	Stunden
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HPLC	high performance liquid chromatography (Hochdruckflüssig- keitschromatographie)
IAA	Indol-3-Essigsäure (Heteroauxin)
IC ₅₀	inhibitory concentration 50%;
l	Liter
LC-ELISA	Enzym-gekoppelter Immunoassay nach vorangegangener flüssigkeitschromatographischer Aufreinigung
LD	Licht-Dunkel-Wechsel
M	molar

Verzeichnis der Abkürzungen

MESZ	Mitteleuropäische Sommerzeit
MIAA	Methoxy-Indolessigsäure
min.	Minute
nA	Nanoampère
N-Ac-TM	N-Acetyltryptamin
NaOH	Natriumhydroxid
NAT	N-Acetyltransferase
nm	Nanometer
OSA	1-Octansulfonsäure
PC	personal computer
PCA	Perchlorsäure
PES	Provasoli enriched seawater
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen- konzentration
RIA	Radioimmunoassay
RT	Retentionszeit
TM	Tryptamin
TMB	Tetramethylbenzidin
Tris	Tris(-hydroxymethyl-)aminomethan
UV	Ultraviolett
vgl.	vergleiche
w/v	weight per volume (Gewicht pro Volumen)
z.B.	zum Beispiel

1 Zusammenfassung

Melatonin, N-Acetyl-5-Methoxytryptamin, wurde bei Wirbeltieren als eine wichtige Komponente des Systems zur Wahrnehmung und Weiterleitung photoperiodischer Informationen identifiziert. Bei zahlreichen dahingehend untersuchten Vertebraten wurde ein ausgeprägter Rhythmus der Melatoninkonzentration mit höheren Werten während der Nacht beobachtet und der Tryptophanmetabolit wird daher als endogener Mediator des Signals Dunkelheit angesehen. Neben der Synchronisation zahlreicher circadianer Prozesse dient das Hormon bei vielen Organismen auch der Synchronisation circannualer Rhythmen und steuert die saisonale Reproduktion.

Darüber hinaus erwies sich Melatonin als potentes Antioxidanz und hocheffektiver Radikalfänger. Es wird vermutet, dass diese artunabhängige Eigenschaft die primäre Funktion von Melatonin darstellt und erst sekundär, aufgrund der chemischen Eigenschaften als lichtsensitives Molekül, die Funktion als Vermittler photoperiodischer Informationen evolvierte.

Die Entdeckung von Melatonin in dem marinen Dinoflagellaten *Lingulodinium polyedrum* (syn. *Gonyaulax polyedra*) eröffnete das Feld der Erforschung von Melatonin in phototrophen Organismen. Ähnlich wie in Vertebraten wurde in *L. polyedrum* eine diurnale sowie circadiane Rhythmik des Melatoningehalts nachgewiesen und in Applikationsversuchen konnte durch Melatonin die Kurztagreaktion der Ausbildung asexueller Zysten induziert werden. Es konnte darüber hinaus der Schutz vor sonst lethalem oxidativen Stress durch erhöhte, physiologisch aber mögliche Melatoninkonzentrationen demonstriert werden.

Neben dem Vorkommen von Melatonin in Vertebraten, Invertebraten, Einzellern und Prokaryoten wurde Melatonin erstmals 1995 in zahlreichen Angiospermen nachgewiesen. Bei den bislang untersuchten höheren Pflanzen konnte lediglich für die Kurztagpflanze *Chenopodium rubrum* ein diurnaler Rhythmus mit einem nächtlichen Maximum der Melatoninkonzentration nachgewiesen werden. Ebenso ist für mehrzellige phototrophe Organismen kein bestimmter Phaenotyp mit Melatonin assoziiert.

Die Erforschung von Melatonin als photoperiodischer Signalsubstanz und putativem Phytohormon bei höheren Pflanzen und Makroalgen ist noch in den Anfängen und wird insbesondere durch Probleme der Identifizierung und Quantifizierung des Indolamins erschwert. Die am häufigsten verwendeten Methoden sind Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) sowie immunologische Bestimmungen mittels RIA bzw. ELISA. Verschiedene Autoren haben jedoch beobachtet, dass die Standardkriterien zur Validierung der Identität der Substanz bei Messung von pflanzlichem Material nicht ausreichen und die zahlreichen Pflanzeninhaltsstoffe und Metabolite des Sekundärstoffwechsels häufig zu falsch-positiven Ergebnissen führen können.

Melatonin konnte im Rahmen dieser Arbeit in diversen Rot-, Grün- und Braunalgen nachgewiesen werden. Der Melatoningehalt war in den untersuchten Makroalgen mit Werten zwischen 2 und 50 pg · g⁻¹ (Frischgewicht) relativ gering, jedoch in einer vergleichbaren Größenordnung wie bei *Pharbitis nil* oder *Chenopodium rubrum* (Tagwerte).

Durch Aufreinigung der Extrakte mittels HPLC mit anschließender Extraktion des Eluats mit Chloroform konnten mit der Messung interferierende Substanzen abgetrennt werden. Die anschließende Quantifizierung des Melatonins erfolgte nach Evaporation des Chloroforms durch Enzymgekoppelten Immunosassay (LC-ELISA).

Zur Validierung der ELISA-Bestimmungen wurde eine erst kürzlich beschriebene Methode zur Messung von Melatonin mittels HPLC-FD nach vorheriger Derivatisierung des Melatonins im alkalischen Milieu durch Wasserstoffperoxid erstmals für die Bestimmung des Melatoningehalts phototropher Organismen eingesetzt. Auch für diese Messungen mussten die Extrakte zunächst über eine HPLC aufgereinigt werden, um eine Freistellung des Melatoninderivat-Peaks zu erreichen. Die Nachweisgrenzen für die verwendeten Methoden ELISA und HPLC nach Vorsäulenderivatisierung lagen jeweils bei etwa $2 \text{ pg} \cdot \text{g}^{-1}$ (FG).

Parallele Bestimmungen des Melatoningehalts mit beiden Methoden an verschiedenen Makroalgenarten zeigten eine deutliche Korrelation ($r^2 = 0,95$), wobei die mittels ELISA bestimmten Werte im Mittel um ca. 15% niedriger waren als die Werte der HPLC-Quantifizierungen nach Vorsäulenderivatisierung.

Der Vergleich verschiedener Extraktionsmethoden zeigte, dass die drei untersuchten Methoden basierend auf Ether, Aceton oder Perchlorsäure vergleichbar effizient waren, wenn die anschließende Quantifizierung mit LC-ELISA erfolgte. In nicht-aufgereinigten Extrakten wurden bei Perchlorsäure- und Acetonextraktion höhere Messwerte im ELISA beobachtet, während die Melatonin-Immunoaktivität von HPLC-aufgereinigten und nicht-aufgereinigten Ether-Extrakten weitgehend identisch war. Dies deutet auf eine unterschiedliche Extraktionseffizienz für Substanzen hin, die an den Antikörper des ELISA binden und zu falsch-positiven Ergebnissen führen können.

Die Wiederfindungsrate für $100 \text{ pg} \cdot \text{g}^{-1}$ zugesetzten Melatoninstandard betrug bei den verwendeten Extraktionsmethoden zwischen 60 und 80% und war weitgehend unabhängig davon, ob die Extrakte vor der Quantifizierung mittels HPLC aufgereinigt wurden oder nicht-aufgereinigte Extrakte eingesetzt wurden. Ebenso war die Wiederfindungsrate unabhängig von der verwendeten Quantifizierungsmethode.

Bei Tag/Nacht-Vergleichen des Melatoningehalts konnten bei den Arten *Ulva lactuca*, *Laminaria saccharina*, *Palmaria palmata*, *Pterygophora californica* und *Kappaphycus alvarezii* keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden. Lediglich in einer Messreihe an *Porphyra umbilicalis* war der Melatoningehalt zur Mitte der Scotophase mit $10,4 \text{ pg} \cdot \text{g}^{-1}$ signifikant höher als zur Mitte der Photophase mit $3,2 \text{ pg} \cdot \text{g}^{-1}$ (FG; T-Test: $p < 0,001$; $n = 6$). Bei einer Wiederholung der Messung waren zwar die Tag-Werte tendenziell niedriger als die Nacht-Werte, jedoch waren die Unterschiede statistisch nicht signifikant ($p = 0,114$).

Die Ergebnisse untermauern Hypothesen über die ubiquitäre Verbreitung des Indolamins im Tier- und Pflanzenreich. Rückschlüsse über eine mögliche physiologische Funktion von Melatonin in Makroalgen sind jedoch anhand der Daten nur bedingt möglich. Das weitgehende Fehlen einer Variation des Melatoningehalts parallel zu der diurnalen Lichtexposition könnte darauf hindeuten, dass Melatonin in marinen Makroalgen nicht als Dunkelsignal

Zusammenfassung

fungiert. Dabei muss jedoch berücksichtigt werden, dass die Ausbildung diurnaler sowie circadianer Oszillationen oftmals nur in einem engen permissiven Bereich biotischer sowie abiotischer Faktoren erfolgt.

Bezüglich einer Bedeutung als Antioxidanz sind die gemessenen Konzentrationen sehr gering, jedoch ist auch hier eine Regulation in Abhängigkeit von einer Exposition gegenüber freien Radikalen und Oxidanzien vorstellbar.

Die vorgestellten Methoden zur Bestimmung des Melatoningehalts in marinen Makroalgen bieten die Möglichkeit einer genaueren Validierung und somit einer Absicherung der Identität der Substanz. Die erarbeiteten Methoden konnten auch erfolgreich für die Bestimmung des Melatoningehalts an *Lycopersicon esculentum* (Tomate) eingesetzt werden. In drei Früchten einer Ripse wurden bei Parallelbestimmungen mit den beiden Quantifizierungsmethoden ELISA und HPLC nach Vorsäulenderivatisierung zwischen 93 und 121 $\text{pg} \cdot \text{g}^{-1}$ (FG) gemessen. Dies deutet auf eine mögliche Übertragbarkeit der Methoden auf weitere phototrophe Organismen hin.

Eine zuverlässige und möglichst artübergreifend anwendbare Quantifizierungsmethode stellt eine wichtige Voraussetzung für die Evaluierung von Melatonin als putativem Phytohormon dar und könnte somit helfen, die Funktion von Melatonin in höheren Pflanzen und Makroalgen weiter aufzuklären.

2 Summary

Melatonin, N-acetyl-5-methoxytryptamine, has been identified as a central component of the system for perception and transduction of photoperiodical information in vertebrates. In numerous in this regard examined vertebrates a pronounced rhythm of melatonin concentration with maxima during the night was observed and the tryptophane metabolite is generally regarded as an endogenous mediator of darkness. Besides synchronizing numerous circadian processes, the hormone is also involved in synchronization of circannual processes and control of seasonal reproduction.

Moreover, melatonin proved as a potent antioxidant and a highly effective radical scavenger. This species independent property of melatonin is suspected to represent its primary function in evolution. The transduction of photoperiodical information evolved as a secondary function, due to the chemical properties of melatonin as a light sensitive molecule.

Findings of melatonin in the marine dinoflagellate *Lingulodinium polyedrum* opened the field for investigations of melatonin in phototrophic organisms. Similar to vertebrates, melatonin concentrations in *L. polyedrum* exhibit a diurnal and a circadian oscillation and in application experiments melatonin was capable of inducing a short-day reaction, namely the formation of asexual cysts. Furthermore, a protective effect against otherwise lethal oxidative stress by elevated but physiologically possible melatonin concentrations was demonstrated in this species.

In addition to the findings of melatonin in vertebrates, invertebrates, unicells and protists the indole amine was for the first time demonstrated to occur in several angiosperms in 1995. Within the higher plants examined so far, only the short-day plant *Chenopodium rubrum* exerted a diurnal rhythm with a nocturnal maximum. No specific phenotype was associated with melatonin in multicellular phototrophic organisms so far.

Research on melatonin as a photoperiod signaling substance and putative hormone in higher plants and macroalgae is still in its infancy and is especially complicated by problems related to the identification and quantification of the indole amine. Most common methods used are high performance liquid chromatography (HPLC) and immunological quantifications like radio immuno assay (RIA) or enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Several authors reported that standard criteria for validation of the identity of the substance in plant material are insufficient and the numerous substances of content as well as secondary metabolites can easily lead to false positive results.

In the present investigation, the occurrence of melatonin in several red, green and brown algae could be demonstrated. The melatonin concentrations found in the examined macroalgae were in the range $2\text{-}50\text{ pg} \cdot \text{g}^{-1}$ (fresh weight). These are relatively low concentrations, but comparable values were reported for higher plants like *Pharbitis nil* or *Chenopodium rubrum* (daytime values).

Purification of the extracts by HPLC with subsequent extraction of the eluate with chloroform allowed separation from substances that might interfere with the determination of melatonin. After evaporation of the chloroform the melatonin was quantified by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Summary

A recently described method for melatonin determination by HPLC-FD based on the derivatisation of melatonin under alkaline conditions by hydrogen peroxide was used to validate the ELISA determinations.

Like for immunological determinations, the extracts had to be initially purified by HPLC to achieve a separation of the melatonin derivate peak. Detection limits for ELISA and HPLC with precolumn derivatisation were around $2 \text{ pg} \cdot \text{g}^{-1}$ (fw).

Parallel determinations of the melatonin content in several macroalgal species with both methods showed a clear correlation ($r^2 = 0,95$). The ELISA values were on average 15 % lower than values determined with HPLC after precolumn derivatisation.

Comparisons between different extraction methods revealed a similar efficiency of the three investigated methods based on ether, acetone or perchloric acid (PCA) extraction, if the extracts were purified with HPLC before quantification. In non-purified extracts the values measured with ELISA were higher in acetone and PCA extracts, whereas immunoreactivity values in ether extracts did not differ significantly between HPLC purified and non-purified extracts. These results indicate different extraction efficiencies for substances that bind to the melatonin antibody of the ELISA and thus give false-positive results.

Recovery rates for $100 \text{ pg} \cdot \text{g}^{-1}$ melatonin added before the extraction procedure ranged at 60-80%. The recovery rate was mainly independent of the extraction method used and of purification and non-purification by HPLC. Furthermore, recovery rate was not affected by the method used for quantification.

The melatonin content in *Ulva lactuca*, *Laminaria saccharina*, *Palmaria palmata*, *Pterygophora californica* and *Kappaphycus alvarezii* did not show significant differences between day and night samples. Only in one series of measurements in *Porphyra umbilicalis* the melatonin content was significantly higher during the scotophase ($10,4 \text{ pg} \cdot \text{g}^{-1}$ fw; $n = 6$) than during the photophase ($3,2 \text{ pg} \cdot \text{g}^{-1}$ fw; $n = 6$). A repetition of this measurement also showed higher values during the night but the differences were not significant.

The results support the hypothesis of a ubiquitous distribution of melatonin throughout the plant and animal kingdom but allow little conclusions about its possible physiological function. The predominantly lack of diurnal variation of melatonin content in macroalgae may indicate that melatonin does not function as a dark signal in macroalgae, but one should keep in mind that diurnal and circadian oscillations are often limited to a narrow range of conditions.

The observed melatonin concentrations are very low for a possible function as an antioxidant, but a regulation in dependence to exposition to free radicals and oxidants may appear possible.

The presented approach for determination of melatonin content in marine macroalge allowed exact validations by quantification via two independent methods and thus allowed ensuring the identity of the substance. The developed methods could successfully be applied also for determinations of melatonin content of *Lycopersicon esculentum* (Tomato). The melatonin content of three fruits were measured in parallel with ELISA and HPLC with precolumn derivatisation, and concentrations ranged at $93\text{-}121 \text{ pg} \cdot \text{g}^{-1}$ (fw). This supports a possible transferability of the methods to other phototrophic organisms.

Summary

A reliable and mainly species-independent method for melatonin determinations is a necessary precondition for evaluating melatonin as a putative phytohormone and could help to elucidate melatonin functions in higher plants and macroalgae.

3 Einleitung

Die Mehrzahl lebender Organismen ist in vielfältiger Weise periodisch sich ändernden Umweltbedingungen, insbesondere dem Tag/Nacht-Wechsel und den Jahreszeiten, ausgesetzt. Physiologische Funktionen müssen an diese tages- oder jahreszeitlichen Änderungen entweder reaktiv oder antizipatorisch angepasst werden. Hierfür benötigt der Organismus ein System zur Wahrnehmung und Weiterleitung photoperiodischer Informationen. Das dem Tryptophanstoffwechsel entstammende Indolamin Melatonin wurde als ein wichtiges Glied dieses Systems in fast allen Wirbeltieren und zahlreichen wirbellosen Organismen identifiziert, jedoch ist die Erforschung der möglichen Bedeutung dieser Substanz in den meisten phototropen Organismen noch in den Anfängen (VAN TASSEL & O'NEILL, 2001).

Melatonin (N-Acetyl-5-Methoxytryptamin) wurde durch LERNER *et al.* erstmals aus den Pinealorganen von Rindern isoliert und als die Substanz identifiziert, welche die Aggregation der Melanophoren in der Haut von Amphibien stimuliert und so zu einer Aufhellung der Haut führt (LERNER *et al.*, 1958, 1959). Bald darauf wurde ein Zusammenhang zwischen der Melatoninsynthese und der Photoperiode bei Ratten beobachtet (QUAY, 1963a, 1963b), wobei während der Scotophase ein höherer Melatoningehalt gemessen wurde als während der Photophase. In zahlreichen folgenden Untersuchungen wurde die Funktion von Melatonin als endogener Mediator des Signals Dunkelheit der Wirbeltiere etabliert (Zusammenfassung: ARENDT, 1985; REITER, 1991a, 1991b). Melatonin fungiert somit als Schnittstelle zwischen der photoperiodischen Umgebung und dem endokrinen System (REITER, 1991c) und konnte in allen dahingehend untersuchten Vertebraten nachgewiesen werden (REITER, 1991b).

Da die Dauer der nächtlichen Melatoninsynthese von der Länge der Dunkelphase abhängt (SKENE *et al.*, 1986; REITER, 1993) und die Synthese des Indolamins durch Licht inhibiert wird (AXELROD, 1974), sind in der Dauer nächtlich erhöhter Melatoninkonzentration auch Informationen über die Länge der Scotophase und somit jahreszeitliche Informationen enthalten. Melatonin dient der Synchronisation circannualer Rhythmen und steuert die saisonale Reproduktion bei Schafen, Vögeln, Nagetieren und weiteren Vertebraten (ARENDT, 1986; PÉVET *et al.*, 1991; REITER, 1993; GWINNER *et al.*, 1994).

Das Pinealorgan ist nicht der einzige Ort der Melatoninsynthese in Vertebraten. Die Bildung von Melatonin wurde auch in ontogenetisch verwandten Geweben wie der Retina oder dem Parietal von Eidechsen („3. Auge“) beobachtet (TOSINI & MENAKER, 1995). Es wird vermutet, dass innerhalb der Wirbeltiere alle Zellen mit Photorezeptor-Eigenschaften eine rhythmische Melatoninproduktion aufweisen (TOSINI & MENAKER, 1998). Auch in nicht-verwandten Geweben und Zellen wie dem Darm, der membranösen Cochlea, der Harderschen Drüse und in Leucocyten wurde die Synthese des Indolamins beobachtet (HUETHER, 1993; HARDELAND & FUHRBERG, 1996). Diese Vielzahl von Syntheseorten deutet darauf hin, dass die Übermittlung des Signals Dunkelheit nicht die einzige Funktion im Organismus darstellt (HARDELAND & FUHRBERG, 1996). Nachgewiesen wurde die Beteiligung von Melatonin an der

Regulation des Immunsystems (MAESTRONI & CONTI, 1990; MORREY *et al.*, 1994), an Effekten auf das Zytoskelett (BENÍTEZ-KING & ANTÓN-TAY, 1993; ANTÓN-TAY *et al.*, 1998) und der NO-Synthese (POZO *et al.*, 1994; BETTAHI *et al.*, 1996).

Melatonin ist eine amphiphile Substanz, die in geringen Mengen in Wasser aber vor allem in weniger polaren Lösungsmitteln wie Methanol oder Ether löslich ist (SHIDA *et al.*, 1994). Aufgrund seiner lipophilen Eigenschaften kann Melatonin ungehindert durch Membranen diffundieren und somit auch in Zellen, die keinem direkten photoperiodischen Einfluss unterliegen, Effekte hervorrufen (HARDELAND *et al.*, 1993; POEGGELER *et al.*, 1993; COSTA *et al.*, 1995; HARDELAND & RODRÍGUEZ, 1995).

Die klassische Funktion von Melatonin als chemisches Signal für Dunkelheit wird in Wirbeltieren über hochaffine G-Protein-gekoppelte Membranproteine vermittelt (RIVKEES *et al.*, 1989; REPERT *et al.*, 1994; REPERT *et al.*, 1995). Effekte auf das Zytoskelett sind auf die hochaffine und selektive Bindung an zytoplasmatisches Calmodulin zurückzuführen (BENÍTEZ-KING & ANTÓN-TAY, 1993; BENÍTEZ-KING *et al.*, 1993), ebenso die Inhibition der Ca/CaM-aktivierten NO-Synthase (POZO *et al.*, 1994).

Neben der Funktion als Output-Signal des circadianen Oszillators fungiert Melatonin auch als Input-Signal und kann beispielsweise über Melatoninrezeptoren im Suprachiasmatischen Nukleus (SCN) als Zeitgeber auf circadiane Oszillatoren wirken (DUBOCOVICH *et al.*, 1996). Aus diesem Grund wird Melatonin auch als Pharmakon zur Resynchronisierung der „Inneren Uhr“, z.B. nach Flügen über Zeitzonen, eingesetzt (*jet lag*; SKENE *et al.*, 1996; EDWARDS *et al.*, 2000).

Auch bei diversen wirbellosen Tieren wie Arthropoda, Molluska und Nematoda wurde das Vorkommen von Melatonin nachgewiesen (CALLEBERT *et al.*, 1991; VIVIEN-ROELS *et al.*, 1984; VIVIEN-ROELS & PÉVET, 1993). Der Melatoningehalt verschiedener Organismen zeigt neben dem klassischen Muster eines nächtlichen Maximums auch entgegengesetzte Rhythmik mit erhöhter Melatoninkonzentration während der Photophase oder dem Fehlen einer rhythmischen Melatonsynthese. Teilweise wurden divergierende zeitliche Muster in den Melatoninkonzentrationen verschiedener Gewebe beobachtet. So wurden in den Augen des marinen Gastropoden *Aplysia californica* Höchstwerte der Melatoninkonzentration während des Tages beobachtet, wohingegen im Cerebralganglion während der Scotophase die höchsten Melatoninwerte beobachtet wurden (ABRAN *et al.*, 1994).

In Bakterien, Protozoen, Pilzen und höheren Pflanzen konnte das Vorkommen von Melatonin ebenfalls nachgewiesen werden (MANCHESTER *et al.*, 1995; TILDEN *et al.*, 1997; POEGGELER *et al.*, 1991; SPRENGER *et al.*, 1999; HATTORI *et al.*, 1995; DUBBELS *et al.*, 1995).

Vor allem die Entdeckung von Melatonin in dem Dinoflagellaten *Lingulodinium polyedrum* (Stein) Dodge (syn. *Gonyaulax polyedra*) eröffnete das Feld der Erforschung des Vorkommens und der möglichen Funktion von Melatonin in phototrophen Organismen. Diese einzellige Alge stellt einen chronobiologischen Modellorganismus dar und zeichnet sich neben dem Vorhandensein diverser circadianer Rhythmen (z.B. Biolumineszenz, Photosynthese, Vertikalbewegung) auch durch eine charakteristische Kurztagreaktion aus. Diese besteht in der Ausbildung von Dauerstadien (Enzystierung) als

Reaktion auf Kurztag (L:D 10:14) in Kombination mit einer moderaten Temperaturabnahme (z.B. von 20°C auf 15°C; BALZER & HARDELAND, 1993).

In *L. polyedrum* konnte eine diurnale sowie circadiane Rhythmik des Melatoningehalts mit zwei unabhängigen Quantifizierungsmethoden nachgewiesen werden (POEGGELER *et al.*, 1991). Der Melatoningehalt steigt kurz nach Beginn der Scotophase an und erreicht etwa in der Mitte der Nacht ein Maximum. Vor Beginn der Photophase sinken die Melatoninwerte wieder auf niedrige Basiswerte. Durch Applikationsversuche konnte eine Verschiebung der Phase des circadianen Oszillators (*phase shifting*) induziert werden (ANTOLÍN *et al.*, 1997).

Unter zysteninduzierenden Bedingungen, also bei Kurztag in Kombination mit einer Abnahme der Temperatur, kommt es zu einem Anstieg des Melatoningehalts in *L. polyedrum* um mehrere Größenordnungen und erreicht bis zu millimolare Konzentrationen (FUHRBERG, 1997). Der erhöhte Melatoningehalt, der eine Integration von photoperiodischen und Temperatur-Informationen darstellt, induziert das Enzym Aryl-Acylamidase (AAA). Dieses katalysiert die Deacetylierung von Melatonin zu 5-Methoxytryptamin (5-MT), welches vermutlich die biologisch aktive Substanz bei der Induktion asexueller Zysten darstellt. In Applikationsversuchen konnte durch Melatonin sowie durch 5-MT die Kurztagreaktion der Ausbildung asexueller Zysten induziert werden (BALZER & HARDELAND, 1991, 1992; BALZER & HARDELAND, 1993). Hierbei erwies sich 5-MT selbst in geringeren Konzentrationen und höheren Temperaturen als die effektivere Substanz.

Bereits in den ersten Arbeiten zu Melatonin in phototrophen Organismen wurde die Wichtigkeit der Verwendung möglichst schonender Methoden der Extraktion und Quantifikation hervorgehoben, um eine Zerstörung des Indolamins durch Interaktion mit freien Radikalen oder durch Photooxidation zu vermeiden (POEGGELER, 1992; POEGGELER & HARDELAND, 1994).

Freie Radikale sind Moleküle oder Atome, die ein oder mehrere ungepaarte Elektronen besitzen (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989). Viele dieser freien Radikale zeichnen sich durch eine hohe Reaktivität aus und können durch Reaktion mit DNA, Proteinen und Membranlipiden zu Zellschädigungen führen (ASADA & TAKAHASHI, 1987). In phototrophen Organismen werden die Elektronentransportketten der Photosynthese als Hauptquelle reaktiver Sauerstoffspezies angesehen, aber auch in der mitochondrialen Elektronentransportkette können Elektronen auf molekularen Sauerstoff übertragen werden, was zur Bildung von Superoxidanionen ($O_2^{\cdot-}$) führt (ELSTNER, 1990; FORMAN & BOVERIS, 1982). Kommt es spontan oder durch Superoxiddismutase zu einer Dismutation, so entsteht neben O_2 auch H_2O_2 , welches durch Katalase oder Ascorbat-Peroxidase entgiftet werden kann. Geschieht dies nicht, kann es beispielsweise unter Einfluss von UV-Strahlung zur Bildung zweier Hydroxylradikale ($\cdot OH$) kommen. Diese sind in biologischen Systemen sehr kurzlebig und können mit praktisch jeder Art von Molekülen reagieren.

Eine antioxidative Funktion des Melatonins wurde erstmals 1991 von IANAS *et al.* postuliert. In folgenden Untersuchungen erwies sich Melatonin als potentes Antioxidanz und als hocheffektiver Radikalfänger (*radical scavenger*). Neben der Entgiftung von Hydroxylradikalen ($\cdot OH$), Peroxynitrit-Anionen ($ONOO^{\cdot-}$), Stickstoffoxid (NO) und Singulett-Sauerstoff (1O_2) wird auch die

direkte Entgiftung von Wasserstoffperoxid diskutiert (TAN *et al.*, 1993; ZHANG *et al.*, 1998; TURJANSKI *et al.*, 1998, 2000; TAN *et al.*, 2000a; FOWLER *et al.*, 2003).

Am Beispiel von *Lingulodinium polyedrum* konnte demonstriert werden, dass Melatonin in physiologischen Konzentrationen vor ansonsten lethalen Wasserstoffperoxid-Konzentrationen schützt (ANTOLÍN *et al.*, 1997).

Die primären Produkte der Interaktion von Melatonin mit freien Radikalen sind das korrespondierende Kynuramin N¹-Acetyl-N²-formyl-5-methoxykynuramin (AFMK), 2-Hydroxymelatonin sowie zyklisches 3-Hydroxymelatonin (TAN *et al.*, 1993; HARDELAND *et al.*, 1993; TAN *et al.*, 2000b).

Wie schon am Beispiel von Melatonin und 5-MT verdeutlicht, ist es wichtig, zwischen den Effekten von Melatonin selbst und dessen Metaboliten zu unterscheiden. Auch AFMK sollte als putatives Signalmolekül in Betracht gezogen werden (HARDELAND & POEGGELER, 2003).

Neben der direkten Funktion als Antioxidanz und Radikalfänger fungiert Melatonin als Modulator des antioxidativen Systems. Melatonin bewirkt eine Zunahme der Aktivität der Superoxiddismutase (ANTOLÍN *et al.*, 1996) und der Glutathionperoxidase (BARLOW-WALDEN *et al.*, 1995; PABLOS *et al.*, 1995). Über die Bindung an Calmodulin wird die Aktivität des prooxidativen Enzyms NO-Synthase reduziert (s.o.) und Melatonin erhöht desweiteren die Verfügbarkeit von Glutathion (URATA *et al.*, 1999).

Die weite Verbreitung von Melatonin in phylogenetisch weit auseinander liegenden Organismen wie Vertebraten, Invertebraten, Angiospermen, Einzellern und Prokaryoten legt nahe, dass es sich um eine ubiquitäre Substanz mit einem sehr frühen evolutionären Ursprung handelt (MANCHESTER *et al.*, 1995; HARDELAND *et al.*, 1995; HARDELAND & FUHRBERG, 1996). Es wird vermutet, dass die primäre Funktion des Indolamins in dessen Eigenschaft als Radikalfänger und Antioxidanz besteht, da diese artunabhängig ist. Erst sekundär evolvierte die Funktion als Vermittler photoperiodischer Informationen aufgrund der chemischen Eigenschaften als lichtsensitives Molekül (HARDELAND *et al.*, 1995).

Effekte von Melatonin auf höhere Pflanzen wurden erstmals 1969 von JACKSON nachgewiesen. Er zeigte, dass das Indolamin den mitotischen Spindelapparat in *Haemaphysalis katerinae* beeinflusst. Ein weiterer Effekt auf das Zytoskelett wurde in den Wurzelspitzen von *Allium cepa* beobachtet, wo Melatonin zu einer Verzögerung der Mitose führt (BANERJEE & MARGULIS, 1973). Beide Beobachtungen sind, vergleichbar mit Effekten von Melatonin auf das Zytoskelett in Tieren, auf die Bindung von Melatonin an Calmodulin zurückzuführen (BENÍTEZ-KING & ANTÓN-TAY 1993).

Über zwei Jahrzehnte später, inspiriert von den Ergebnissen in *Lingulodinium polyedrum*, wurde erstmals das Vorkommen von Melatonin in zahlreichen Angiospermen nachgewiesen. In diesen Untersuchungen wurde der Melatoningehalt in den essbaren Teilen von Pflanzen, wie Früchten, Samen und Wurzeln bestimmt. Hierbei wurden sehr unterschiedliche Melatoninkonzentrationen in den verschiedenen Pflanzen und Pflanzenteilen gemessen. Diese lagen im Bereich zwischen 2 pg · g⁻¹ Frischgewicht in *Beta vulgaris* und etwa 5 ng · g⁻¹ (Trockengewicht) in Samen von *Festuca arundinacea* (Rohrschwengel). In Kartoffelknollen (*Solanum tuberosum*) konnte kein Melatonin nachgewiesen werden (HATTORI *et al.*, 1995; DUBBELS *et al.*, 1995).

Die Aufnahme melatoninreichen Getreides führte bei Hühnern zu einer Zunahme der Melatoninkonzentration im Blut und die Bindung von Melatonin pflanzlichen Ursprungs an Melatonin-Bindungsstellen im Gehirn von Säugetieren konnte demonstriert werden (HATTORI *et al.*, 1995).

In zahlreichen Samen wurden sehr hohe Melatoninkonzentrationen gemessen (HATTORI *et al.*, 1995; MANCHESTER *et al.*, 2000). Der Melatoningehalt in den Samen von 15 untersuchten Arten lag im Bereich von 2 bis 200 ng · g⁻¹ (Trockengewicht). Da in Samen keine zyklischen Prozesse ablaufen, kann die klassische Funktion des Melatonins als Regulator circadianer Rhythmen und Übermittler von Dunkelsignalen ausgeschlossen werden (HARDELAND & PÖEGGELER, 2003). Es wurde vermutet, dass Melatonin in Samen an der Regulation der Dormanz beteiligt ist (BALZER & HARDELAND, 1996), oder es fungiert primär als Radikalfänger und schützt die für die Reproduktion wichtigen Organe und Speicherlipide vor Schädigung durch freie Radikale (MANCHESTER *et al.*, 2000).

Auch in vielen „medizinischen Pflanzen“ wurden teilweise extrem hohe Melatoninkonzentrationen beobachtet (MURCH *et al.*, 1997; MURCH & SAXENA, 2002; CHEN *et al.*, 2003). In einer Studie an 108 chinesischen Heilpflanzen wurde in 64 Arten ein Melatoningehalt von über 10 ng · g⁻¹ (Trockengewicht) gemessen. In zehn der untersuchten Arten wurden sogar mehr als 1000 ng · g⁻¹ (Trockengewicht) bestimmt (CHEN *et al.*, 2003). In welchem Maße das enthaltene Melatonin zu der jeweiligen therapeutischen Wirkung beiträgt, ist jedoch ungeklärt.

Bei der Untersuchung des Melatoningehalts in Blütenknospen von *Hypericum perforatum* zeigte sich ein Zusammenhang zwischen der Blütenentwicklung und den beobachteten Melatoninkonzentrationen. In einer bestimmten Phase der Entwicklung kommt es zu einem vorübergehenden Anstieg des Melatoningehalts und es wird ein Zusammenhang zwischen der Regenerierungsfähigkeit und dem Melatoningehalt vermutet (MURCH *et al.*, 2001; MURCH & SAXENA, 2002).

Über die mögliche Funktion von Melatonin in Pflanzen gibt es bislang keine klaren Erkenntnisse. Es wird kein bestimmter Phaenotyp mit Melatonin assoziiert (VAN TASSEL & O'NEILL, 2001). Neben der möglichen Beteiligung an der Dormanz von Samen (s.o.) wird die Funktion als Radikalfänger und Antioxidanz diskutiert. Für eine solche Funktion spricht die Beobachtung, dass beim Vergleich zweier Tomatensorten, die sich in ihrer Sensibilität gegenüber Ozon unterscheiden, in der resistenteren Sorte etwa um den Faktor fünf höhere Melatoninwerte gemessen wurden (DUBBELS *et al.*, 1995).

Auch wurden in Pflanzen wie *Brassica spec.* (Senf) und *Thlaspi caerulescens*, die sich durch eine hohe Resistenz gegenüber Metallbelastungen im Boden auszeichnen (MOFFAT, 1995), hohe Melatoninkonzentrationen beobachtet (BLASK, D.E. unveröffentlicht, aus MANCHESTER *et al.*, 2000).

Für die Evaluierung von Melatonin als potentiell an der Regulation des Wachstums oder der Entwicklung beteiligtes Phytohormon haben VAN TASSEL & O'NEILL (2001) die von JACOBS 1959 aufgestellten „PESIGS-Regeln“ (*parallel variation, excision, substitution, isolation, generality, specificity*) auf den aktuellen Kenntnisstand über das Vorkommen und die Funktion von Melatonin bei höheren Pflanzen übertragen. Bei dieser Betrachtung wird deutlich, dass sich die Erforschung von Melatonin als potentielles Pflanzenhormon noch in

den Anfängen befindet, da teilweise selbst die grundlegenden Schritte der Extraktion und Quantifizierung noch unzureichend gelöst sind (VAN TASSEL & O'NEILL, 2001; VAN TASSEL *et al.*, 2001).

Die Entdeckung von Pflanzenhormonen der fünf Hauptgruppen Auxine, Kinetine, Gibberelline, Abscisinsäure und Ethylen erfolgte jeweils, nachdem zunächst ein Effekt beobachtet und dann gezielt nach der dazugehörigen Substanz gesucht wurde (HORGAN, 1981; VAN TASSEL & O'NEILL, 2001). Bei der Untersuchung von Melatonin als putatives Pflanzenhormon ist der Ansatz umgekehrt. Hier wird eine Substanz mit besonderen chemischen und biologischen Eigenschaften, für die eine ähnliche Funktion in phylogenetisch so weit auseinander liegenden Organismen wie Dinoflagellaten und Vertebraten nachgewiesen werden konnte, auf dessen mögliche Funktionen in höheren Pflanzen untersucht.

Die obligate Kurztagpflanze *Chenopodium rubrum* stellt bislang das einzige Beispiel für eine höhere Pflanze dar, bei der ein diurnaler Rhythmus der Melatoninkonzentration nachgewiesen werden konnte (KOLÁŘ *et al.*, 1997, 1999; WOLF *et al.*, 2001). Der Melatoningehalt ist während der Photophase auf niedrigem Niveau ($< 15 \text{ pg} \cdot \text{g}^{-1}$ Frischgewicht) und steigt während der Scotophase kurzzeitig auf 60 bis 600 $\text{pg} \cdot \text{g}^{-1}$ (FG) an. Noch vor Ende der Nacht sinken die Melatoninwerte wieder auf Basiswerte ab (KOLÁŘ *et al.*, 1997; WOLF *et al.*, 2001). Das nächtliche Maximum liegt, unabhängig vom photoperiodischen Regime, 18 Stunden nach dem letzten Licht-an-Signal (WOLF *et al.*, 2001). Ein circadianer Rhythmus des Melatoningehalts unter konstanten Bedingungen konnte nicht nachgewiesen werden.

Die Art wurde als Untersuchungsobjekt ausgewählt, weil *C. rubrum* eine obligate Kurztag-Pflanze ist, die ausgeprägte und präzise photoperiodische Reaktionen und rhythmisches Verhalten in Form eines endogenen Rhythmus der „flowering response“ zeigt. Diese ist proportional zu der Dauer der Dunkelperiode und die Pflanze reagiert sensibel auf Unterbrechungen der Dunkelphase (*night breaks*) durch Rotlicht (Zusammenf. CUMMING & SEABROOK, 1985).

In Applikationsversuchen mit Melatonin konnte jedoch nicht die Induktion der Kurztagreaktion „Blütenausbildung“ demonstriert werden. Vielmehr verhinderte Melatonin die Ausbildung von Blüten, wenn es während einer bestimmten circadianen Phase appliziert wurde. Ein vergleichbarer Effekt wurde bei Anwendung des Melatoninagonisten GCP 52608 beobachtet, einer Substanz, die vermutlich an bestimmte Zellkernrezeptoren für Melatonin bindet (KOLÁŘ *et al.*, 1999). Ebenso konnten in *Spirodela polyrhiza*, *Lemna minor* und *Lemna trisulca*, drei Lemnaceen, und in *Pharbitis nil* keine Kurztageffekte durch Melatoninapplikation induziert werden (HARDELAND, 1994; VAN TASSEL, 1997).

In diversen weiteren Arten konnten keine signifikanten Tag-Nacht-Unterschiede mit einem nächtlichen Maximum nachgewiesen werden. Beispielsweise wurden in *Aloe vera* und *Hypericum perforatum* konstante Melatoninkonzentrationen während des Tages und der Nacht beobachtet (MANCHESTER *et al.*, unveröffentl. Daten; aus MANCHESTER *et al.*, 2000) und auch bei *Pharbitis nil* konnte kein Tagesgang der Melatoninkonzentration nachgewiesen werden (VAN TASSEL *et al.*, 2001).

Die Biosynthese von Melatonin erfolgt in Säugern über die 5-Hydroxylierung der Aminosäure Tryptophan zu 5-Hydroxytryptophan und anschließender Decarboxylierung zu Serotonin (5-Hydroxytryptamin; 5-HT). Durch Aktivität der Enzyme Serotonin-N-Acetyltransferase (NAT) und Hydroxyindol-O-Methyltransferase (HIOMT) wird die Synthese von Melatonin über N-Acetylserotonin (NAS) als Zwischenprodukt katalysiert (Zusammenf. ARENDT, 1995). Die Tryptophan-5-Hydroxylase, die NAT und die HIOMT unterliegen einer circadianen Regulation mit erhöhter Aktivität während der (subjektiven) Nacht, wobei die Regulation der NAT mit einer etwa 70- bis 100-fach erhöhten Aktivität während der Scotophase stärker ausgeprägt ist und die Aktivität dieses Enzyms vermutlich limitierend während der Melatoninsynthese ist (KLEIN & WELLER, 1970).

Auch für den Dinoflagellaten *Lingulodinium polyedrum* konnte demonstriert werden, dass die Biosynthese von Melatonin primär auf vergleichbarem Weg wie in Säugetieren erfolgt. Durch Hemmung der Tryptophan-Hydroxylase konnte ein spezifisches durch den Melatoninmetaboliten 5-MT hervorgerufenen Biolumineszenz-Maximum gegen Ende der Scotophase zunächst unterdrückt und durch anschließende Verabreichung der Indolmetabolite 5-HTP, 5-HT, NAS und Melatonin wiederhergestellt werden (BURKHARDT & HARDELAND, 1996; HARDELAND & BURKHARDT, 1997). Messungen der Substratspezifität und Rhythmik der beteiligten Enzyme Tryptophan-Hydroxylase, NAT und HIOMT bestätigen diesen Syntheseweg. Unter bestimmten Bedingungen ist jedoch auch eine Melatoninsynthese durch O-Methylierung von Serotonin mit anschließender N-Acetylierung des 5-MT möglich (HARDELAND, 1993). Die Regulation der Melatoninkonzentration erfolgt primär über die Serotonin-N-Acetyltransferase sowie über eine Verminderung der Aktivität der Aryl-Acylamidase (HARDELAND *et al.*, 1995; BURKHARDT & HARDELAND, 1996).

Erste Hinweise für eine ähnliche Melatoninsynthese in Pflanzen liefern Applikationsversuche mit radioaktiv markiertem ^{14}C -Tryptophan an *Hypericum perforatum*. Nach Inkubation mit ^{14}C -Tryptophan konnte innerhalb kurzer Zeit die Synthese von ^{14}C -Indolessigsäure, ^{14}C -Tryptamin, ^{14}C -5-Hydroxytryptamin, ^{14}C -Serotonin und ^{14}C -Melatonin beobachtet werden. Die Lichtbedingungen während der Inkubation beeinflussten das Verhältnis von markiertem Serotonin zu Melatonin. In den unter Schwachlicht kultivierten Pflanzen wurde signifikant mehr markiertes Serotonin als Melatonin gemessen, während sich dieses Verhältnis unter dem Einfluss von Zusatzbeleuchtung umkehrte (MURCH *et al.*, 2000).

DUBBELS beobachtete Parallelen zwischen dem Serotoningehalt der untersuchten Pflanzen und dem enthaltenen Melatonin. Für Banane, Tomate und Kartoffel wurden in vorangegangenen Untersuchungen ein Serotoningehalt von 28, 12 und 0 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ (FG) beschrieben (UDENFRIEND *et al.*, 1959). Die in DUBBELS Untersuchungen bestimmten Melatoninkonzentrationen betragen respektive 470, 250 und 0 $\text{pg Melatonin} \cdot \text{g}^{-1}$ Frischgewicht (DUBBELS *et al.*, 1995).

Die Quantifizierung von Melatonin in pflanzlichem Material ist problematisch und Messmethoden zur Bestimmung von Melatonin in Tieren können nicht unmittelbar auf phototrophe Organismen übertragen werden (CASSONE & NATESAN, 1997). Dies liegt einerseits an einer vergleichsweise hohen

Bildungsrate reaktiver Sauerstoffintermediate wie Superoxidationen und H_2O_2 durch Nebenreaktionen der Photosynthese sowie an der Bildung von H_2O_2 zur Abwehr von Pathogenen (Asada, 1994; Collén et al., 1995; Potin et al., 2002). Daraus entstehende Radikale, wie z.B. Hydroxylradikale, können zu einer Zerstörung des Melatonins führen. Dies ist besonders problematisch, wenn größeres Material oder Gewebe (Pflanzenteile) untersucht werden soll, da eine Durchmischung mit präservierenden Lösungen, wie beispielsweise bei Untersuchungen an *Lingulodinium polyedrum* oder *Saccharomyces cerevisiae* (POEGGELER & HARDELAND, 1994; SPRENGER et al., 1999), nicht möglich ist.

Auf Grund der hohen chemischen Komplexität pflanzlicher Extrakte wird eine sichere Quantifizierung des Melatonins zusätzlich erschwert. Die in den Extrakten enthaltenen Verbindungen, wie Metabolite des Sekundärstoffwechsels, Phytohormone und zahlreiche weitere Substanzen können mit der Messung interferieren und zu falsch-positiven Ergebnissen führen (CASSONE & NATESAN, 1997; VAN TASSEL & O'NEILL, 2001; VAN TASSEL et al., 2001). Daher sind oftmals arbeitsintensive Aufreinigungsschritte notwendig und während dieser zusätzlichen Prozeduren kann eine weitere Zerstörung des Melatonins erfolgen.

Die Bestimmung einer aussagekräftigen Wiederfindungsrate ist an massiven Pflanzenteilen ebenfalls problematisch, da zugesetztes Melatonin nicht einfach mit dem Zellmaterial vor der Homogenisierung vermischt werden kann (HARDELAND, 1999) und Verluste, die auf eine Zerstörung des endogenen Melatonins innerhalb der Zellen vor der Extraktion zurückzuführen sind, nicht erfasst werden.

Ein weiteres Problem bei der Messung von Melatonin in Pflanzen und Algen hängt mit der intra- und extrazellulären Verteilung im Gewebe zusammen. Es ist kaum möglich, zwischen Melatonin im Apoplast (welches wichtig wäre, um die Rolle von Melatonin bei der Signalübermittlung zwischen den Zellen zu beurteilen) und im Symplast zu unterscheiden. Auch ist eine Unterscheidung zwischen zytoplasmatischem und in Vakuolen enthaltenem Melatonin nicht möglich. Deshalb sind Aussagen über mögliche physiologische Konzentrationen problematisch (HARDELAND, 1999; HARDELAND & POEGGELER, 2003).

Für die Quantifizierung von Melatonin in phototrophen Organismen wurden die gleichen Analysemethoden eingesetzt wie für Untersuchungen an heterotrophen Organismen. Diese sind Hochdruckflüssigkeitschromatographie mit elektrochemischer oder fluorometrischer Detektion (HPLC-ECD / HPLC-FD; POEGGELER, 1991; HATTORI et al., 1995; MURCH et al., 2000), Gaschromatographie/ Massenspektrometrie (GC-MS; VAN TASSEL et al., 2001) und Flüssigkeitschromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS; KOLÁŘ et al., 1997; WOLF et al., 2001) sowie Radioimmunoassay (RIA; HATTORI et al., 1995; DUBBELS et al., 1995; VAN TASSEL, 1997; MANCHESTER et al., 2000) und Enzym-gekoppelter Immunoassay (ELISA; WATANABE et al., 2002).

Vor allem die immunologischen Methoden RIA und ELISA sowie Quantifizierungen mittels HPLC mit elektrochemischer oder Fluoreszenz-Detektion sollten mit besonderer Vorsicht betrachtet werden da die zahlreichen, in den Pflanzenextrakten enthaltenen Substanzen durch Kreuzreaktivitäten bzw. durch Coelution leicht zu falsch-positiven Ergebnissen führen können (CASSONE & NATESAN, 1997; VAN TASSEL et al., 2001). Beide Methoden bedürfen

einer intensiven Validierung, um die Identität des Melatonins sicherzustellen und Überbewertungen zu vermeiden. Die Standardmethoden hierzu sind serielle Verdünnung und parallele Inhibition zur Validierung von Immunoassays (PENNELLY, 1985) sowie die Cochromatographie mit und ohne zugesetzten Melatoninstandard bei unterschiedlichen Chromatographie-Bedingungen (HARUMI & MATSUSHIMA, 2000). Trotz einer hochgradigen Aufreinigung der Extrakte mittels Festphasenextraktion und präparativer Hochdruckflüssigkeitschromatographie sowie Erfüllung der von PENNELLY genannten Kriterien beobachteten VAN TASSEL *et al.* große Diskrepanzen zwischen Quantifizierungen mit RIA und GC-MS bei Extrakten von *Lycopersicon esculentum* und *Pharbitis nil*. Die mittels RIA ermittelten Melatoninkonzentrationen lagen oftmals um den Faktor 6-100 über den mittels GC-MS bestimmten Konzentrationen (VAN TASSEL & O'NEILL, 2001; VAN TASSEL *et al.*, 2001). Bestimmungen von Melatonin sollten mit mindestens zwei grundlegend unterschiedlichen Methoden zu den gleichen Ergebnissen führen, wie dies für *Lingulodinium polyedrum* und *Chenopodium rubrum* demonstriert wurde (POEGGELER, 1991; KOLÁŘ *et al.*, 1997).

Zwar steht mit der Massenspektrometrie eine Detektionsmethode zur Verfügung, die in Kombination mit deuteriummarkiertem Melatoninstandard selbstvalidierend ist und eine sichere Identifizierung des Melatonins ermöglicht, jedoch ist diese sehr arbeits- und kostenintensiv und wurde aus diesen Gründen primär zur Validierung der anderen Detektions- und Quantifizierungsmethoden eingesetzt.

Bei der Entwicklung von Messmethoden spielen auch die tatsächlich auftretenden Melatoninkonzentrationen eine wichtige Rolle. Je geringer der Melatoningehalt des zu untersuchenden Organismus, desto höher müssen die Extrakte konzentriert werden und entsprechend werden auch die interferierenden Substanzen angereichert und die Gefahr falsch-positiver Ergebnisse erhöht. Oftmals waren die gefundenen Melatoninkonzentrationen nur knapp oberhalb der Nachweisgrenze (KOLÁŘ *et al.*, 1997; VAN TASSEL *et al.*, 2001).

Erst kürzlich wurde eine Methode vorgestellt, bei der das Melatonin zunächst im alkalischen Milieu durch Zugabe von Wasserstoffperoxid bei erhöhter Temperatur zu N-[(6-Methoxy-4-oxo-1,4-dihydroquinolin-3-yl)methyl]acetamid umgesetzt wird (INUMA *et al.*, 1999; HAMASE *et al.*, 2000; TOMITA *et al.*, 2003). Das entstehende Melatoninderivat zeichnet sich im Vergleich zu Melatonin durch eine um den Faktor 6,8 höhere Fluoreszenzintensität aus und kann mittels HPLC-FD quantifiziert werden. Auf diese Weise wird eine sehr hohe Empfindlichkeit der Messungen erreicht und die Methode konnte zur Quantifizierung des Melatoningehalts in Pinealorganen von Mäusen eingesetzt werden, in denen bislang aufgrund unzureichender Empfindlichkeit kein Melatonin nachgewiesen werden konnte (HAMASE *et al.*, 2000; TOMITA *et al.*, 2003). Über eine Anwendung dieser Methode für Melatoninmessungen an phototrophen Organismen liegen bislang keine Informationen vor.

Für die Extraktion von Melatonin aus pflanzlichem Material wurden bislang sehr unterschiedliche Methoden eingesetzt. Diese basieren beispielsweise auf einer wässrigen Extraktion mit anschließendem Ausschütteln mit einem organischen Lösungsmittel (DUBBELS *et al.*, 1995; BURKHARDT *et al.* 2001), einem Aceton-Gemisch, wobei der Acetonanteil später eingedampft wird (VAN

TASSEL *et al.*, 2001), einer Perchlorsäureextraktion (POEGGELER & HARDELAND, 1994; KOLÁŘ *et al.*, 1997; MURCH *et al.*, 1997, 2000; WOLF *et al.*, 2001) oder einer ethanolischen Extraktion (MANCHESTER *et al.*, 2000). Zur Aufkonzentrierung des Melatonins und Abtrennung von störenden Matrixkomponenten wurden teilweise C₁₈-Festphasenextraktionssäulen verwendet (KOLÁŘ *et al.*, 1997; WOLF *et al.*, 2001; VAN TASSEL *et al.*, 2001). Darüber hinaus ist eine selektive Anreicherung mittels Immunoaffinitätschromatographie beschrieben worden (THORENSEN, 1978; WOLF *et al.*, 2001; ROLČÍK *et al.*, 2002).

Eine Bewertung durch direkten Vergleich der verschiedenen Extraktionsmethoden ist jedoch meist schwierig. Zwar liefern Wiederfindungsraten für zu Beginn der Extraktion zugesetzten Melatoninstandard Hinweise über Verluste von Melatonin während der Extraktion, jedoch ist ein direkter Vergleich der Extraktionseffizienz oft nicht möglich, da die meisten Quantifizierungsmethoden meist individuell an die Extraktionsmethode angepasst und validiert werden müssen.

Auch in marinen Makroalgen wurde das Vorkommen diverser circadianer Rhythmen beschrieben. Hierzu zählen Rhythmen der Photosynthese (GRANBOM *et al.*, 2001; JACOBSEN *et al.*, 2003) sowie des Wachstums (LÜNING, 1992, 1994) und darüber hinaus sind zahlreiche Arten mit spezifischen Kurztagreaktionen bekannt (DRING, 1984; LÜNING, 1990).

Als einzige marine Makroalge wurde für die Braunalge *Pterygophora californica* das Vorkommen von Melatonin beschrieben (FUHRBERG *et al.*, 1996) und in Applikationsversuchen wurde untersucht, ob dem Meerwasser zugesetztes Melatonin eine Dunkelreaktion induzieren kann. *Pterygophora californica* zeigt kurz nach Beginn der Dunkelphase eine für Braunalgen typische Abnahme der Wachstumsrate (LÜNING, 1991, 1994). Dieser Effekt konnte durch zugesetztes Melatonin ab einer Konzentration von $5 \cdot 10^{-5}$ M ebenfalls hervorgerufen werden (FUHRBERG *et al.*, 1996).

Die gefundenen Melatoninmengen betragen etwa $1,5 \text{ ng} \cdot \text{mg}^{-1}$ Protein, was etwa $15 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ Frischgewicht entspricht (FUHRBERG *et al.*, 1996). Es wurden keine substantiellen Tag/Nacht-Unterschiede im Melatoningehalt von *P. californica* festgestellt, tendentiell waren jedoch die Werte der Tagproben geringfügig höher als die der Nachtproben (FUHRBERG, 1997).

Für *P. californica* wurde desweiteren ein circannualer Rhythmus des Wachstums mit einer freilaufenden Periodenlänge von etwa 9 Monaten beschrieben (LÜNING, 1991) und es bleibt zu prüfen, ob ähnlich wie in Wirbeltieren eine Synchronisation durch Melatonin erfolgt.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, das Vorkommen von Melatonin in marinen Makroalgen und dessen mögliche Funktion der Übermittlung photoperiodischer Informationen zu untersuchen.

Voraussetzung hierfür war die Entwicklung einer möglichst artübergreifend anwendbaren Methode zur Messung von Melatonin in Makroalgen. Hierbei stand eine besonders intensive Validierung des entwickelten Assays, u.a. durch Quantifizierung mit zwei unabhängigen Methoden im Vordergrund, um die Identität des Melatonins sicherzustellen. Darüber hinaus sollten verschiedene Aspekte der Probenaufarbeitung und Extraktion betrachtet werden, um eine grobe Einschätzung der Verluste von Melatonin während dieser Prozeduren zu

Einleitung

ermöglichen. Exemplarisch sollten die Messungen an jeweils einer Rot-, Grün- und Braunalgenart demonstriert werden.

Die Quantifizierung mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie und Enzym-gekoppeltem Immunoassay wurde favorisiert, um auf eine Verwendung von radioaktiven Substanzen, wie sie für RIA-Messungen notwendig wären, verzichten zu können.

Zur Überprüfung einer möglichen Beteiligung von Melatonin an der Übermittlung photoperiodischer Informationen sollte anhand von Tag/Nacht-Vergleichen des Melatoningehalts festgestellt werden, ob die Melatoninkonzentration parallel mit Hell/Dunkel-Zyklen variiert.

Abschließend sollte die erarbeitete Methode auf eine mögliche Übertragbarkeit auf weitere phototrophe Organismen überprüft werden. Hierzu wurde die Quantifizierung von Melatonin am Beispiel von Tomate (*Lycopersicon esculentum*) demonstriert.

4 Material und Methoden

4.1 Versuchsorganismen

Als Versuchsorganismen wurden verschiedene Nordsee-Makroalgen sowie die wirtschaftlich interessante Carrageenalge *Kappaphycus alvarezii* und die Braunalge *Pterygophora californica* ausgewählt.

An den Arten *Porphyra umbilicalis*, *Ulva lactuca* und *Laminaria saccharina*, also an jeweils einer Rot-, Grün- und Braunalgenart, wurden exemplarisch die erarbeiteten Methoden zur Bestimmung des Melatoningehalts genauer untersucht und validiert, um auf eine mögliche allgemeine Anwendbarkeit schließen zu können.

Um zu testen, ob die erarbeiteten Methoden auch auf andere phototrophe Organismen übertragbar sind, wurde *Lycopersicon esculentum* (Tomate) als weitere Art ausgewählt. Diese hat ähnlich dem Algenmaterial einen relativ geringen Gehalt an Lipiden, die mit der Messung interferieren und es wurde zuvor das Vorkommen von Melatonin in Tomaten von anderen Arbeitsgruppen beschrieben (HATTORI *et al.*, 1995; DUBBELS *et al.*, 1995; VAN TASSEL *et al.*, 2001).

4.1.1 *Porphyra umbilicalis* (L.) J. AG.

Die untersuchten Proben von *Porphyra umbilicalis* (im Folgenden als *Porphyra* bezeichnet) stammten aus der Eulitoral des norddeutschen Wattenmeeres und wurden während Wasserbedeckung an einer Steinschüttung im Königshafen bei List, Deutschland, gesammelt. Es handelte sich um Gametophyten, die makroskopisch frei von Epiphyten waren.

4.1.2 *Ulva lactuca* (L.)

Zur Untersuchung des Melatoningehalts von *Ulva lactuca* (im Folgenden als *Ulva* bezeichnet) wurde Freilandmaterial verwendet, welches makroskopisch weitgehend frei von Epiphyten war. Die Proben wurden im Königshafen bei Niedrigwasser gesammelt. Vor der Aufarbeitung wurden die Thalli mindestens 1 Stunde in feinflitriertem Meerwasser rehydriert. Proben für Tag/Nacht-Vergleiche wurden eine Woche vor der Messung im Freiland gesammelt und in einem Durchflusstank unter ambientem Lichtregime zwischengehältert. Bei dem verwendeten Material wurde nicht unterschieden, ob es sich um Gametophyten oder Sporophyten handelte. Die Abschnitte nahe der Haftscheibe wurden nicht verwendet, da diese Bereiche häufig mit Epiphyten überwachsen sind.

4.1.3 *Laminaria saccharina* (L.) LAMOUR.

Die Sporophyten von *Laminaria saccharina* (im Folgenden als *Laminaria* bezeichnet) wurden aus Sorus gezüchtet und ab einer Länge von 2-3 cm im Gewächshaus in einem 2000l-Durchflusstank mit Zusatzbeleuchtung (Hortilux: PL 94; Phillips SON-T Plus 400W; L:D 16:8; 150 $\mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) gehältert. Die Wasseraustauschrate betrug ein Tankvolumen pro Tag und zusätzlich wurden täglich 22,5 $\mu\text{mol Ammoniumnitrat}$ sowie 2,7 $\mu\text{mol di-Ammoniumhydrogenphosphat}$ zugegeben (BIDWELL, 1985; *low level*). Es wurde

20 cm distal vom Meristem ein 5 cm breiter Streifen von den etwa 40 cm langen Jung-*Laminarien* für die Bestimmung des Melatoningehalts verwendet.

4.1.4 *Palmaria palmata* (L.) O. KUNTZE

Algen der Art *Palmaria palmata* wurden im Gewächshaus mit künstlicher Zusatzbeleuchtung (Norka; Sirius HIT-HST-DE, 150W; Osram HQI-TS 150 W / NDL UVS; L:D 16:8; 150 $\mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) in 2000l-Tanks gehältert. Die Wasseraustauschrate betrug ein Tankvolumen pro Tag mit einer Zusatzversorgung mit Nährstoffen nach BIDWELL (s.o.). Die Tetrasporophyten sind seit 1993 in Kultur und wurden vegetativ durch Teilung der Thalli vermehrt. Die männlichen Gametophyten sind seit Frühjahr 2002 durch Kurztaginduktion aus Tetrasporophyten gezüchtet worden. Sowohl Gametophyten als auch Tetrasporophyten wurden für die Bestimmung des Melatoningehalts eingesetzt. Eine Unterscheidung zwischen den beiden Generationsformen erfolgte nicht. Es wurden ausschließlich die wachstumsaktiven Spitzen bis maximal 2 cm Länge für die Messung von Melatonin eingesetzt.

4.1.5 *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty

Die Carrageenalge *Kappaphycus alvarezii* wurde in einem 100l-Durchflusstank bei 23°C unter Kunstlicht (Norka; vgl. 2.1.4; L:D 12:12; 200 $\mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) gehältert und vegetativ vermehrt. Einmal wöchentlich wurde der Durchfluss für 24 Stunden gestoppt und 600 ml Provasoli-Nährlösung (STARR & ZEIKUS, 1987) zugegeben. Nach Ablauf der 24 Stunden wurde das Wasser in dem Tank vollständig ausgetauscht. Auf diese Weise konnte der Aufwuchs von Epiphyten weitgehend verhindert werden. Es wurden ausschließlich die wachstumsaktiven Spitzen (max. 3 cm) für die Bestimmung des Melatoningehalts eingesetzt.

4.1.6 *Pterygophora californica* (RUPR.)

Die für die Messung von Melatonin eingesetzten Sporophyten wurden aus einer Gametophyten-Stammkultur gezüchtet und ab einer Länge von 1 cm in einem 100-l Durchflusstank bei 8°C unter Kunstlicht kultiviert (Norka; vgl. 2.1.4; LD 12:12; 50 $\mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). Die Durchflussrate betrug 1 Tankvolumen pro Tag. Die Versorgung mit Nährstoffen erfolgte nach BIDWELL (s.o.). Die zum Zeitpunkt der Messung etwa 15 cm langen Pflanzen wurden unmittelbar vor der Probenahme auf 10 cm Länge gekürzt. Es wurden die Thalli inklusive Stiel für die Bestimmung des Melatoningehalts eingesetzt.

4.1.7 *Lycopersicon esculentum* (MILL.)

Die untersuchten Früchte von *Lycopersicon esculentum* (im Folgenden als Tomate oder *Lycopersicon* bezeichnet) stammten aus einem lokalen Supermarkt und wurden vor der Aufarbeitung für 7 Tage bei 4-6°C im Schwachlicht gelagert. Es wurde die gesamte Frucht inklusive Schale und Kernen aufgearbeitet und für die Extraktion verwendet. Alle untersuchten Einzelproben sind Früchte einer einzigen Risse.

4.2 Probenaufarbeitung

Um eine Zerstörung des zu messenden Melatonins zu vermeiden, war es wichtig, möglichst schonende Methoden der Aufarbeitung zu wählen. Durch Mörsern in flüssigem Stickstoff, Arbeiten bei geringen Temperaturen und Fällung oder Inaktivierung von Proteinen wurde versucht, möglichst konservierende Bedingungen zu schaffen. Da Melatonin eine lichtempfindliche Substanz ist, wurden alle Schritte der Probenaufarbeitung und Extraktion im Schwachlicht ($< 0,1 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) durchgeführt. Extrakte phototropher sowie autotropher Organismen enthalten oft Photokatalysatoren, die unter Einwirkung von Licht Melatonin zerstören können (URÍA *et al.*, 1995; HARDELAND *et al.*, 1993, 1995). Der Algenhüllus wurde mit saugfähigem Papier abgerieben und anschließend das Frischgewicht bestimmt. Für eine spätere Extraktion wurden die Thalli in ein PE-Röhrchen (Nunc; 50 ml) gegeben, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80°C (maximal 2 Wochen) gelagert. Für eine direkte Aufarbeitung wurde das Algenmaterial unmittelbar nach dem Abwiegen in einen vorgekühlten Mörser mit flüssigem Stickstoff gegeben und die Extraktion durchgeführt.

Bei bisherigen Untersuchungen von Melatonin an phototrophen Organismen wurden sehr unterschiedliche Extraktionsmethoden verwendet. Diese basieren auf verschiedenen organischen Lösungsmitteln wie Ethanol, Ether und Aceton oder auf Perchlorsäure. In Vorversuchen wurden verschiedene Extraktionsmethoden auf eine hohe Wiederfindungsrate zugesetzten Melatonins getestet und optimiert, so dass bei den drei später verwendeten Methoden nach Zugabe von $100 \text{ pg} \cdot \text{g}^{-1}$ (Frischgewicht) Wiederfindungsraten von über 50% beobachtet wurden.

Um die Wahrscheinlichkeit einer Kontamination mit Melatonin zu minimieren, wurden so weit wie möglich Einweg-Glaswaren verwendet. Die verwendeten Porzellanmörser und mehrfach verwendete Glaswaren wurden nach intensiver Reinigung mindestens eine Stunde in demineralisiertem Wasser gebadet und im Trockenschrank bei 250°C für vier Stunden erhitzt.

Die Extrakte wurden teilweise aliquotiert um die Melatoninkonzentration mittels ELISA parallel mit und ohne vorherige Aufreinigung durch präparative HPLC bestimmen und miteinander vergleichen zu können.

4.2.1 Extraktion mit Perchlorsäure

In einen mit flüssigem Stickstoff gefüllten Mörser ($\varnothing = 15 \text{ cm}$) wurde 1 g Algenmaterial gegeben, mit 2 g Tris-HCl-Puffer (1 M, pH 8,4) und 100 μl Methanol bzw. Melatoninstandard ($1 \text{ pg} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ in Methanol) versetzt und intensiv gemörsert. Von dem gefrorenen Pulver wurden 2,05 g in ein verschließbares Probenröhrchen (Borsilikatglas; $13 \cdot 100 \text{ mm}$) eingewogen und mit 2,05 g wässriger Perchlorsäure-Lösung (0,4 M) versetzt. Nach 60 Minuten Extraktion im Dunkeln bei 6°C und gelegentlichem Vortexen wurde die Probe zunächst bei 10°C und 5500 g für 5 Minuten zentrifugiert. Der flüssige Überstand wurde auf zwei 1,5-ml Reaktionsgefäße verteilt und weitere zweimal bei 4°C und 20000 g für jeweils 15 Minuten zentrifugiert, wobei zwischen den Zentrifugationsschritten der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt wurde. Von diesem Extrakt wurden nacheinander 2,05 g (1988 μl) auf eine konditionierte 1 ml C_{18} -Säule geladen und nach den Waschschrinen (vgl. 2.2.4) mit 1000 μl Methanol

eluiert. Für eine direkte Bestimmung der Melatoninkonzentration wurde ein Aliquot von 300 μl von dem Eluat abgenommen, in der Vakuumzentrifuge (Bachhofer BA-VC-300 H; Kühlfalle: Bachhofer; KF-2-60 und Membran-Vakuumpumpe: Ilmvac LVS-301) vollständig eingedampft und mit 275 μl ELISA Rekonstitutionspuffer aufgenommen und bis zur Verwendung bei -80°C tiefgefroren. Die restlichen 700 μl wurden in der Vakuumzentrifuge eingedampft und mit 233 μl HPLC-Eluent aufgenommen.

4.2.2 Extraktion mit einem Aceton-Methanol-Gemisch

In einen Porzellanmörser mit flüssigem Stickstoff wurde 1 g Algenmaterial gegeben, mit 100 μl Methanol bzw. 100 μl Melatoninstandard in Methanol ($1 \text{ pg} \cdot \mu\text{l}^{-1}$) versetzt und zu einem feinen Pulver zerrieben. Nach Verdunstung des flüssigen Stickstoffs wurden 2-3 ml Extraktionslösung (89% Aceton; 10% Methanol; 1% Aqua dest.) zugegeben und für weitere 3 Minuten gemörsert. Der Extrakt wurde in ein Probenröhrchen (16 · 100 mm) gefüllt, der Mörser mit weiteren 2-4 ml Extraktionslösung nachgespült und anschließend 5 Minuten bei 5°C und 5000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde auf sechs Probenröhrchen verteilt, in die zuvor je 0,5 ml Trichloressigsäure (1% in Aqua dest.) gegeben wurden. Die Extraktion wurde zweimal wiederholt, indem das Pellet mit 2-4 ml Extraktionslösung resuspendiert und erneut in flüssigen Stickstoff gegeben und nach Zugabe einer kleinen Menge Quarzsand 3 Minuten gemörsert wurde. Der Extrakt wurde in ein Probenröhrchen umgefüllt, der Mörser mit Extraktionslösung nachgespült, zentrifugiert und der Überstand zu dem bisherigen Extrakt gegeben. In der Vakuumzentrifuge wurde der Extrakt eingedampft, wobei sukzessive die Extrakte in den einzelnen Probenröhrchen zusammengeführt wurden, bis das Volumen auf 2 bis 2,5 ml reduziert war. Anschließend wurde durch Zugabe von doppelt destilliertem Wasser das Volumen auf 3 ml gebracht, 1,5 ml in ein Reaktionsgefäß gefüllt und für 5 Minuten zentrifugiert (20000 g; 4°C). Von diesem Extrakt wurde 1 ml (entsprechend 333 mg Alge) auf eine vorbehandelte C_{18} -Säule geladen und nach den Waschschriften (vgl. 2.2.4) mit 1000 μl Methanol eluiert.

Für eine direkte Bestimmung der Melatoninkonzentration wurde ein Aliquot von 300 μl von dem Eluat abgenommen, in der Vakuumzentrifuge vollständig eingedampft und mit 275 μl ELISA Rekonstitutionspuffer aufgenommen und bis zur Verwendung bei -80°C tiefgefroren. Die restlichen 700 μl wurden in der Vakuumzentrifuge eingedampft und mit 233 μl HPLC-Eluent aufgenommen.

4.2.3 Extraktion mit Ether

In einen Porzellanmörser mit flüssigem Stickstoff wurde 1 g Algenmaterial gegeben, mit 3 g einer 1 M Na_2CO_3 -Lösung (2727 μl) und 100 μl Methanol bzw. 100 μl Melatoninstandard in Methanol ($1 \text{ pg} \cdot \mu\text{l}^{-1}$) versetzt. Das Gemisch wurde zu einem feinen Pulver zermörsert und anschließend wurden 3,06 g in ein 15 ml Polyethylen-Röhrchen eingewogen. Nach 20-minütiger Aufbewahrung im Dunkeln bei Raumtemperatur und kurzem Vortexen wurden 9 ml Ether zugegeben und für 60 Minuten bei 6°C und gelegentlichem intensiven Schütteln extrahiert. Anschließend wurde die Probe bei 10°C und 5500 g für 5 Minuten zentrifugiert. Die Etherphase wurde in ein Probenröhrchen (16 · 100 mm) überführt und in einer Vakuumzentrifuge vorsichtig eingedampft, während die untere wässrige Phase mit weiteren 3 ml Ether vermischt und für 30 Minuten

nachextrahiert wurde. Nach erneutem Zentrifugieren (10°C, 5500 g, 5 min.) wurde die Etherphase abgenommen, zu der weitgehend eingedampften Probe dazugegeben und anschließend vollständig evaporiert. Das Lyophyllisat wurde dann mit 2000 µl Ether gelöst und ein Aliquot von 267 µl wurde für die direkte ELISA-Messung abgenommen. Nach dem Eindampfen beider Proben in der Vakuumzentrifuge wurde die Probe für die direkte Bestimmung mit 275 µl ELISA-Rekonstitutions-Puffer aufgenommen und bis zur Messung bei -80°C tiefgefroren. Die andere Probe wurde mit 650 µl HPLC-Eluent und einer kleinen Menge Quarzsand versetzt und für mindestens 30 Minuten unter gelegentlichem Mixen rekonstituiert.

Diese Extraktionsmethode wurde nach Vergleich mit den anderen Methoden als praktikabelste ausgewählt und zu einer weiteren Steigerung der Empfindlichkeit mit einer höheren Aufkonzentrierung der Extrakte eingesetzt, indem bei späteren Messungen das gesamte Lyophyllisat mit 500 µl HPLC-Eluent rekonstituiert wurde (entsprechend 150 mg Alge · Injektion⁻¹ bei einem Volumen der HPLC-Injektionsschleife von 100 µl).

4.2.4 Festphasenextraktion

Durch Verwendung von C₁₈-Festphasen-Extraktionssäulen (Bakerbond spe Octadecyl; 1 ml; Korngröße 40 µm) wurde eine Hochkonzentrierung der Proben sowie eine Eliminierung zahlreicher mit der Messung interferierender Matrixkomponenten erreicht.

Konditionieren:

2 · 1 ml Methanol auf die Säule geben und je 1 Minute bei 200 g zentrifugieren.

2 · 1 ml Wasser auf die Säule geben und je 1 Minute bei 200 g zentrifugieren.

Beladen:

1 ml (für PCA-Extrakte 2 · 1 g) auf die Säule geben und 1 Minute bei 200 g zentrifugieren (Zentrifugation wiederholen, falls die Säule nach 1 Minute noch nicht vollständig entleert ist).

Waschen:

2 · 1 ml 10% Methanol (in Wasser; v/v) auf die Säule geben und 1 Minute bei 500 g zentrifugieren.

1 ml Hexan auf die Säule geben und 1 Minute bei 500 g zentrifugieren.

Eluieren:

1 ml Methanol auf die Säule geben und 1 Minute bei 200 g zentrifugieren

Das Eluat wird für HPLC- und ELISA-Messungen aliquotiert und nach Evaporation in der Vakuumzentrifuge mit HPLC-Eluent bzw. ELISA-Rekonstitutionspuffer aufgenommen (vgl. 2.2.1 und 2.2.2).

4.3 Bestimmung des Melatoningehalts durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) mit Fluoreszenzdetektion

Zur Quantifizierung von Melatonin wurde parallel mit 2 HPLC-Anlagen gearbeitet. Quantifizierungen mit Hilfe der einen Anlage beruhten auf der direkten Messung der natürlichen Fluoreszenz von Melatonin bei einer Anregungswellenlänge von 285 nm und einer Emissionswellenlänge von 360 nm und wurden im Folgenden als HPLC-1 bezeichnet. Für die Messung von Melatonin mit Hilfe des zweiten HPLC-Systems erfolgte zunächst eine Derivatisierung des Melatonins zu N-[(6-Methoxy-4-oxo-1,4-dihydroquinolin-3-yl)methyl]acetamid (TOMITA *et al.*, 2003), welches anschließend fluorometrisch bei einer Exzitationswellenlänge von 245 nm und einer Emissionswellenlänge von 385 nm quantifiziert wurde. Dieses HPLC-System zur Messung des Melatoninderivats wurde im Folgenden als HPLC-2 bezeichnet.

Die Registrierung der Messdaten beider HPLC-Anlagen erfolgte über einen mit einem Analog/Digital-Wandler verbundenen PC, der mit der Software Chromeleon (Firma Gynkotec; Ver. 4.30) ausgestattet war.

4.3.1 HPLC zur direkten Messung des Melatonins (HPLC-1)

Melatonin und strukturverwandte Indolamine konnten mittels Ionen-Paar-Reversed-Phase-HPLC aufgetrennt und fluorometrisch nachgewiesen werden. Die HPLC-Anlage setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen: HPLC-Pumpe mit integriertem Pulsationsdämpfer (Firma Gynkotec, Modell P 580 A). Die Proben wurden über ein manuelles Probenaufnahmesystem (Firma Rheodyne; *Syringe Loading Sample Injector*, Modell 9125) in Kombination mit einer 100 µl Injektionschleife aufgegeben. Die Temperaturkonstanz der Trennsäule wurde durch einen Säulenofen (Peltier-Kolonnen thermostat STH 585 der Firma Gynkotec) sichergestellt. Durch eine Vorsäule (TosoHaas; Guard Filter Super ODS 4 mm ID) wurde die Hauptsäule (TosoHaas; Nr. 18197; TSKgel Super ODS; Innendurchmesser 4,6 mm; Länge 10 cm; Korngröße 2 µm) vor Verunreinigungen geschützt.

Die Registrierung der Substanzen erfolgte mittels Fluoreszenzdetektor (Dionex; Modell RF 2000). Darüber hinaus war hinter dem Fluoreszenzdetektor noch ein elektrochemischer Detektor (Antec Leyden; Modell INTRO) installiert, der jedoch aufgrund einer um den Faktor 5 geringeren Empfindlichkeit, höherem Wartungsbedarf und Störanfälligkeit meist nicht zum Einsatz kam.

Der Eluent wurde in einem 2 Liter Grob-Hersch-Extraktionsgefäß aufbewahrt (GASSMANN *et al.* 1995) und etwa wöchentlich für 2-3 Stunden mit Helium begast.

Zusammensetzung des Eluenten:

Zur Bestimmung von Melatonin und strukturverwandten Tryptophan-metaboliten wurde ein methanolhaltiger Eluent in Phosphat-Citrat-Puffer nach PÖGGELER (1992) mit gerinen Modifikationen verwendet. Der Eluent setzte sich zusammen aus 12,30 g · l⁻¹ Zitronensäure, 2,14 g · l⁻¹ Natriumdihydrogenphosphat, 2,14 g · l⁻¹ Dinatriumhydrogenphosphat, 32 mg · l⁻¹ EDTA zur Komplexierung von Metallen und 0,96 g · l⁻¹ Octansulfonsäure als Ionenpaarreagenz. Alle Komponenten wurden in 4 Liter doppelt destilliertem Wasser bzw. Reinstwasser (vgl. 2.20) gelöst, 900 ml Methanol zugegeben und

der pH-Wert durch Zugabe von NaOH auf einen Wert von 5,5 eingestellt. Anschließend wurde das Gesamtvolumen auf 5 l gebracht. Vor der Verwendung wurde der Eluent in dem Grob-Hersch-Gefäß für mindestens 2 Stunden mit Helium begast. Dies verhinderte eine plötzliche Abnahme des Drucks der HPLC-Pumpe durch ausperlende Mikrogasbläschen.

Vorübergehend wurde auch mit einer Octansulfonsäure-Konzentration des Eluenten von 9 mM gearbeitet, da sich zunächst andeutete, dass bei dieser Konzentration keine Coelution des Melatonins mit anderen Substanzen auftritt. Dies erwies sich jedoch im weiteren Verlauf der Arbeit als nicht zutreffend. Durch die hohe Konzentration des Ionenpaarreagens wurde die Basislinie des Fluoreszenzdetektors im Laufe mehrerer Wochen zunehmend instabil, so dass wieder mit einer Konzentration von 4,4 mM gearbeitet wurde. Die Wiederfindung zugesetzten Melatonins, sowie die Messung nativen Melatonins in den Extrakten durch LC-ELISA und HPLC nach Vorsäulenderivatisierung war unbeeinflusst davon, ob mit 4,4 oder 9,0 mM Octansulfonsäure gearbeitet wurde.

Geräteeinstellungen:

HPLC-Pumpe:	1,0 ml · min ⁻¹ (132 ±5 bar)
Säulenofen:	40°C
Fluoreszenzdetektor:	
Gain:	2
Sens:	1
Response:	3
λ _{ex} :	285 nm
λ _{em} :	360 nm

4.4 Extraktion des Melatonins aus HPLC-1-Fractionen

Durch das Auffangen von Fractionen der HPLC-Läufe mit anschließender Extraktion des Melatonins durch Ausschütteln mit Chloroform war es möglich, die eigentlich zur Quantifikation bestimmte Anlage auch zur Aufreinigung der Extrakte und somit zum Abtrennen von Substanzen, die mit der Messung interferieren würden, zu nutzen. Der Melatoningehalt der aufgereinigten Extrakte konnte anschließend durch Enzym-gekoppelten Immunoassay (ELISA; vgl. 2.6) oder per HPLC nach vorheriger Derivatisierung (vgl. 2.5) bestimmt werden. Das Auffangen von 1-Minuten-Fractionen (= 1 ml) wurde 0,4 Minuten vor der Melatoninretentionszeit begonnen und endete 0,6 Minuten danach (vgl. Abb. 2-1).

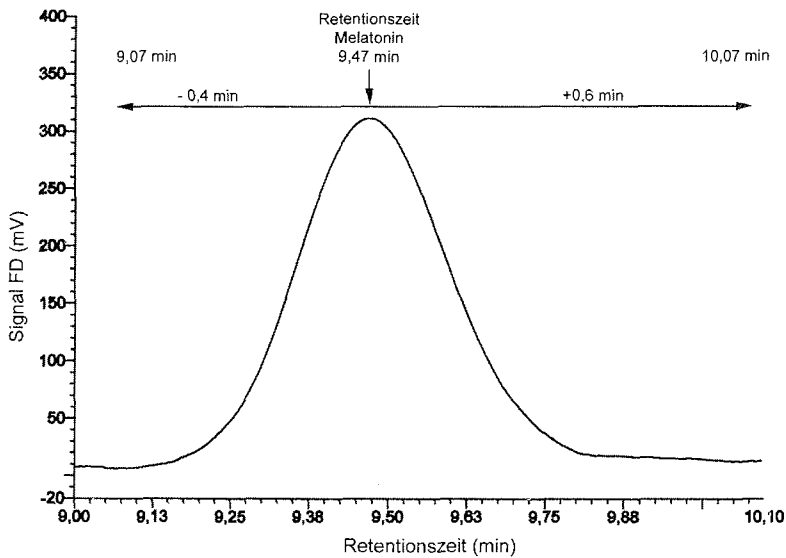


Abb. 2-1: Zeitfenster für das Auffangen der Melatoninfraktion für die hochdruckflüssigkeitschromatographische Aufreinigung am Beispiel eines Peaks entsprechend 100 pg Melatonin.

Die Fraktionen der HPLC-Läufe wurden manuell aufgefangen, indem die Auslassleitung des Fluoreszenzdetektors vorübergehend getrennt und die austretende Flüssigkeit in einem Borsilikatglas-Probenröhrchen (12 · 75 mm) aufgefangen wurde. Unmittelbar danach wurden 2 ml Chloroform zugesetzt und für 5 Sekunden bei maximaler Geschwindigkeit gevortext (Vortex-Genie-2; Scientific Industries). Die Proben wurden dann 30 Minuten bei 6°C im Dunkeln aufbewahrt und anschließend 2 Minuten bei 10°C und 2000 g zentrifugiert um eine bessere Phasentrennung zu erzielen. Mit Hilfe einer Pasteur-Pipette wurde die untere Chloroformphase vorsichtig aufgenommen, in ein neues Probenröhrchen überführt und in der Vakuumzentrifuge vorsichtig eingedampft.

Sollten die Proben für eine Quantifizierung des Melatonins mittels ELISA (vgl. 2.5) verwendet werden, wurde die vollständig eingedampfte Probe mit 275 µl ELISA-Rekonstitutionspuffer aufgenommen, in ein Reaktionsgefäß überführt und bis zur Verwendung bei -80°C tiefgefroren.

Für eine Quantifizierung des in den Fraktionen enthaltenen Melatonins durch Vorsäulenderivatisierung und anschließender HPLC (HPLC-2; vgl. 2.5) wurden die Chloroformextrakte von drei HPLC-1-Läufen gepoolt, in der Vakuumzentrifuge eingedampft und anschließend mit 200 µl Wasser 30 Minuten rekonstituiert bevor die chemische Umsetzung eingeleitet wurde (vgl. 2.5.1).

Bei Quantifizierungen des Melatoningehalts von *Lycopersicon* reichte wegen des höheren Melatoningehaltes der Extrakt eines einzelnen HPLC-1-Laufes für die Quantifizierung des Melatoninderivats aus.

4.5 Messung von Melatonin nach Vorsäulen-Derivatisierung

Die in der Hochdruckflüssigkeitschromatographie zur Bestimmung von Melatonin eingesetzten Detektionsmethoden basieren entweder auf der Oxidierbarkeit des Melatonins (elektrochemische Detektion / ECD) oder auf der natürlichen für ein Indol typischen Fluoreszenz (Fluoreszenz-Detektion / FD). Erst kürzlich wurde von INUMA *et al.* (1999) eine Methode beschrieben, bei der das Melatonin unter alkalischen Bedingungen in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid chemisch umgesetzt wird. Das entstehende chemisch erst vor kurzem als N-[(6-Methoxy-4-oxo-1,4-dihydroquinolin-3-yl)methyl]acetamid (Abb. 2-2) identifizierte Melatoninderivat zeichnet sich durch ein Exzitationsmaximum bei 245 nm sowie ein Emissionsmaximum bei 380 nm (Melatonin: 280/350 nm) aus und kann mittels HPLC-FD gemessen werden. Die Methode ermöglicht hochsensitive Messungen von Melatonin mit einer Nachweisgrenze von 200 amol (entspr. 0,046 pg Melatonin) pro Injektion und konnte zur Quantifizierung des Melatoningehalts in Pinealorganen von Mäusen eingesetzt werden (HAMASE *et al.*, 2000; TOMITA *et al.*, 2003).

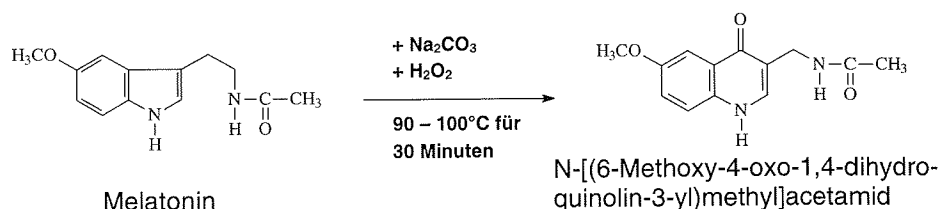


Abb. 2-2: Umsetzung von Melatonin nach TOMITA *et al.* (2003)

4.5.1 Derivatisierung des Melatonins

Wässrige Extrakte der HPLC-1-Fractionen (200 µl), wie unter 2.4 beschrieben, wurden in einem Borsilikatglas-Probenröhrchen (12 · 75 mm) mit 20 µl einer 1 M Na₂CO₃-Lösung sowie 20 µl einer 50 mM H₂O₂-Lösung versetzt und durchmischt. Die Proben wurden mit einem Deckel verschlossen und für 30 Minuten im Wasserbad bei 92°C inkubiert. Nach dem Abkühlen konnten die Proben mit einer 100 µl-Hamilton-Spritze in das HPLC-2-System aufgegeben werden. Das Gesamtvolumen von 240 µl ermöglichte die Durchführung von Parallelbestimmungen.

Zur Erstellung einer Eichkurve wurde ebenfalls der umständliche Weg über eine Injektion in HPLC-1, Auffangen und Extraktion der Melatoninfraktion mit anschließender Derivatisierung gewählt. Dies erwies sich als notwendig, da bei einer direkteren Aufarbeitung (Evaporation eines methanolischen Melatoninstandards → Rekonstitution in H₂O → Derivatisierung) kleinere Peaks gemessen wurden (vgl. Abb. 3-8).

Eine Derivatisierung mit anschließender Quantifizierung ohne vorherige Aufreinigung mittels präparativer HPLC wurde ebenfalls versucht. Es zeigte sich jedoch, dass der Melatoninderivat-Peak nicht von anderen Matrixkomponenten separiert werden konnte.

4.5.2 HPLC zur fluorometrischen Messung des Melatoninderivats (HPLC-2)

Der Aufbau der HPLC-Anlage zur Bestimmung des Melatoninderivats war weitgehend identisch mit der zuvor beschriebenen Anlage und unterschied sich lediglich in der verwendeten HPLC-Pumpe (Gynkotek; Modell M480 D mit Pulsationsdämpfer PD-1) und der Trennsäule (Firma TosoHaas; Nr. 17201; TSKgel ODS-80TS; Innendurchmesser 4,6 mm; Länge 15 cm; Korngröße 5 µm).

Zusammensetzung des Eluenten:

Es wurde ein Natriumphosphat-gepufferter Eluent (100 mM; pH = 7,0) mit 9% Acetonitril verwendet. Dazu wurden 50 mmol Natriumdihydrogenphosphat und 50 mmol Dinatriumhydrogenphosphat in 850 ml Bidest., bzw. Reinstwasser (vgl. 2.19) gelöst und 90 ml Acetonitril zugegeben. Der pH-Wert wurde überprüft und ggf. mit 1 M HCl oder 1 M NaOH auf 7,0 eingestellt. Anschließend wurde das Volumen mit H₂O_{bidest.} auf 1 l aufgefüllt. Vor der Verwendung sowie in etwa wöchentlichen Intervallen wurde der Eluent für mindestens 2 Stunden in dem Grob-Hersch-Gefäß mit Helium durchströmt.

Geräteeinstellungen:

HPLC-Pumpe:	1,5 ml · min ⁻¹ (107 ±2 bar)
Säulenofen:	40°C
Fluoreszenzdetektor:	
Gain:	2
Sens:	1
Response:	3
λ _{ex} :	245 nm
λ _{em} :	380 nm

4.6 Bestimmung von Melatonin mittels Enzym-gekoppeltem Immunoassay (ELISA)

Zur immunologischen Quantifizierung von Melatonin wurde ein kommerzieller ELISA-Kit (Bühlmann Laboratories AG, Schweiz; EK-DSM) eingesetzt, welcher für die direkte, quantitative Messung von Melatonin in menschlichem Speichel sowie in extrahierten Serum-, Plasma- und Urinproben entwickelt wurde. Dieser ELISA zeichnet sich durch eine sehr hohe Empfindlichkeit für die Bestimmung von Melatonin bei gleichzeitig geringen Kreuzreaktivitäten mit verschiedenen Tryptophanmetaboliten aus.

Die Messung des Melatonins erfolgte in drei Schritten: Im ersten Reaktionsschritt konkurrieren das Melatonin der Probe bzw. des Standards mit einem Melatonin-Biotin-Konjugat um die Bindungsstellen des an die Wände der Mikrotiterplatten gebundenen Melatonin-Antikörpers. Nach intensivem Waschen nicht-gebundener Komponenten wurde im zweiten Reaktionsschritt an Streptavidin gebundene Meerrettich-Peroxidase zugesetzt. Streptavidin bindet mit hoher Affinität und Spezifität an Biotin. Nicht gebundener Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase-Komplex wurde durch intensives Spülen entfernt. Im dritten Reaktionsschritt wurde das farblose Substrat Tetramethylbenzidin (TMB) zugesetzt. Durch die über den Immunkomplex an die Wände der

Mikrotiterplatten gebundene Meerrettich-Peroxidase wurde das TMB zu einem blauen Farbstoff oxidiert. Schließlich wurde die Reaktion durch Zugabe einer Schwefelsäurelösung gestoppt, wobei es zu einem Farbumschlag von blau nach gelb kam. Die Bildung des gelben Farbstoffs ist umgekehrt proportional zur Melatoninkonzentration in der Probe. Die optische Dichte bei 450 nm wurde mit Hilfe eines Mikroplaterereaders gemessen. Der Messbereich lag zwischen $0,1$ und $2,7 \text{ pg} \cdot \text{well}^{-1}$ entsprechend dem kleinsten und größten Standard.

Für die Bestimmung von Proben, deren Melatoninkonzentration den Messbereich des ELISA übersteigt, beispielsweise für die Erstellung von Eichungen, wurden diese kurz vor der Durchführung des ELISA um einen entsprechenden Faktor mit Rekonstitutionspuffer verdünnt.

4.6.1 Protokoll für ELISA-Messungen

Da das verwendete Protokoll von den Angaben des Herstellers abweicht, sind die einzelnen Schritte hier detailliert aufgeführt:

Durch 4000-fache Verdünnung mit Methanol wurde die Melatoninstandard-Lösung auf $0,025 \text{ pg} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ gebracht. Dann wurden 10 , 30 , 90 , 180 und $270 \mu\text{l}$ in Eppendorf-Reaktionsgefäße ($1,5 \text{ ml}$) gegeben, in der Vakuumzentrifuge vorsichtig eingedampft und anschließend mit $250 \mu\text{l}$ Rekonstitutionspuffer (Bühlmann Laboratories AG, Schweiz; EK-DSM-RB) mindestens 30 Minuten rekonstituiert. Da jeweils $100 \mu\text{l} \cdot \text{Mikrotitergefäß}^{-1}$ eingesetzt wurden, entspricht dies einer Eichkurve von $0,1$ bis $2,7 \text{ pg} \cdot \text{Mikrotitergefäß}^{-1}$.

Die Mikrotiterplatten wurden zweimal mit $375 \mu\text{l} \cdot \text{well}^{-1}$ ELISA-Wasch-Puffer gewaschen und überschüssige Flüssigkeit durch Ausklopfen auf einen Stapel Zellstofftücher entfernt. Im Anschluss wurden für Parallelbestimmungen je zweimal $100 \mu\text{l}$ 0-Probe (blank), Standard oder Probe in die Mikrotitergefäße pipettiert. Nach Zugabe von $50 \mu\text{l}$ Melatonin-Biotin-Konjugat wurde die ELISA-Platte für 60 Sekunden auf einem Horizontalmischer (Heidolph, Germany; Titramax 100) auf Stufe 5 durchmischt und anschließend für 3 Stunden bei 6°C im Dunkeln inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit Wasch-Puffer ($4 \cdot 375 \mu\text{l}$) und erneutem Ausklopfen wurden $100 \mu\text{l} \cdot \text{well}^{-1}$ Enzym-Label (Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase) zugesetzt und für 60 Minuten auf dem Horizontalmischer bei Raumtemperatur durchmischt. Durch erneutes viermaliges Waschen wurde nicht-gebundene Streptavidin-Peroxidase entfernt und nach Ausklopfen überschüssiger Flüssigkeit wurden $100 \mu\text{l} \cdot \text{well}^{-1}$ Tetramethylbenzidin-Lösung (TMB-Substrat) zugesetzt. Nach 30-minütiger Inkubation auf dem Mixer bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Zugabe von $100 \mu\text{l}$ Stop-Lösung (Schwefelsäure-Lösung) gestoppt und anschließend die optische Dichte bei 450 nm mit einem Mikroplaterereader (MWG Biotech AG; Modell Lambda E) bestimmt.

Die Berechnung der Melatoninkonzentrationen erfolgte mit Hilfe des Programms Fig.P (Biosoft; Vers. 2.98) unter Verwendung der Formel für asymmetrische sigmoidale Kurvenverläufe:

$$f(x) = \min + (\max - \min) / (1 + (x / x_{50})^{-P})$$

4.7 Standard-Lösungen

In 50 ml Methanol wurden 3 mg Melatonin gelöst und durch serielle Verdünnung auf $100 \text{ pg} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ (entspricht 431 nM) gebracht. Dieser

Melatoninstandard erwies sich bei Lagerung im Dunkeln bei 6°C als außerordentlich stabil, so dass zwischen frisch angesetztem und 1 Jahr altem Melatoninstandard weder mit HPLC- noch ELISA-Messungen unterschieden werden konnte. Es ist allerdings wichtig, eine Verdunstung des Methanols, etwa durch nicht gasdichte Gefäße oder längeres Öffnen zu vermeiden. Auch für weitere Tryptophanmetabolite wurden methanolische Standard-Lösungen angesetzt, deren Endkonzentrationen zwischen 80 und 200 pg · µl⁻¹ lagen. Hierbei konnte per HPLC-Messung ebenfalls kein Zerfall der in Methanol gelösten Substanzen beobachtet werden.

4.8 Bestimmung der Ausbeute

Um Verluste des Melatonins während der Extraktion und der Probenaufarbeitung abschätzen zu können, wurden Proben nach einem groben Vormörsern aufgeteilt und ein Teil mit Melatoninstandard (100 pg Melatonin in 100 µl Methanol pro g Frischgewicht) versetzt, während der andere Teil der Probe mit der gleichen Menge Methanol versetzt wurde. Der Melatoningehalt wurde mit den beschriebenen Methoden bestimmt und aus der Differenz die Wiederfindungsrate berechnet.

Für die Arten *Porphyra*, *Ulva* und *Laminaria* wurde zusätzlich durch Zugabe unterschiedlicher Melatoninmengen zu einer homogenen Probe eine Eichkurve auf der pflanzlichen Matrix erstellt und auf Linearität getestet. Auf diese Weise wurde überprüft, ob der Anteil des während der Aufarbeitung verloren gegangenen Melatonins unabhängig von der zugesetzten Menge ist.

Etwa 18 g Algenmaterial wurden in einen Porzellanmörser mit flüssigem Stickstoff gegeben, grob vorgemörsert und in ein vorgekühltes 50 ml PE-Röhrchen gefüllt. Diese Probe wurde in flüssigem Stickstoff aufbewahrt, um eine Zerstörung des Melatonins zu vermeiden. Dann wurde jeweils 1 g dieses Pulvers entnommen und nach Zugabe von 0, 25, 50, 100 oder 250 pg Melatonin (gelöst in 100 µl Methanol) mit der Ethermethode extrahiert (vgl. 2.2.3). Nach vollständigem Eindampfen des Etherextraktes werden 500 µl HPLC-Eluent sowie eine kleine Menge Quarzsand zugegeben und das in dem Lyophyllisat enthaltene Melatonin gelöst (mindestens 30 Minuten bei gelegentlichem Vortexen). Nach Injektion in HPLC-1 wird die Melatoninfraktion aufgefangen, extrahiert und der Melatoningehalt mit dem ELISA bestimmt. Für jede zugesetzte Melatoninmenge wurden jeweils 3 Parallelbestimmungen durchgeführt.

4.9 Vergleich von Extraktionsmethoden

Durch parallele Aufarbeitung möglichst homogener Proben mit den verschiedenen Extraktionsmethoden sollte die Effizienz der unterschiedlichen Extraktionen verglichen werden. Der Melatoningehalt der so gewonnenen Extrakte wurde sowohl direkt als auch nach vorheriger Aufreinigung mittels präparativer HPLC immunologisch durch ELISA-Messungen bestimmt. Auf diese Weise war es möglich, Aussagen darüber zu treffen, inwieweit die verschiedenen Extraktionsmethoden auch Substanzen extrahieren, die im ELISA durch Kreuzreaktivitäten zu falsch-positiven Ergebnissen führen. Um eine möglichst hohe Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurden die eingesetzten Mengen und Konzentrationen bei allen Extraktionsmethoden so

gewählt, dass das Probenvolumen pro HPLC-Lauf immer dem Extrakt von 100 mg Alge (Frischgewicht) entsprach. Bei den ELISA-Bestimmungen entsprachen die eingesetzten Konzentrationen pro Mikrotitergefäß 36,4 mg Probenmaterial, unabhängig von der Extraktionsmethode sowie davon, ob direkte oder HPLC-aufgereinigte Extrakte eingesetzt wurden.

Zunächst wurden 8 g Algenthali abgewogen, in flüssigem Stickstoff grob vorgemörstert und auf 2 Portionen mit jeweils 4 g aufgeteilt. Eine der Proben wurde mit 400 µl Melatoninstandard ($1 \text{ pg} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ in Methanol) versetzt, während der anderen Probe 400 µl Methanol zugegeben wurden. Anschließend wurde jeweils 1 g mit Ether, Perchlorsäure oder Aceton extrahiert und für direkte ELISA-Quantifizierungen und ELISA-Messungen nach Aufreinigung mittels präparativer HPLC (LC-ELISA) aliquotiert (vgl. 2.2.1 bis 2.2.3).

Diese vergleichenden Messungen wurden exemplarisch an *Porphyra*, *Ulva* und *Laminaria* an jeweils 3 voneinander unabhängigen Proben durchgeführt.

4.10 Einfluss der Lichtintensität während der Aufarbeitung

Melatonin ist eine lichtempfindliche Substanz und wird leicht durch Photooxidation zerstört. Durch Aufarbeitung und Extraktion im Dunkeln oder im schwachen Rotlicht kann dies vermieden werden (POEGGELER & HARDELAND, 1994). Die Anfälligkeit des Melatonins gegenüber Photooxidation sollte für das verwendete Extraktionsverfahren (Na_2CO_3 -Ether) erfasst werden. Am Beispiel der Rotalge *Porphyra* wurde der Einfluss von Licht während der Probenaufarbeitung auf die gemessenen Melatoninkonzentrationen sowie auf die Wiederfindungsrate zugesetzten Melatonins untersucht.

Mehrere *Porphyra*-Thalli (20 g) wurden unter schwachem Rotlicht in einem Mörser mit flüssigem Stickstoff grob gemörstert und in ein vorgekühltes PE-Röhrchen gefüllt. Ausgehend von diesem weitgehend homogenen Probenmaterial wurde in drei Parallelproben je Lichtintensität jeweils mit und ohne Zugabe von Melatoninstandard ($100 \text{ pg} \cdot \text{g}^{-1}$) der Melatoningehalt mittels LC-ELISA bestimmt. Dazu wurde jeweils 1 g Probenmaterial mit der Ethermethode bei schwachem Rotlicht (1), bei Schwachlicht von etwa $0,1 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (2) und bei voller Laborbeleuchtung entsprechend etwa $15\text{-}20 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (3) extrahiert und der Melatoningehalt bestimmt. Aus der Differenz der Proben mit und ohne Zugabe des Melatoninstandards wurde die Wiederfindungsrate berechnet.

4.11 Tag-Nacht-Vergleiche

Der Melatoningehalt verschiedener Makroalgen sollte auf mögliche Tag/Nacht-Unterschiede untersucht werden. Von den Arten *Porphyra*, *Ulva*, *Laminaria*, *Palmaria palmata*, *Pterygophora californica* und *Kappaphycus alvarezii* wurden jeweils 6 Tag- und 6 Nachtproben genommen, mit der Ether-Methode extrahiert und deren Melatoningehalt durch LC-ELISA bestimmt. Die Proben wurden nach der Probennahme, die jeweils in der Mitte des Tages bzw. der Nacht erfolgte, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bis zur Aufarbeitung (maximal 2 Wochen) bei -80°C gelagert.

4.12 Einfluss der Octansulfonsäure-Konzentration auf die Retentionszeiten verschiedener Tryptophanmetabolite im HPLC-1-System

Durch Variation der Zusammensetzung des Eluenten können Retentionszeiten verschiedener Tryptophanmetabolite verändert werden und so oftmals eine Separation des Melatonins erreicht werden. Gleichzeitig dient eine Veränderung der Eluentenzusammensetzung der Validierung der Messungen, indem überprüft wird, ob sich die Retentionszeit des vermeintlichen Melatonin-Peaks auf die gleiche Weise verändert, wie die zugesetzten Melatoninstandards. Eine Veränderung des pH-Wertes hat vor allem einen Einfluss auf die Retentionszeiten von Indolen mit Carboxylgruppe wie Indoleessigsäure (IAA) und Methoxyindoleessigsäure, während die Retentionszeit des Melatonins weitgehend konstant bleibt. Durch Erhöhung bzw. Reduzierung des Methanolanteils des Eluenten kommt es zu einer unspezifischen Stauchung, respektive Streckung des gesamten Laufes.

Der Einfluss der Ionenpaarreagenzkonzentration auf die Retentionszeiten verschiedener Tryptophanmetabolite wurde von HARUMI *et al.* (1996) sowie von HARUMI & MATSUSHIMA (2000) bereits beschrieben und wurde für das hier verwendete System erneut bestimmt. Bei Konzentrationen der Octansulfonsäure (OSA) zwischen 1,0 und 9,0 mM wurden die Retentionszeiten der Tryptophanmetabolite 5-Methoxytryptophol, Melatonin, N-Acetyltryptamin, 5-Methoxytryptamin und Tryptamin im HPLC-1-System untersucht.

Nach Änderung der Eluentenzusammensetzung wurde jeweils gewartet, bis das Signal des Fluoreszenzdetektors stabil war und anschließend durch Injektionen der verschiedenen Tryptophanmetabolite deren Retentionszeiten bestimmt.

4.13 Fluoreszenzspektren

Für synthetisches Melatonin wurde das Fluoreszenzspektrum aufgezeichnet. Hierzu wurde der Melatoninstandard 100-fach mit Eluent verdünnt ($100 \text{ pg} \cdot \text{Injektion}^{-1}$) und wiederholt bei verschiedenen Exzitations- und Emissionswellenlängen in HPLC-1 injiziert. Die Messung des Exzitationspektrums im Bereich von 225 nm bis 325 nm erfolgte bei einer Emissionswellenlänge von 360 nm; die des Emissionsspektrums im Bereich von 310 nm bis 410 nm entsprechend bei einer Anregungswellenlänge von 285 nm.

Auf die gleiche Weise wurde auch das Fluoreszenzspektrum des potentiellen Melatonin-Peaks eines *Porphyra*-Extraktes aufgezeichnet.

Um sicherzustellen, dass das von TOMITA *et al.* (2003) beschriebene Produkt gemessen wurde, wurde mit dem HPLC-2-System für das Melatoninderivat ein Fluoreszenzspektrum aufgezeichnet. Hierzu wurde das Exzitationsspektrum von 220 nm bis 300 nm bei einer Emissionswellenlänge von 384 nm und das Emissionsspektrum im Bereich von 320 nm bis 440 nm respektive bei einem Anregungslicht von 245 nm gemessen.

4.14 Immunoreaktivität in HPLC-Fractionen um den Melatonin-Peak

Neben einer Quantifizierung des Melatonins in der HPLC-1-Fraktion, in der das Melatonin eluiert, wurde auch in jeweils 2 Fraktionen vorher und nachher auf eine mögliche Melatonin-Immunoreaktivität hin untersucht. Hierzu wurden 5 Fraktionen für je eine Minute, beginnend 2,4 Minuten vor der Melatonin-Retentionszeit bis 2,6 Minuten danach, einzeln manuell aufgefangen (vgl. 2-1). Nach Extraktion der Fraktionen mit Chloroform (vgl. 2.4) wurden die Proben in den ELISA eingesetzt und die (apparente) Melatoninkonzentration bestimmt.

Diese Messungen wurden an *Porphyra*, *Ulva* und *Laminaria* mit den drei verwendeten Extraktionsmethoden in jeweils drei voneinander unabhängigen Proben durchgeführt. An Früchten von *Lycopersicon* wurden entsprechende Messungen lediglich an etherischen Extrakten vorgenommen.

4.15 Einfluss der Mörserintensität

Der Einfluss des Zellaufschlusses auf die gemessenen Melatoninkonzentrationen sollte untersucht werden. Einerseits ist es vorstellbar, dass durch einen vollständigeren Zellaufschluss ein höherer Anteil des in den Zellen enthaltenen Melatonins extrahiert und quantifiziert wird. Andererseits wäre es auch möglich, dass während intensiven Mörserns Radikale generiert werden, die zu einer Zerstörung des Melatonins führen.

Um beide Faktoren zu erfassen, wurde der Gehalt endogenen Melatonins einer *Porphyra*-Probe sowie die Wiederfindungsrate des zu Beginn der Extraktion zugesetzten Melatonins ($100 \text{ pg} \cdot \text{g}^{-1}$) bei drei unterschiedlich intensiven Stufen des Mörserns während der Extraktion verglichen. Zur Bewertung und Dokumentation der Größe der Zellfragmente wurden die Extrakte im Binokular betrachtet und fotografiert.

Für die Messung wurden 20 g Thalli von *Porphyra* mit Zellstofftüchern abgerieben, getrocknet und in einem Mörser mit flüssigem Stickstoff zu einem weitgehend homogenen Pulver grob vorgemörsert. Hiervon wurde dann in drei Parallelbestimmungen jeweils 1 g mit 100 μl Methanol bzw. Melatoninstandard versetzt und mit 1 g Natriumcarbonatlösung mit unterschiedlicher Intensität gemörsert. Für einen Zellaufschluss der Stufe 1 wurde 15 Sekunden mit leichter Kraft gemörsert, während bei Stufe 2 und 3 über 60 bzw. 180 Sekunden mit hoher Kraft gemörsert wurde. Zwischendurch wurde flüssiger Stickstoff nachgefüllt.

Anschließend wurde der Melatoningehalt durch LC-ELISA bestimmt und die Wiederfindungsrate berechnet.

4.16 Stabilität beim Tieffrieren

Für die Bestimmung von Melatonin in umfangreichen Messserien wie z.B. Tagesgängen ist es notwendig, die Proben während des Zeitraumes zwischen Probennahme und Aufarbeitung lagern zu können, ohne dass das Melatonin während dieser Zeit abgebaut oder zerstört wird. Für Bestimmungen von Melatonin in Pinealorganen oder in Serum-, Speichel- und Urinproben wird dies üblicherweise durch Tieffrieren bei -20°C bzw. -80°C erreicht. Angaben zur Stabilität von Melatonin in phototrophen Organismen während des Tieffrierens liegen nicht vor. Am Beispiel von *Porphyra* sollte die Stabilität von Melatonin beim Tieffrieren bei -80°C über einen Zeitraum von 2 Wochen verfolgt werden.

Hierzu wurden etwa 20 g Algenhalli in einen Mörser mit flüssigem Stickstoff gegeben und zu einem homogenen Pulver zerkleinert. Von diesem Pulver wurden jeweils vier Parallelproben direkt nach der Probennahme sowie nach 3, 7 und 14 Tagen mit der Ethermethode extrahiert und der Melatoningehalt mittels LC-ELISA bestimmt.

Zum Zeitpunkt dieser Messung wurde noch versucht, die HPLC-1 quantitativ einzusetzen. Das Ergebnis dieser Versuchsreihe demonstriert jedoch, dass bei den verwendeten Chromatographiebedingungen keine quantitativen Aussagen möglich sind, woraufhin das HPLC-1-System bei späteren Untersuchungen nur noch zu präparativen Zwecken eingesetzt wurde.

4.17 Tagesgang bei *Porphyra*

Neben einfachen Tag/Nacht-Vergleichen sollte *Porphyra* mit höherer zeitlicher Auflösung auf das Vorhandensein eines möglichen Tagesganges der Melatoninkonzentration untersucht werden. Da *Porphyra* im Eulithoral vorkommt, tidale Einflüsse jedoch möglichst minimiert werden sollten, wurde eine Woche vor der Probennahme eine ausreichende Menge Algenhalli in einem 100-Liter Rechtecktank in einem Gewächshaus bei natürlichem Lichtregime und 15°C im Durchfluss gehalten.

Es wurden über 24 Stunden in jeweils 3 Stundenintervallen je 5 Parallelproben genommen, 1 g in ein PE-Röhrchen eingewogen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Alle Proben wurden bis zur Aufarbeitung bei -80°C im Dunkeln gelagert (max. 2 Wochen). Die Extraktion erfolgte nach der Ethermethode mit anschließender Quantifizierung durch LC-ELISA.

Die Lichtverhältnisse am Probennahmetag wurden mit Hilfe eines Lichtsensors (LI-COR; Lincoln, USA; Modell: LI-190) gemessen und mit einem PC, ausgestattet mit der Software MedeaLAB (Medea AV, Erlangen; Version 1.0), registriert.

4.18 Kreuzreaktivität mit N-Acetyltryptamin

Der Hersteller des verwendeten ELISA-Kits macht Angaben zu Kreuzreaktivitäten der wichtigsten Trypophanmetabolite. Es fehlt allerdings eine Angabe zu einer möglichen Kreuzreaktivität mit N-Acetyltryptamin. Diese Substanz, die erst seit wenigen Jahren kommerziell verfügbar ist, könnte *in vivo* durch Aktivität der N-Acetyl-Transferase (NAT) aus Tryptamin gebildet werden. Tryptamin wurde als ein Produkt des Tryptophanstoffwechsels von *Hypericum perforatum* identifiziert [MURCH *et al.*, 2000] und auch in diversen Makroalgen wurden bei HPLC-Messungen Peaks beobachtet, die eine identische Retentionszeit aufweisen wie zugesetzter Tryptamin-Standard (eigene Beobachtungen).

Mit einer Standardlösung von N-Acetyltryptamin gelöst in Methanol (200 pg · µl⁻¹) wurde in Borsilikatglas-Röhrchen eine Eichreihe (0 bis 1250 pg · Probenröhrchen⁻¹) erstellt. Der Methanolanteil wurde in der Vakuumzentrifuge evaporiert und das Indolamin in 250 µl ELISA-Rekonstitutionspuffer aufgenommen. Im anschließenden ELISA wurden in Parallelbestimmungen zweimal 100 µl eingesetzt, die Immunoreaktivität der

Substanz gemessen und der IC₅₀-Wert (*inhibitory concentration* 50%) berechnet.

4.19 Chemikalien

Melatonin und alle anderen Tryptophanmetabolite wurden von Sigma (Deisenhofen, Deutschland) bezogen. Die verwendeten organischen Lösungsmittel für den HPLC-Eluenten und die Extraktionen stammen von der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland) und haben den Reinheitsgrad *pro analysi* oder *HPLC-grade*.

Für das Ansetzen von Lösungen und HPLC-Eluent wurde zu Anfang der Untersuchungen bidestilliertes Wasser verwendet, welches später durch Wasser eines Reinstwassersystems (SG Wasseraufbereitung und Regenerierstation GmbH, Barsbüttel; Modell Ultra Clear UV plus) ersetzt wurde. Es wurden keine Unterschiede zwischen beiden Qualitäten beobachtet.

Der Deutschlandvertrieb des ELISA-Kit des Herstellers Bühlmann Laboratories AG (Schweiz) erfolgt über DPC-Biermann (Bad Nauheim).

4.20 Statistische Auswertung

Für Eichmessungen und für die Bestimmungen der Wiederfindungsrate wurde durch lineare Regression eine Ausgleichsgerade bestimmt und angegeben. Der Korrelationskoeffizient beschreibt, wie gut das Modell mit den beobachteten Werten übereinstimmt.

Zur Analyse von Tag/Nacht-Vergleichen sowie des diurnalen Tagesgangs von *Porphyra* wurde mit Hilfe eines zweiseitigen, heteroskedastischen t-Tests untersucht, mit welcher Wahrscheinlichkeit die dargestellten Mittelwerte zweier miteinander verglichener Messpunkte unterschiedlichen Grundgesamtheiten entstammen.

Aufgrund des hohen präparativen Aufwands musste teilweise auf eine hohe Probenanzahl verzichtet werden.

Da sich in Vorversuchen zeigte, dass die chemische Variabilität der Zusammensetzung einzelner Proben der selben Art teilweise sehr groß ist, wurde zum Vergleich der Extraktionsmethoden sowie für parallele Bestimmungen des Melatoningehalts durch HPLC nach Vorsäulen-derivatisierung und ELISA in HPLC-aufgereinigten Extrakten mit Einzelproben gearbeitet. Zur Bewertung dieser Methodenvergleiche wurde mit Hilfe eines Wilcoxon-Tests für Paarvergleiche untersucht, ob die Differenzen der paarig angeordneten Messungen symmetrisch mit dem Median gleich Null verteilt sind (SACHS, 2002).

Unterschiede zwischen Stichproben mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $\leq 5\%$ ($p \leq 0,05$) wurden als statistisch signifikant betrachtet.

5 Ergebnisse

5.1 Messung von synthetischem Melatonin

Zunächst wurde die Messung von synthetischem Melatonin ohne Einfluss der organischen Matrix demonstriert. In Vorversuchen wurden die verschiedenen Methoden auf eine möglichst hohe Empfindlichkeit und Reproduzierbarkeit hin optimiert. Der parallele Einsatz sowie die Kombination der verschiedenen Methoden bot die Möglichkeit einer Validierung der Messergebnisse, was vor allem bei späteren Messungen von Extrakten phototropher Organismen wichtig war, um Unterbewertungen und falsch-positive Ergebnisse sicher zu erkennen.

5.1.1 Messung von Melatonin durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie mit Fluoreszenzdetektion (HPLC-1)

Abbildung 3-1 zeigt ein Beispiel-Chromatogramm für das verwendete HPLC-1-System mit Fluoreszenzdetektion bei einer Exzitationswellenlänge von 285 nm und einer Emissionswellenlänge von 360 nm.

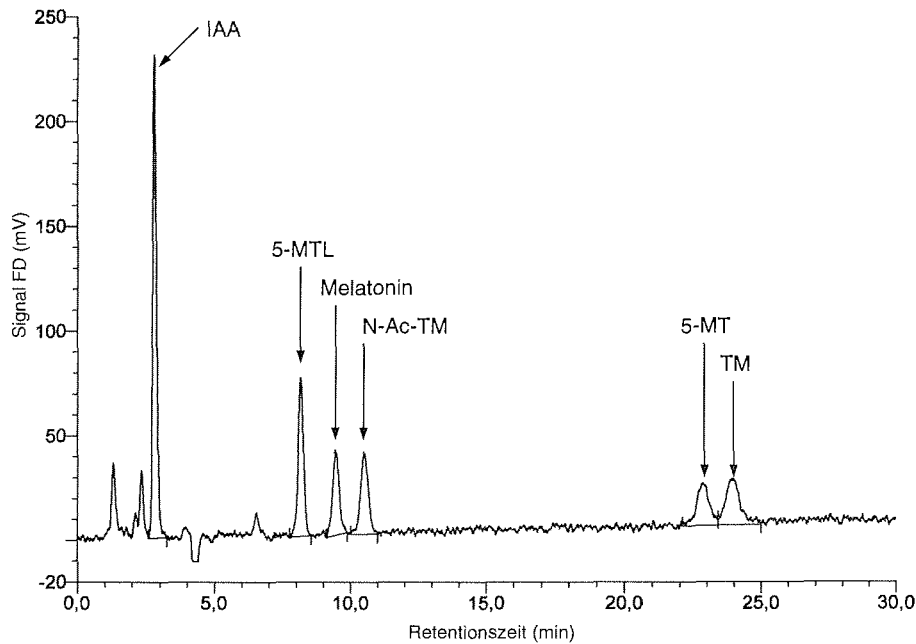


Abb. 3-1: Auftrennung verschiedener Tryptophanmetabolite in HPLC-1 mit fluorometrischer Detektion.

Es wurde ein Gemisch von Indoleessigsäure (IAA), 5-Methoxytryptophol (5-MTL), Melatonin, N-Acetyltryptamin (N-Ac-TM), 5-Methoxytryptamin (5-MT), Tryptamin (TM) (jeweils $10 \text{ pg} \cdot \text{Injektion}^{-1}$) aufgegeben. $\lambda_{\text{ex}} = 285 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 360 \text{ nm}$.

Das injizierte Gemisch mehrerer Tryptophanmetabolite wurde unter den verwendeten Chromatographiebedingungen sauber separiert. Das Melatonin wurde mit einer Retentionszeit von etwa 9,5 Minuten eluiert. Dies führte einerseits zu einer Erhöhung der Empfindlichkeit durch schmale, scharfe Peaks, machte es aber gleichzeitig schwieriger, eine vollständige Separation von anderen Matrixkomponenten zu erreichen. Trotz der geringen Menge der aufgegebenen Substanzen ($10 \text{ pg} \cdot \text{Injektion}^{-1}$) setzte sich das Signal deutlich vom unspezifischen Rauschen des Detektors ab. Die Sensitivität, berechnet nach PENISTON-BIRD *et al.* (1993), lag bei $1,5\text{-}2 \text{ pg} \cdot \text{Injektion}^{-1}$. Dies entspricht bei einem Volumen der Injektionsschleife von $100 \mu\text{l}$ einer Konzentration von $65\text{-}86 \text{ pM}$. Die Quantifizierung erfolgte über die Integration der Peakflächen mit Hilfe der Chromatographiesoftware (Gynkotek / Dionex; Chromeleon). Im Gegensatz zur Messung der Peakhöhe waren die Peakflächen relativ unabhängig vom Zustand der Trennsäule und es wurde über den gesamten Messzeitraum ein konstantes Verhältnis der Peakfläche in Relation zur injizierten Melatoninmenge beobachtet ($0,75\text{-}0,83 \text{ AU} \cdot \text{pg}^{-1}$ Melatonin). Wenn nach $100\text{-}200$ Injektionen beobachtet wurde, dass die Trennleistung der Hauptsäule abnahm, was sich durch flachere, breitere Peaks (teilweise mit Schultern) bemerkbar machte, konnte diese durch Spülen mit Eluent entgegen der vorgegebenen Flussrichtung meist wieder hergestellt werden.

Der Fluoreszenzdetektor (FD) zeichnete sich durch eine sehr stabile Basislinie sowie gut reproduzierbare Messungen bei gleichzeitig sehr geringem Wartungsaufwand aus.

Ein durch wiederholte Injektionen von Melatoninstandard erstelltes Fluoreszenzspektrum (Abb. 3-11) zeigte das für Melatonin typische Spektrum mit einem Exzitationsmaximum bei 280 nm mit einem Nebenmaximum bei 235 nm . Das Emissionsmaximum lag bei 350 nm .

Die Eichung für Konzentrationen zwischen 0 und $100 \text{ pg} \cdot \text{Injektion}^{-1}$ (Abb. 3-2) zeigte einen linearen Verlauf mit exzellenter Korrelation zwischen der injizierten Melatoninmenge und der gemessenen Peakfläche. Das Bestimmtheitsmaß r^2 für die dargestellte Eichkurve beträgt $0,999$.

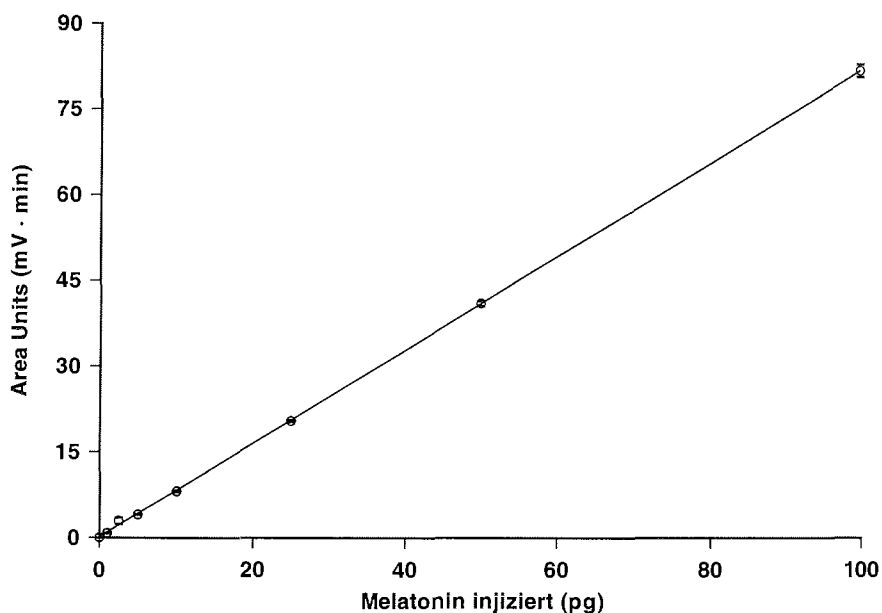


Abb. 3-2: Eichkurve für Melatonin in HPLC-1 durch Integration der Peakflächen.
 Offene Kreise: Mittelwert von vier Parallelbestimmungen. Vertikale Linien: Standardabweichung (die Werte sind meist so niedrig, so dass die Fehlerbalken im Datenpunkt verschwinden). $f(x) = 0,811x + 0,13$. Korrelationskoeffizient $r^2 = 0,999$. $\lambda_{ex} = 285 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 360 \text{ nm}$.

Die Retentionszeiten der Tryptophanmetabolite (Tab. 3-1) konnten durch die Methanolkonzentration, den pH-Wert und die Konzentration des Ionenpaarreagens des Eluenten beeinflusst werden.

Eine Erhöhung bzw. Verringerung der Methanolkonzentration bewirkte eine weitgehend unspezifische Stauchung bzw. Streckung des gesamten Laufes. Der pH-Wert wirkte sich hingegen vor allem auf Tryptophanmetabolite mit Carboxylgruppe, wie z.B. Indolessigsäure (Heteroauxin) und Methoxyindolessigsäure aus. Beispielsweise betrug die Retentionszeit von Indolessigsäure 1,6 Minuten bei pH 7 und konnte durch ein Absenken auf pH 2,5 auf etwa 10 Minuten gebracht werden. Das Melatonin hingegen wurde über diesen pH-Bereich weitgehend unverändert nach 9 bis 10 Minuten eluiert.

Tab. 3-1: Retentionszeiten verschiedener Tryptophanmetabolite in HPLC-1.

Substanz	Retentionszeit (Minuten)
N-Acetyl-5-Hydroxytryptamin	2,46
Methoxy-Indolessigsäure (MIAA)	2,76
Indol-3-Essigsäure (IAA)	2,80
5-Hydroxytryptophan (5-HT)	4,26
5-Methoxytryptophol (5-MTL)	8,19
N-Acetyl-5-Methoxytryptamin (Melatonin)	9,46
N-Acetyltryptamin (N-Ac-TM)	10,50
5-Methoxytryptamin (5-MT)	22,66
5-Methoxy-N,N-Dimethyltryptamin	23,17
Tryptamin (TM)	23,58

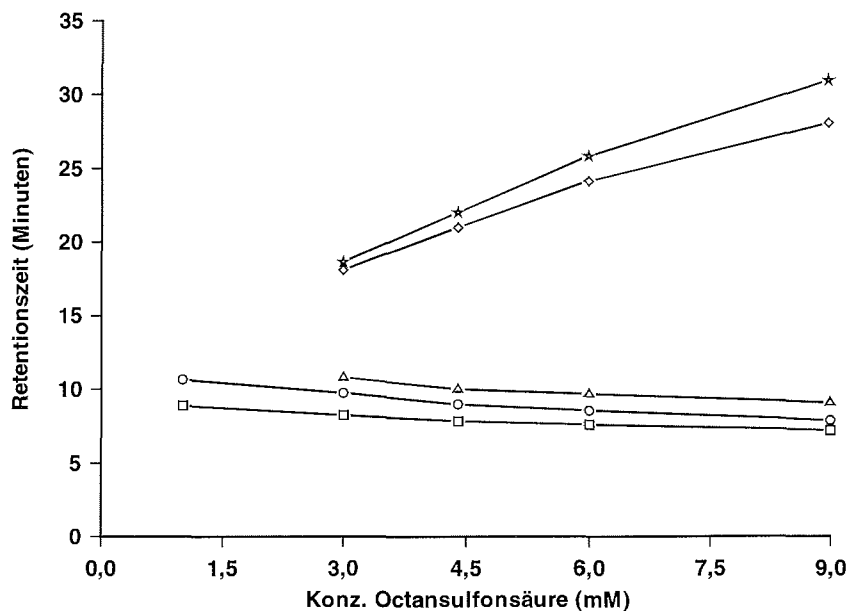


Abb. 3-3: Einfluss der Konzentration des Ionenpaarreagens (Octansulfonsäure) des Eluenten auf die Retentionszeiten verschiedener Tryptophanmetabolite in HPLC-1.

Nach Änderung der Eluentenzusammensetzung wurde gewartet, bis die Basislinie des Fluoreszenzdetektors stabil war. Dann wurde durch Injektion der verschiedenen Tryptophanmetabolite deren Retentionszeit bestimmt. Methanolgehalt: 18%. pH-Wert: 5,5. Quadrate: 5-Methoxytryptophol; Kreise: Melatonin; Dreiecke: N-Acetyltryptamin; Rauten: 5-Methoxytryptamin; Sterne: Tryptamin.

Der Einfluss der Konzentration des Ionenpaarreagens (Octansulfonsäure) auf die Retentionszeit einiger Indolamine ist in Abbildung 3-3 dargestellt. Mit zunehmender Octansulfonsäurekonzentration im Bereich zwischen 3,3 und 9 mM verkürzte sich die Retentionszeit von 5-Methoxytryptophol, Melatonin und N-Acetyltryptamin um durchschnittlich 1,55 Minuten. Dagegen bewirkte eine entsprechende Konzentrationsänderung bei 5-Methoxytryptamin und Tryptamin eine Erhöhung der Retentionszeit um 9,9 bzw. 12,3 Minuten.

5.1.2 Auffangen der Melatoninfraktion von HPLC-1-Läufen

Wurde Melatonin in das HPLC-1-System injiziert und die 1-Minuten-Fraktion, in der das Melatonin eluierte, manuell hinter dem Fluoreszenzdetektor aufgefangen und erneut in das HPLC-1-System injiziert, so entsprach die gemessene Peakfläche bei der zweiten Messung 1/10 der bei der ersten Injektion gemessenen Peakfläche (nicht dargestellt). Dies entspricht der Verdünnung von 100 μl Injektionsvolumen auf 1 ml einer 1-Minuten-Fraktion (Flussrate 1 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$). Es wurden somit keine Hinweise für eine Zerstörung des Melatonins auf dem Weg durch die HPLC-Anlage oder durch das energiereiche Licht des Fluoreszenzdetektors beobachtet. 1-Minuten-Fraktionen reichten bei einem Zeitfenster der aufgefangenen Fraktion beginnend 0,4 Minuten vor der Melatonin-Retentionszeit bis 0,6 Minuten danach aus, um Injektionen mit einem Melatoningehalt von bis zu 100 pg vollständig aufzufangen. Wurden Melatoninmengen von > 100 pg injiziert, so musste die Fraktion entsprechend der Verbreiterung des Melatonin-Peaks vergrößert werden.

5.1.3 Messung von Melatonin durch Enzym-gekoppelten Immunoassay

Der verwendete ELISA-Kit zeichnete sich durch eine sehr hohe Empfindlichkeit aus und erlaubte reproduzierbare Messungen im Bereich zwischen 0,1 und 2,7 $\text{pg} \cdot 100 \mu\text{l}^{-1}$. Dies entspricht einer Melatoninkonzentration zwischen 4,3 und 116,3 pM, wobei zur oberen und unteren Grenze des Messbereichs der relative Fehler systembedingt zunimmt. Durch definierte Verdünnung der Proben mit Rekonstitutionspuffer unmittelbar vor der Messung ließ sich der Messbereich nach oben noch erweitern, was jedoch zur Folge hatte, dass sich ebenfalls der methodenbedingte Fehler um den Verdünnungsfaktor vergrößerte. Das geringe Probenvolumen (100 $\mu\text{l} \cdot \text{Mikrotitergefäß}^{-1}$) bei gleichzeitig hoher Empfindlichkeit des Assays macht ihn besonders geeignet für Messungen, wenn nur wenig Probenmaterial zur Verfügung steht oder der Melatoningehalt der Proben sehr gering ist. Der Kurvenverlauf der Eichung lässt sich durch eine Funktion für asymmetrische, sigmoidale Kurvenverläufe ($f(x) = \min + (\max - \min) / (1 + (x / x_{50})^{-P})$) sehr gut beschreiben.

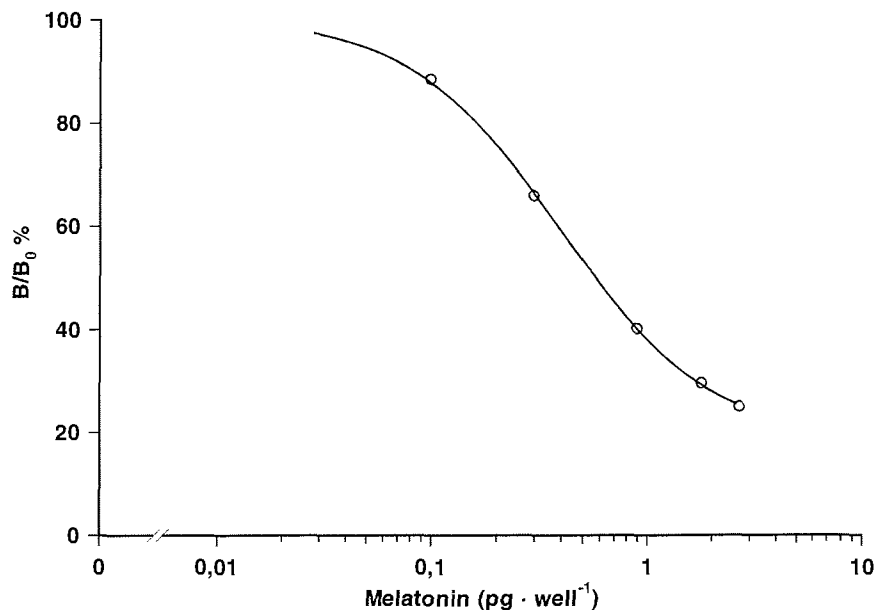


Abb. 3-4: Eichkurve für Melatonin im Enzym-gekoppelten Immunoassay (ELISA).

Offene Kreise: Mittelwert von 2 Parallelbestimmungen. Schwarze Linie: berechnete Ausgleichskurve nach der Formel: $f(x) = \min + (\max - \min) / (1 + (x / x_{50})^p)$.

Bei einer Messdauer von etwa 5 Stunden und einem Arbeitsaufwand von 2 Stunden pro Mikrotiterplatte mit 48 Doppelbestimmungen war ein hoher Probendurchsatz möglich.

Während der Durchführung der Messungen erwies sich das Melatonin als bemerkenswert stabil. Weder bei Lagerung der rekonstituierten Proben über 24 Stunden im Dunkeln bei 6°C, noch während der Messung selbst konnten Hinweise für eine Zerstörung des Melatonins beobachtet werden. Da zu den Messungen immer eine Eichkurve erstellt wurde, spielte die Interassayvariation keine große Rolle. Diese war jedoch relativ gering, was sich in geringen Schwankungen des IC₅₀-Wertes für Melatonin (34,9 (±5,6) pM; n = 12) widerspiegelt.

Die Messung erwies sich allerdings als anfällig für organische Lösungsmittel und diverse Salze, weswegen eine direkte Messung des Melatonins in HPLC-1-Fractionen nicht möglich war und während der Probenaufarbeitung auf eine vollständige Evaporation der verwendeten organischen Lösungsmittel geachtet werden musste.

Der ELISA-Kit wurde für die direkte Messung von Melatonin in menschlichen Speichelproben sowie für Serum-, Plasma- und Urinproben nach vorheriger Festphasenextraktion entwickelt. Voraussetzung für eine solche Anwendbarkeit ist eine hohe Spezifität des verwendeten Antikörpers gegenüber strukturverwandten Tryptophanmetaboliten.

Ergebnisse

Die Spezifität gegenüber zahlreichen für die Messung von Melatonin in Proben heterotropher Organismen wichtigen Indolaminen und strukturverwandten Substanzen wurde bereits vom Hersteller bestimmt (Tab. 3-2).

In eigenen Messungen wurde in zahlreichen Proben das Vorkommen von Tryptamin beobachtet. Dies kann durch Aktivität der N-Acetyltransferase, einem Enzym der Melatoninsynthese, zu N-Acetyltryptamin umgesetzt werden. Diese Substanz ist seit wenigen Jahren kommerziell verfügbar, so dass der ELISA auf eine mögliche Kreuzreaktivität mit N-Acetyltryptamin getestet werden konnte (Abb. 3-5). Der gemessene IC_{50} -Wert (*inhibitory concentration* 50%) für N-Acetyltryptamin betrug 8,3 nM. Bei dieser Konzentration betrug die relative Kreuzreaktivität 0,83%. Je geringer die eingesetzte Menge an N-Acetyltryptamin war, desto höher war die relative Kreuzreaktivität mit Werten von maximal etwa 2%.

Tab. 3-2: Spezifität des ELISA.

Angegeben ist die relative Kreuzreaktivität bei der IC_{50} . Der Wert für N-Acetyltryptamin wurde selbst ermittelt (*), während die übrigen Werte Herstellerangaben sind.

Substanz	Kreuzreaktivität (%)
Melatonin	100
6-Chloromelatonin	3,8
6-Hydroxymelatonin	0,12
6-Sulfatoxymelatonin	< 0,001
N-Acetylserotonin	0,05
5-Methoxytryptamin	0,007
Serotonin	< 0,001
5-Methyl-5-Hydroxytryptamin	< 0,001
5-Methoxytryptophan	< 0,001
5-Methoxytryptophol	< 0,001
5-Hydroxyindolessigsäure	< 0,001
5-Methoxypsoralen	< 0,001
Koffein	< 0,001
Kaffeensäure	< 0,001
N-Acetyltryptamin	0,83*

Die beobachtete Kreuzreaktivität war vermutlich nicht auf Verunreinigungen des N-Acetyltryptamins (beispielsweise mit Spuren von Melatonin) zurückzuführen, da auch nach einer vorherigen Aufreinigung durch präparative HPLC Kreuzreaktivitäten in gleicher Höhe beobachtet wurden (nicht dargestellt).

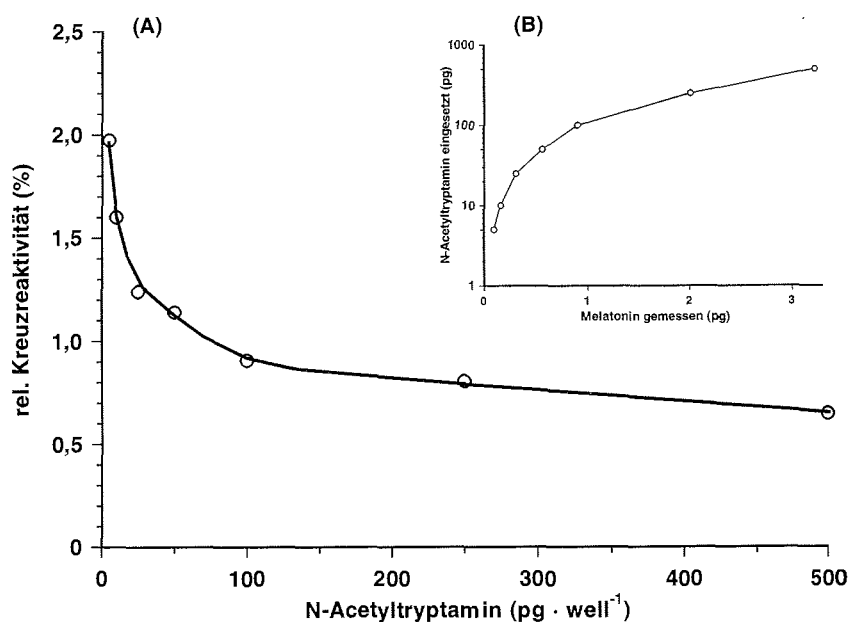


Abb. 3-5: Kreuzreaktivität von N-Acetyltryptamin im ELISA.

Dargestellt ist die relative Kreuzreaktivität in Abhängigkeit von der eingesetzten Menge N-Acetyltryptamin (A) sowie das Verhältnis zwischen eingesetzter N-Acetyltryptaminmenge und apparer Melatoninmenge (B). Kreise: Mittelwert von 2 Parallelbestimmungen.

Melatonin, welches zunächst in das HPLC-1-System injiziert wurde, konnte mit der unter 2.4 beschriebenen Methode mit Chloroform aus dem Eluent extrahiert werden. Nach Evaporation des Lösungsmittels und anschließendem Aufnehmen in ELISA-Rekonstitutionspuffer konnte der Melatoningehalt der Fraktion mit dem ELISA quantifiziert werden. Durch selektives Auffangen und Extrahieren der HPLC-Fraktion, in der das Melatonin eluiert wurde, konnte das beschriebene HPLC-System nicht nur zur Quantifizierung eingesetzt werden, sondern es wurde so auch der Einsatz als präparatives System zur Aufreinigung der Extrakte ermöglicht.

Eine auf diese Weise erstellte Eichung für Melatoninmengen zwischen 0 und 10 pg zeigte einen linearen Verlauf, wobei durchschnittlich 95,5% des eingesetzten Melatonins durch Quantifizierung im ELISA wiedergefunden wurden (Abb. 3-6). Das Bestimmtheitsmaß r^2 für die dargestellte Eichung beträgt 0,999. Auf diese Weise konnten Melatoninmengen unterhalb der Quantifizierungsgrenze der HPLC-1 im ELISA noch sicher bestimmt werden. Die theoretische Nachweisgrenze für diese Kombination lag bei einem Injektionsvolumen von 100 μ l bei 0,29 pg · Injektion⁻¹.

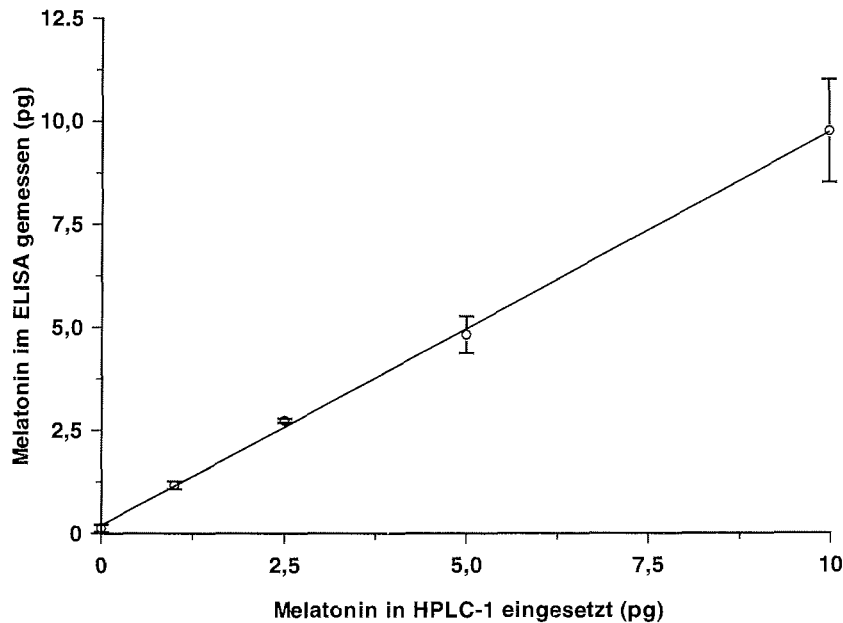


Abb. 3-6: Eichkurve für die Kombination HPLC-1 und ELISA (LC-ELISA).

Unterschiedliche Melatoninmengen wurden in das HPLC-1-System eingesetzt, 1-Minuten-Fractionen, in denen das Melatonin eluierte, wurden aufgefangen, mit Chloroform extrahiert und der Melatoningehalt mittels ELISA bestimmt. Kreise: Mittelwert von 3 Parallelbestimmungen. Vertikale Linien: Standardabweichung. Funktion der Regressionsgeraden: $f(x) = 0,955x + 0,177$. Bestimmtheitsmaß: $r^2 = 0,999$.

Durch Verdünnung der Proben zur Erweiterung des Messbereichs nimmt der Messfehler um den entsprechenden Verdünnungsfaktor ebenfalls zu. Dies spiegelt sich in dem Wert für $10 \text{ pg} \cdot \text{Injektion}^{-1}$ wider. Die entsprechenden Proben wurden vor dem Einsatz 1:2 mit ELISA-Rekonstitutionspuffer verdünnt.

Eine Zerstörung des Melatonins auf dem Weg durch das HPLC-System, etwa durch das UV-Licht des Fluoreszenzdetektors, wurde nicht beobachtet.

5.1.4 Quantifizierung von Melatonin nach Vorsäulenderivatisierung

Die von INUMA *et al.* (1999) beschriebene Methode zur Derivatisierung von Melatonin im alkalischen Milieu bei $90 - 100^\circ\text{C}$ in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid und anschließender Messung des Produktes durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie mit Fluoreszenzdetektion konnte nach geringen Modifikationen zur Quantifizierung von Melatonin eingesetzt werden. Während bei einer Flussrate von $1 \text{ ml} \cdot \text{Minute}^{-1}$ starke Druckschwankungen des Systems beobachtet wurden und somit auch die Retentionszeiten für das Melatoninderivat erheblich variierten, konnte durch eine Erhöhung der Flussrate auf $1,5 \text{ ml} \cdot \text{Minute}^{-1}$ eine Stabilisierung erzielt werden ($107 \pm 2 \text{ bar}$). Eine Reduzierung des Acetonitril-Anteils des Eluenten von 12 auf 9% (v/v) ermöglichte es, den Melatoninderivat-Peak von einem unspezifischen Peak mit ähnlicher Retentionszeit zu separieren. Bei diesen Chromatographie-

bedingungen wurde das Melatoninderivat mit einer Retentionszeit von 10,7 bis 10,9 Minuten eluiert und die Gesamtdauer pro HPLC-Lauf betrug 12 Minuten (Abb. 3-7). Der Peak, der einer Menge von 4,2 pg derivatisiertem Melatonin entspricht, setzt sich deutlich vom Rauschen der stabilen Basislinie ab.

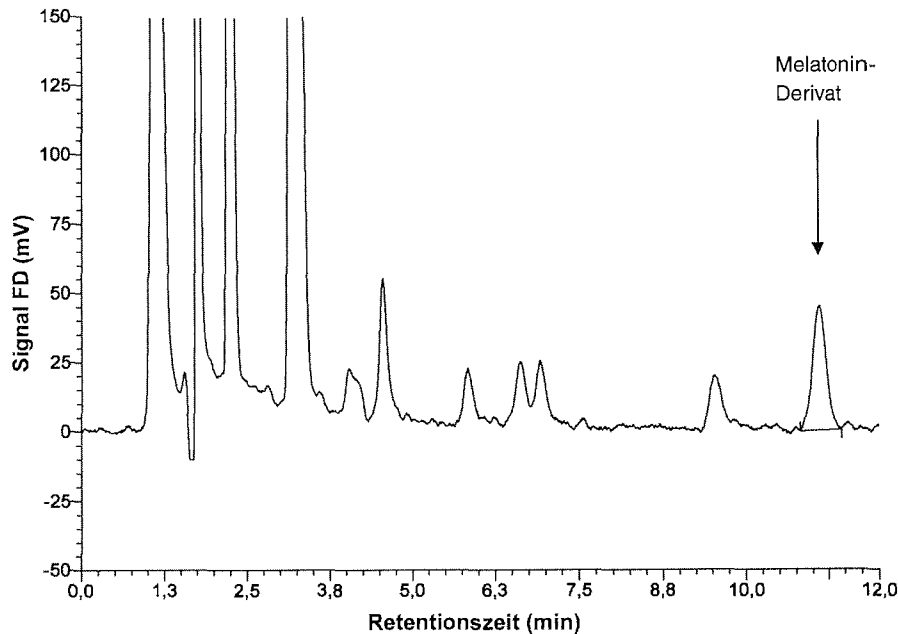


Abb. 3-7: Beispielchromatogramm für HPLC-2 mit derivatisiertem Melatoninstandard.

10 pg Melatonin wurden in das HPLC-1-System injiziert, die Melatoninfraktion aufgefangen, extrahiert und derivatisiert. Von der Probe wurden 100 μ l in das HPLC-2-System injiziert. $\lambda_{\text{ex}} = 245 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 380 \text{ nm}$.

Die Vollständigkeit der Derivatisierung des Melatonins schien jedoch von mehreren Faktoren abhängig zu sein. Aus HPLC-1-Fractionen extrahiertes Melatonin wurde mit höherer Rate zu dem Derivat umgesetzt als Melatonin, welches zunächst in Methanol gelöst war und nach dessen Eindampfen in Wasser aufgenommen wurde. Wurde in Methanol gelöster Melatoninstandard in der Vakuumzentrifuge eingedampft, in Aqua bidest. aufgenommen, derivatisiert und anschließend gemessen, war die beobachtete Menge des Melatoninderivates (gemessen an der Peakfläche) um den Faktor 2-2,5 geringer, als bei einer Injektion der gleichen Menge Melatonin in das HPLC-1-System, Auffangen der Melatoninfraktion, Extraktion, Derivatisierung und Quantifizierung (Abb. 3-8). Aus diesem Grund wurden Eichungen erst nach einer vorherigen Injektion in HPLC-1 mit Extraktion der Melatoninfraktion erstellt, da dies auch dem späteren Weg für die Quantifizierung von Melatonin in Extrakten phototropher Organismen entspricht (vgl. 3.2.3).

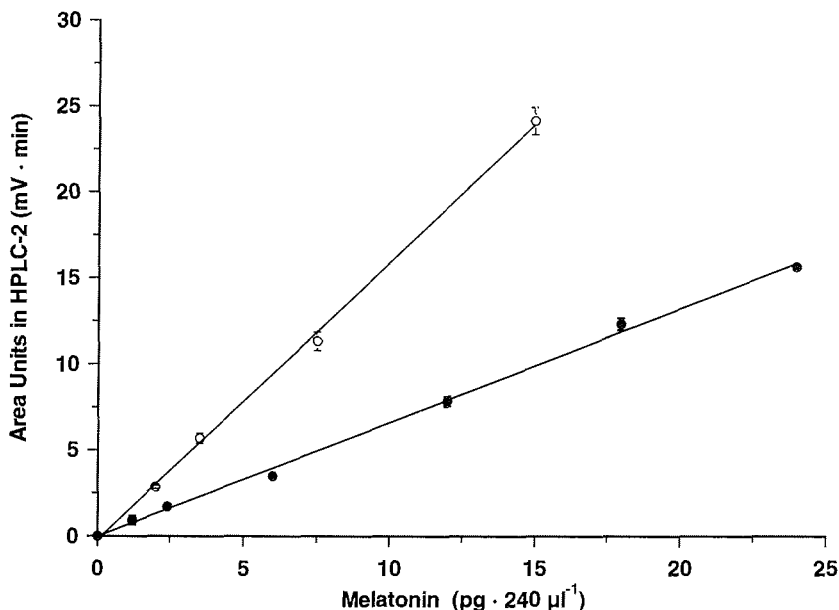


Abb. 3-8: Eichung mit derivatisiertem Melatoninstandard in HPLC-2

Offene Kreise: Eichung für Melatonin, welches zunächst in HPLC-1 injiziert wurde. Geschlossene Kreise: Methanolischer Standard wurde direkt evaporiert und derivatisiert. Jeweils Mittelwert von 3 Parallelbestimmungen. Vertikale Linien: Standardabweichung. Abszisse: Melatoninmenge, die in 200 µl Wasser aufgenommen und nach Zugabe von 20 µl Na₂CO₃ (1 M) und 20 µl H₂O₂ (50 µM) 30 Minuten bei 92°C umgesetzt wurde.

Die dargestellten Eichungen für das derivatisierte Melatonin zeigten in beiden Fällen einen linearen Verlauf. Die indirekte Eichung nach Extraktion der HPLC-1-Fraktion läßt sich durch die Funktion $f(x) = 1,61x - 0,20$ ($r^2 = 0,999$) beschreiben. Die direkte Eichung wird durch die Funktion $f(x) = 0,66x - 0,01$ ($r^2 = 0,998$) repräsentiert.

Die von INUMA *et al.* (1999) beschriebene Nachweisgrenze von 0,5 bis 1 Femtomol (0,12 – 0,23 pg) · Injektion⁻¹ konnte allerdings trotz des hochempfindlichen Fluoreszenzdetektors nicht erreicht werden.

Die Sensitivität für das beschriebene System aus HPLC-1, Extraktion der Melatoninfraktion, Derivatisierung und Messung in HPLC-2 lag bei 1-1,5 pg · Injektion⁻¹ in das HPLC-1-System und war somit geringfügig empfindlicher, als die direkte Quantifizierung in HPLC-1. Durch wiederholte Injektion in das HPLC-1-System und Zusammenführen der Chloroformextrakte vor der Derivatisierung konnte die Nachweisgrenze für Melatonin jedoch noch herabgesetzt werden.

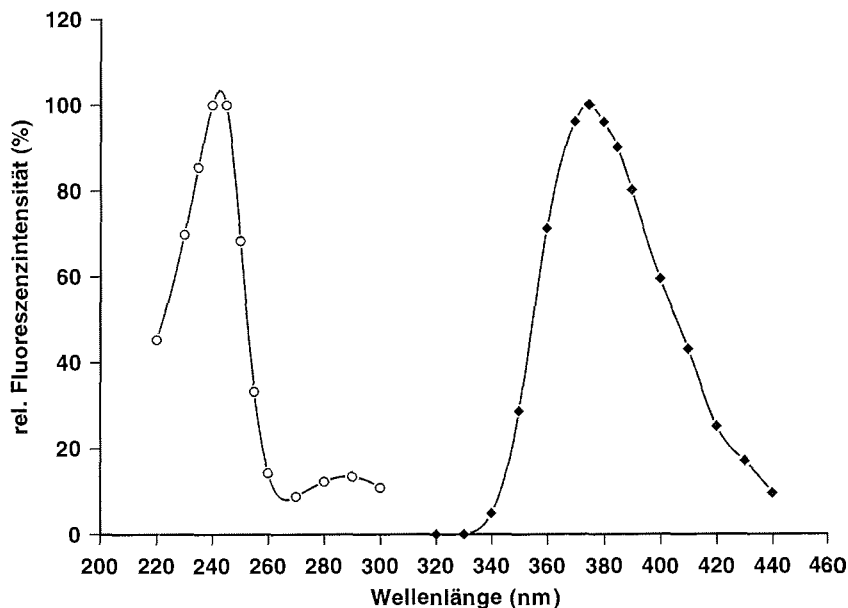


Abb. 3-9: Fluoreszenzspektrum des Melatoninderivats.

Offene Kreise: Exzitationsspektrum, gemessen bei $\lambda_{em} = 384$ nm. Schwarze Rauten: Emissionsspektrum, gemessen bei $\lambda_{ex} = 247$ nm. Die bei 245/380 nm gemessenen Fluoreszenzintensitäten wurden gleich 100% gesetzt.

Um sicherzustellen, dass das richtige Produkt im HPLC-2-System gemessen wurde, wurde ein Fluoreszenzspektrum durch wiederholte Injektion einer Probe mit derivatisiertem Melatonin gleicher Konzentration bei variierenden Exzitations- und Emissionswellenlängen erstellt (Abb. 3-9). Das Fluoreszenzspektrum zeigte einen fast identischen Verlauf wie das von IINUMA *et al.* (1999) aufgezeichnete Spektrum, jedoch waren die Exzitations- und Emissionsmaxima geringfügig zum kürzerwelligen Bereich verschoben. Während bei IINUMA *et al.* die Exzitations- und Emissionsmaxima bei 247 nm bzw. 384 nm liegen, wurden hier Maxima bei 243 nm und 380 nm gemessen. Aufgrund des weitgehend identischen Fluoreszenzspektrums wird davon ausgegangen, dass das gleiche Derivatisierungsprodukt für die Quantifizierung des Melatonins gemessen wurde, welches kürzlich von TOMITA *et al.* (2003) durch Röntgenstrukturanalyse als N-[(6-Methoxy-4-oxo-1,4-dihydroquinolin-3-yl)methyl]acetamid identifiziert wurde.

5.2 Messung von Melatonin in Extrakten von Makroalgen

5.2.1 Direkte Messung von Melatonin in Algenextrakten durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie mit Fluoreszenzdetektion

In zahlreichen Vorversuchen wurde versucht, Melatonin mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie zu quantifizieren. Aufgrund der chemischen Komplexität der Extrakte und der geringen auftretenden Melatonin-

konzentrationen ist es nicht gelungen, eine für zahlreiche Makroalgen anwendbare Methode zu entwickeln, bei der der potentielle Melatonin-Peak von benachbarten Peaks vollständig abgetrennt und das Signal ausreichend stark für eine sichere Quantifizierung war. Durch Variation der Chromatographiebedingungen sowie durch Verwendung verschiedener Extraktionsmethoden und Änderungen des HPLC-Systems wurde versucht, eine Freistellung des Melatonin-Peaks zu erreichen.

Die HPLC-FD-Chromatogramme zeigten sowohl zwischen verschiedenen Arten als auch bei verschiedenen Individuen der gleichen Art zum Teil große Unterschiede, so dass eine generelle Freistellung eines potentiellen Melatonin-Peaks nicht erreicht wurde (Abb. 3-10). Auch brachte die Verwendung einer anderen Hauptsäule (TosoHaas; TSKgel ODS-80TS), welche in den Auftrennungseigenschaften der von POEGGELER (1992) verwendeten Säule ähnelt, keinen Erfolg. Durch die spätere Elution des Melatonins (Retentionszeit = 35 Minuten) verbreiterte sich der Peak und die Empfindlichkeit des Systems wurde reduziert. Ebenso wurden Substanzen mit einer Retentionszeit nahe dem Melatonin durch die Verwendung einer anderen Hauptsäule nicht vom Melatonin abgetrennt, sondern vielmehr mit Melatonin zusammen verschoben, so dass durch die Verwendung dieser Säule keine Verbesserung der Auftrennung beobachtet werden konnte.

Der Fluoreszenzdetektor misst selektiv Substanzen, die bei der verwendeten Exzitations- und Emissionswellenlänge (285/360 nm) fluoreszieren und zeichnet sich durch eine sehr hohe Empfindlichkeit und gute Reproduzierbarkeit der Messungen aus. Andererseits sind Messungen mit Fluoreszenzdetektion anfällig gegenüber einem *quenching* durch Substanzen, welche mit ähnlicher Retentionszeit wie das Melatonin eluieren und Licht im Bereich der Exzitations- oder Emissionswellenlänge absorbieren.

Neben der Fluoreszenzdetektion wurde auch der Einsatz eines elektrochemischen Detektors (Oxidationspotential: 900 mV; Empfindlichkeit: 2 nA) erprobt. Die Empfindlichkeit für die Messung von Melatonin war jedoch um den Faktor 5 geringer als bei Verwendung des Fluoreszenzdetektors und aufgrund der geringeren Selektivität war das Hintergrundsignal in allen Proben erheblich höher, so dass auf weitergehende Versuche verzichtet wurde.

Im Vergleich zu den anderen Extraktionsmethoden (Aceton; Perchlorsäure) lieferte die Extraktion des Algenmaterials mit Natriumcarbonatlösung in Kombination mit Ether (DUBBELS *et al.*, 1995) die wenigsten Hintergrundsignale und es konnte in späteren Versuchen gezeigt werden, dass das in den Algen enthaltene Melatonin mit vergleichbarer Effizienz extrahiert wurde, wie unter Verwendung der anderen Methoden (vgl. 3.4). Aus diesem Grund wurden alle Extrakte für die Bewertung der unterschiedlichen Quantifizierungsmethoden durch Etherextraktion gewonnen.

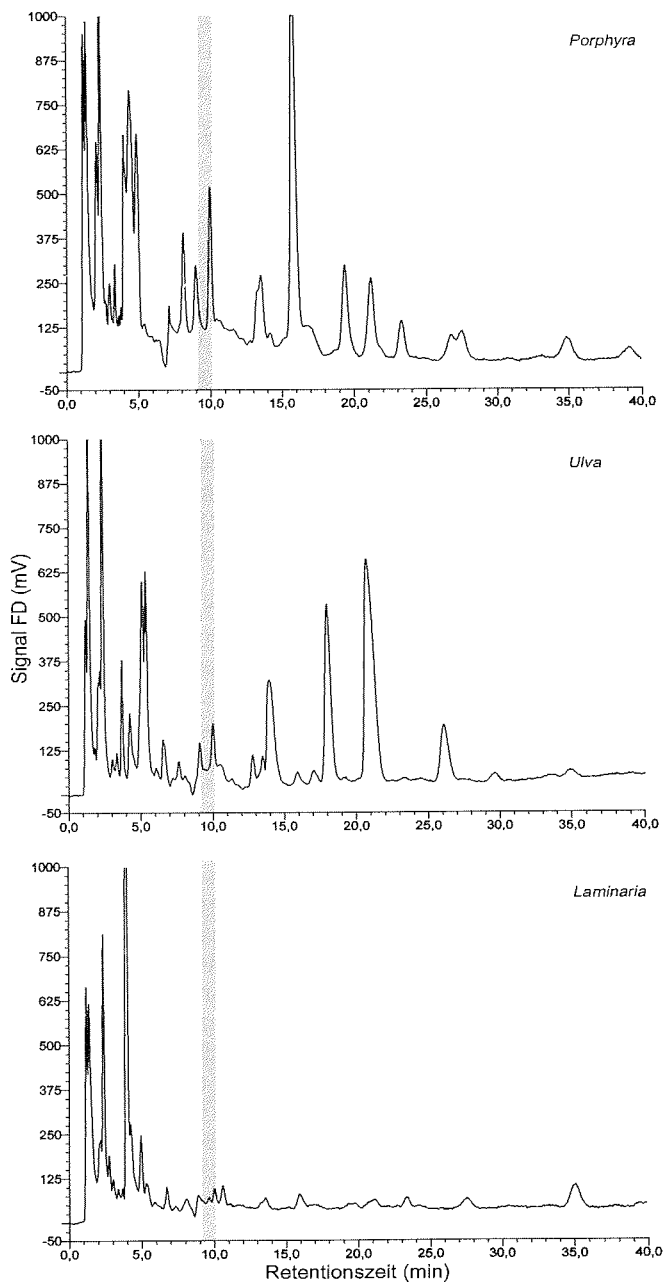


Abb. 3-10: Beispielchromatogramme für HPLC-1 Messungen von Etherextrakten verschiedener Makroalgen.

Die injizierte Menge entspricht dem Extrakt von 100 mg Algen. Grau hinterlegter Bereich: Melatoninfraktion, die zur späteren Quantifizierung durch ELISA oder HPLC nach Vorsäulenderivatisierung aufgefangen und anschließend mit Chloroform extrahiert wurde. $\lambda_{ex} = 285 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 360 \text{ nm}$.

Ergebnisse

In keinem der in Abbildung 3-10 dargestellten HPLC-FD-Chromatogramme für Etherextrakte von *Porphyra*, *Ulva* und *Laminaria* war zur Retentionszeit von Melatonin (9,45 Minuten) ein Peak zu erkennen. In den Beispielen für *Porphyra* und *Ulva* wäre ein solcher Melatonin-Peak von zwei benachbarten Peaks unbekannter Substanzen flankiert gewesen, wodurch eine sichere Quantifizierung zusätzlich erschwert worden wäre. Zu Beginn der Extraktion zugesetztes Melatonin wurde jedoch ab einer Menge von 25-50 $\text{pg} \cdot \text{g}^{-1}$ Frischgewicht bei HPLC-Messungen mit einer Rate von etwa 70% wiedergefunden (nicht dargestellt). Auch wurden in zahlreichen Extrakten Peaks mit einer dem Melatonin identischen Retentionszeit beobachtet, jedoch war es nicht direkt möglich, Aussagen darüber zu treffen, ob es sich tatsächlich um Melatonin handelte oder nur um eine Substanz, die mit der gleichen Retentionszeit eluierte und bei den verwendeten Wellenlängen ebenfalls fluoreszierte. Für einen potentiellen Melatonin-Peak in einem Extrakt von *Porphyra* wurde durch wiederholte Injektion in das HPLC-System bei unterschiedlichen Exzitations- und Emissionswellenlängen ein Fluoreszenzspektrum erstellt (Abb. 3-11). Insbesondere das Exzitationsspektrum wies einen ähnlichen Verlauf wie das Exzitationsspektrum für Melatoninstandard (gestrichelte Linie) auf.

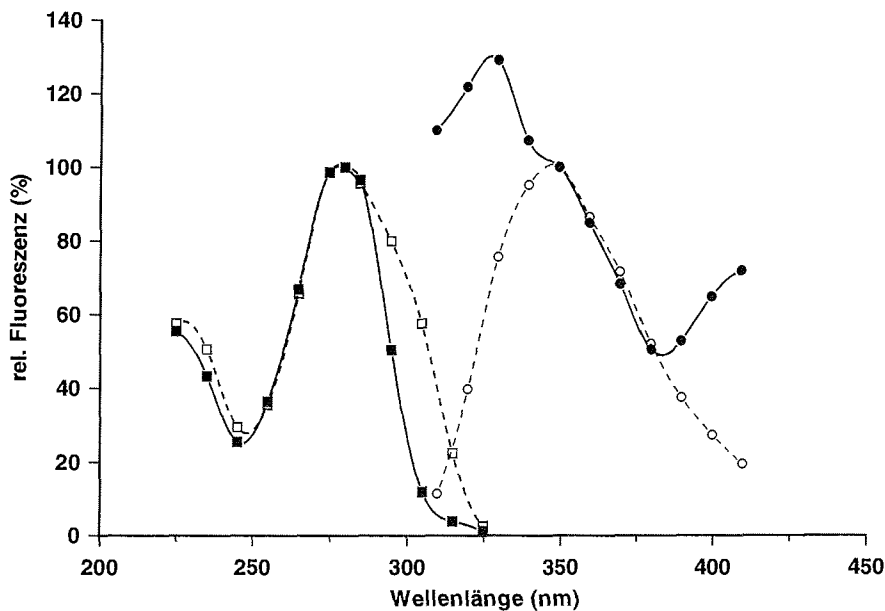


Abb. 3-11: Fluoreszenzspektrum eines potentiellen Melatonin-Peaks in einem Extrakt von *Porphyra* im Vergleich mit Melatoninstandard.

Gestrichelte Linien: Melatoninstandard. Durchgezogene Linien: Substanz in *Porphyra*-Extrakt mit Melatonin-Retentionszeit. Quadrate: Exzitationsspektrum, gemessen bei $\lambda_{em} = 360$ nm. Kreise: Emissionsspektrum, gemessen bei $\lambda_{ex} = 285$ nm. Die bei 285/360 nm gemessenen Fluoreszenzintensitäten wurden gleich 100% gesetzt.

Das Emissionsspektrum für den *Porphyra*-Extrakt unterschied sich jedoch deutlich vom Emissionsspektrum des Melatoninstandards. Das Maximum lag bei 330 nm statt 360 nm und im Bereich ≥ 400 nm nahm die Fluoreszenz entgegen dem Kurvenverlauf des Standards wieder zu. Dies zeigte deutlich, dass es sich entweder um eine andere Substanz handelte oder das Melatonin mit einer oder mehreren Substanzen verunreinigt war, so dass eine sichere Identifizierung und Quantifizierung in diesem Beispiel nicht möglich war.

Es wurde versucht, durch Chromatographie eines *Porphyra*-Extraktes bei unterschiedlichen Octansulfonsäure-Konzentrationen (4,4 und 9,0 mM) die Veränderung der Retentionszeit eines potentiellen Melatonin-Peaks sowie von Melatoninstandard zu verfolgen. Ein Peak, der bei einer OSA-Konzentration von 4,4 mM mit identischer Retentionszeit wie Melatoninstandard eluierte, konnte bei einer OSA-Konzentration von 9,0 mM nicht mehr bei einer dem Melatoninstandard entsprechenden Retentionszeit beobachtet werden (nicht dargestellt). Auch dieses Beispiel zeigt, dass eine Coelution von Melatonin mit anderen Substanzen nicht sicher ausgeschlossen werden konnte.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass trotz der hohen Sensitivität und Reproduzierbarkeit des HPLC-1-Systems mit Fluoreszenzdetektion zur Messung von Melatonin in matrixfreien Systemen eine allgemeine Methode zur direkten Messung des Melatoningehalts in Extrakten von Makroalgen nicht entwickelt werden konnte.

5.2.2 Messung von Melatonin in Algenextrakten durch Enzym-gekoppelten Immunoassay nach präparativer HPLC (LC-ELISA)

Zur Aufreinigung der Proben durch präparative HPLC wurden die Extrakte in das HPLC-1-System aufgegeben und die Melatoninfraktion hinter dem Fluoreszenzdetektor manuell aufgefangen. Die 1-Minuten-Fractionen, in denen das Melatonin eluierte und die für die immunologische Messung von Melatonin aufgefangen und extrahiert wurden, sind in den Beispielchromatogrammen in Abbildung 3-10 grau hinterlegt. Hierbei wird der hohe Grad der Aufreinigung deutlich, wodurch zahlreiche Substanzen, die durch Kreuzreaktivitäten mit dem Antikörper des ELISA zu falsch-positiven Ergebnissen führen könnten, abgetrennt wurden. Nach Extraktion der aufgefangenen Fraktion mit Chloroform wurde das organische Lösungsmittel in der Vakuumzentrifuge eingedampft und das darin enthaltene Melatonin mit ELISA-Puffer rekonstituiert. In fast allen untersuchten Proben konnte auf diese Weise eine innerhalb des Messbereichs des ELISA liegende Melatonin-Immunoreaktivität beobachtet werden. Die gemessenen Melatoninmengen pro Fraktion lagen meist im Bereich zwischen $0,3$ und $5 \text{ pg} \cdot \text{Fraktion}^{-1}$. Dies entspräche einem Melatoningehalt zwischen 3 und $50 \text{ pg} \cdot \text{g}^{-1}$ Frischgewicht.

Melatonin zwischen 25 und $250 \text{ pg} \cdot \text{g}^{-1}$ Frischgewicht, welches zu Beginn der Extraktion zugesetzt wurde, wurde mit hoher Rate in der Melatonin-HPLC-Fraktion immunologisch wiedergefunden (Abb. 3-12). Auf diese Weise erstellte Eichungen auf die komplexe biologische Matrix der Algenextrakte zeigten einen linearen Verlauf mit Korrelationskoeffizienten für die berechneten Ausgleichsgeraden zwischen $0,997$ und $0,999$ (r^2).

Ergebnisse

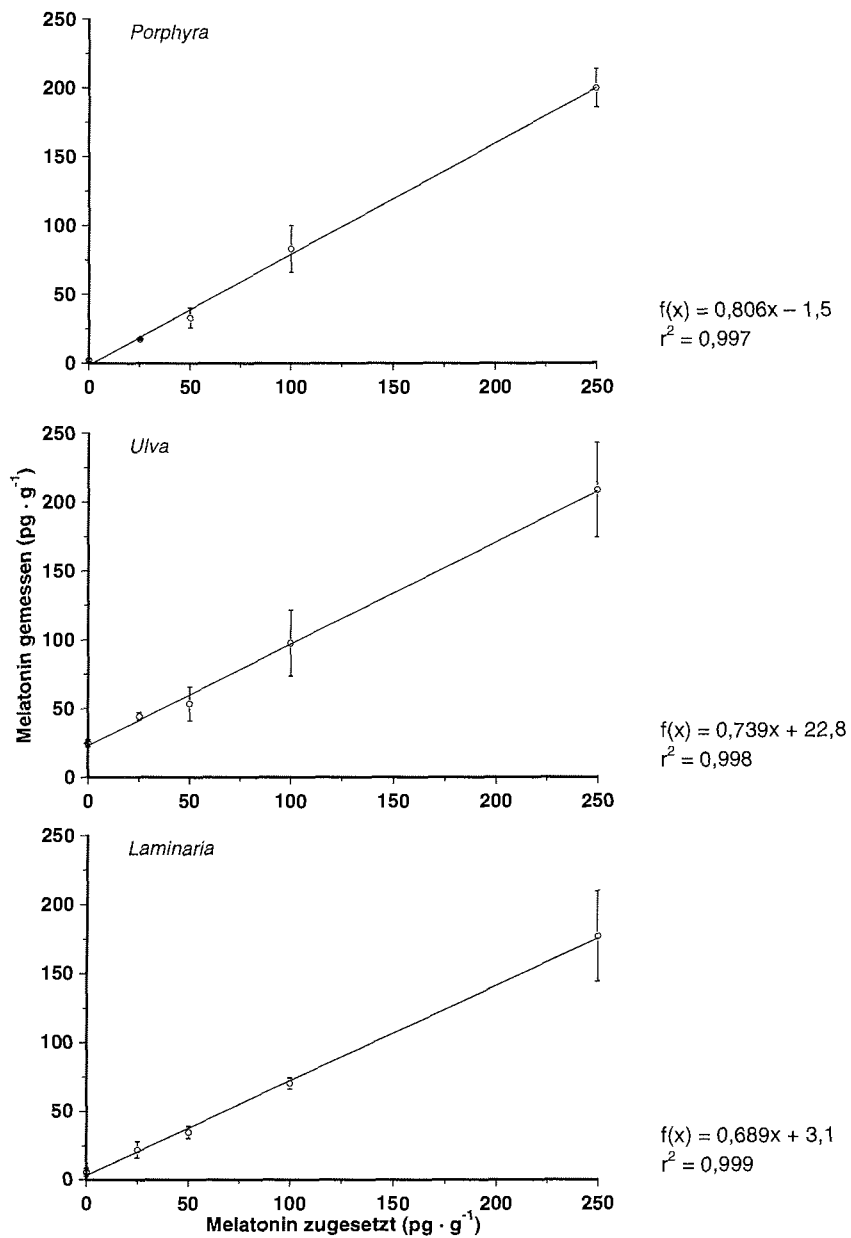


Abb. 3-12: Eichungen für zu Beginn der Extraktion zugesetztes Melatonin bei *Porphyra*, *Ulva* und *Laminaria*.

Die Proben wurden mit Natriumcarbonatlösung und Ether extrahiert und der Melatoningehalt der Extrakte mittels LC-ELISA bestimmt. Kreise: Mittelwert von 3 Parallelbestimmungen. Vertikale Linien: Standardabweichung. Neben den Diagrammen sind die zugehörigen Funktionen der Regressionsgeraden und der Korrelationskoeffizient angegeben.

Die Wiederfindungsraten für zugesetztes Melatonin betragen für die Arten *Porphyra*, *Ulva* und *Laminaria* entsprechend 80,6%, 73,9% und 68,9%. Dies entspricht in etwa der zuvor beschriebenen Wiederfindungsrate für zugesetztes Melatonin bei direkter Messung in der HPLC-1. Für die Messung von Konzentrationen $>50 \text{ pg} \cdot \text{g}^{-1}$ Frischgewicht musste die Probe vor der Messung im ELISA mit Rekonstitutionspuffer verdünnt werden, um innerhalb des Messbereichs des verwendeten ELISA zu bleiben. Hierbei erhöhte sich auch der Messfehler um den entsprechenden Verdünnungsfaktor, was sich in den relativ großen Fehlerwerten für die Werte von 100 und 250 $\text{pg} \cdot \text{g}^{-1}$ zugesetztes Melatonin $\cdot \text{g}^{-1}$ Frischgewicht widerspiegelt.

Der Ordinatenabschnitt, bzw. der Wert für die Probe ohne zugesetztes Melatonin, gibt den gemessenen Melatoningehalt ohne Einbeziehung der Wiederfindungsrate an.

Die *Porphyra*- und *Laminaria*-Proben enthielten in den dargestellten Beispielen somit nur sehr geringe Melatoninmengen unter $4 \text{ pg} \cdot \text{g}^{-1}$. Dahingegen zeigte die Probe von *Ulva* eine deutliche Melatonin-Immunoreaktivität, welches einem Gehalt von etwa $22,8 \text{ pg} \cdot \text{g}^{-1}$ entspräche ($30,9 \text{ pg} \cdot \text{g}^{-1}$ unter Einbeziehung der Wiederfindungsrate von 73,4%).

In einer weiteren Versuchsreihe wurden zusätzlich zur Messung der Immunoreaktivität in der Melatoninfraktion auch Fraktionen vor und hinter der Melatoninfraktion in den ELISA eingesetzt, um auf eine mögliche Immunoreaktivität zu testen. Hierzu wurden zusätzlich zwei 1-Minuten-Fraktionen vor sowie nach der Melatoninfraktion aufgefangen und der Melatoningehalt auf die zuvor beschriebene Weise quantifiziert. Diese Messungen wurden an Extrakten von *Porphyra*, *Ulva* und *Laminaria* vorgenommen, wovon jeweils drei voneinander unabhängige Proben dargestellt sind (Abb. 3-13). In allen Proben der drei untersuchten Arten wurde jeweils in der Melatoninfraktion die höchste Immunoreaktivität gemessen. In den Fraktionen davor und danach war die gemessene Melatoninkonzentration meist unterhalb der Quantifizierungsgrenze des ELISA ($0,28 \text{ pg} \cdot \text{Fraktion}^{-1}$). Die Werte wurden für eine bessere Vergleichbarkeit durch Extrapolation bestimmt. Die großen Unterschiede der Melatonin-Immunoreaktivität der einzelnen Proben in der Melatoninfraktion spiegeln den stark schwankenden Melatoningehalt der individuellen Proben wider.

Auch wenn Melatonin zu Beginn der Extraktion zugegeben wurde, führte dies ausschließlich zu einer Zunahme der Immunoreaktivität in der Melatoninfraktion, nicht aber in den Fraktionen vor oder hinter dem Melatonin-Peak (nicht dargestellt).

In Proben, die mit Perchlorsäure oder Aceton extrahiert wurden, wurde die höchste Immunoreaktivität ebenfalls in der Melatoninfraktion gemessen (nicht dargestellt).

Die Fähigkeit, den Melatoningehalt in einzelnen HPLC-Fraktionen immunologisch zu quantifizieren, bietet auch neue Möglichkeiten zur Überprüfung der Identität potentieller Melatonin-Peaks. Es zeigte sich jedoch, dass große Peaks, die mit einer identischen Retentionszeit wie Melatoninstandard eluierten, nur selten mit einer entsprechend hohen Melatonin-Immunoreaktivität korrelierten. Dieses Phänomen zeigte sich bei allen untersuchten Arten.

Ergebnisse

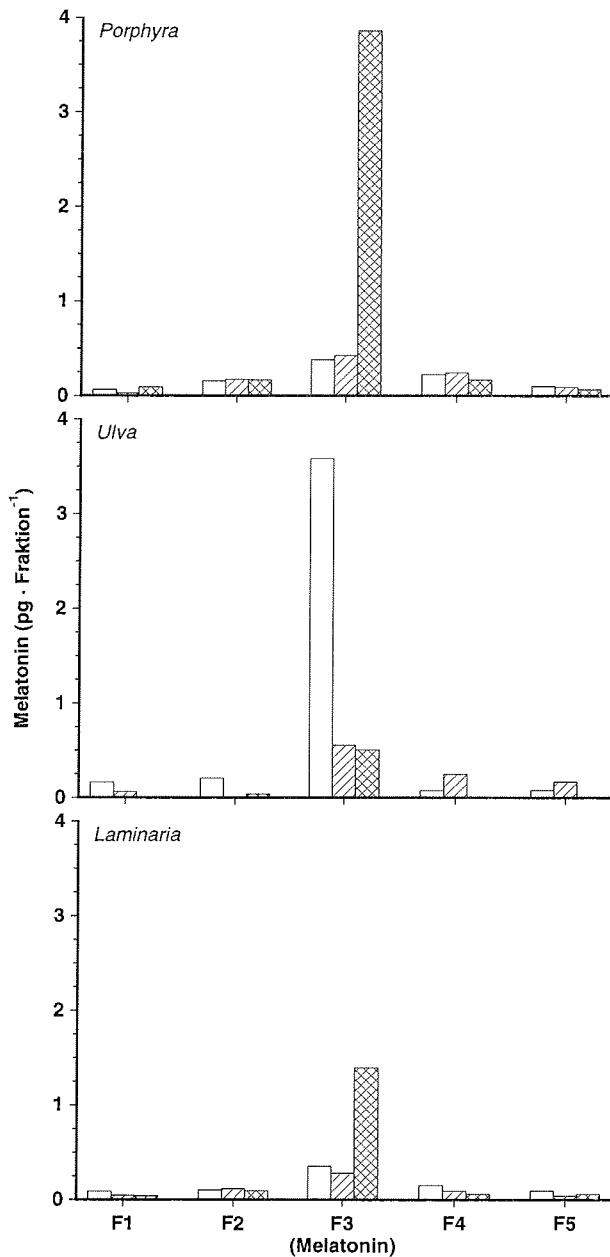


Abb. 3-13: Melatonin-Immunoreaktivität in verschiedenen Fraktionen HPLC-1-aufgereinigter Ether-Extrakte von *Porphyra*, *Ulva* und *Laminaria*.

Es wurden jeweils fünf 1-Minuten-Fractionen aufgefangen, beginnend 2,4 Minuten vor der Melatoninretentionszeit bis 2,6 Minuten danach. Ordinate: mittels ELISA bestimmter Melatoningehalt der Fraktion. Die in das HPLC-1-System injizierte Menge entsprach dem Extrakt von 100 mg Algenmaterial. Leere, gestreifte und schraffierte Säulen repräsentieren die Extrakte von jeweils drei unabhängigen Proben.

5.2.3 Messung von Melatonin in Algenextrakten durch Hochdruck-flüssigkeitschromatographie mit Fluoreszenzdetektion nach präparativer HPLC und Derivatisierung des Melatonins

In den HPLC-aufgereinigten Extrakten verschiedener Makroalgenarten konnte Melatonin mit Hilfe der von IINUMA *et al.* (1999) beschriebenen Methode nachgewiesen und quantifiziert werden. Zur Anpassung der Sensitivität des Assays an die auftretenden Konzentrationen wurden von jeweils drei HPLC-1-Läufen die Fraktionen aufgefangen und extrahiert.

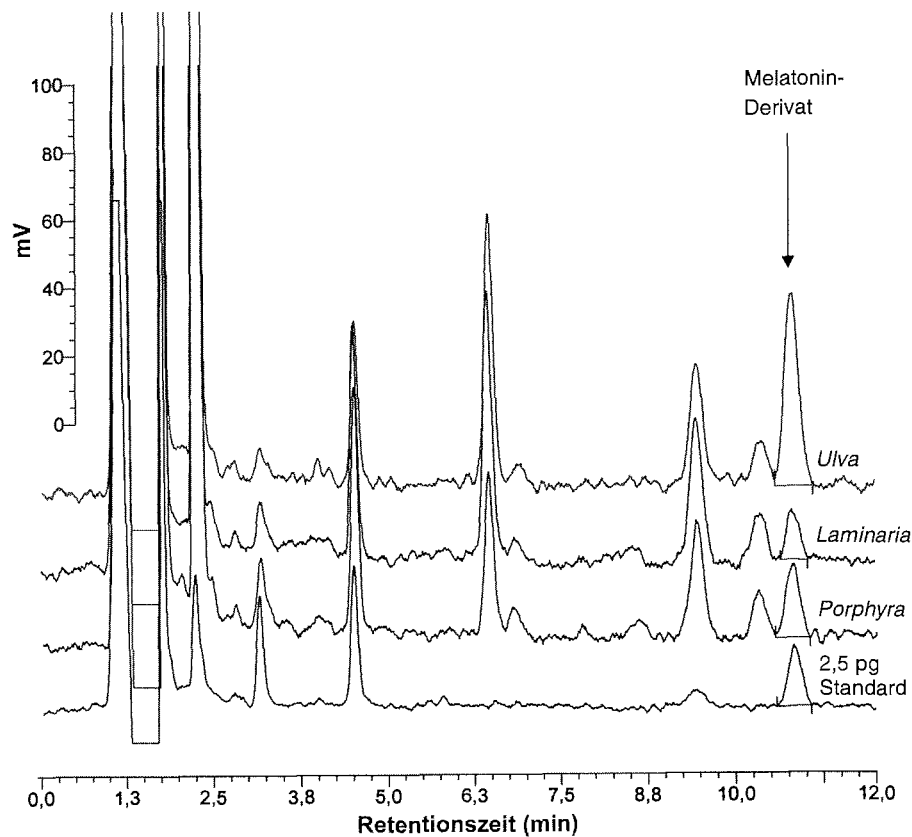


Abb. 3-14: Beispielläufe von HPLC-2-Chromatogrammen für die Quantifizierung von Melatonin durch Vorsäulenderivatisierung in aufgereinigten Extrakten diverser Makroalgen.

Es wurden jeweils drei HPLC-1-Läufe aufgefangen, extrahiert und gepoolt. Der gemessene Melatoningehalt betrug $28,8 \text{ pg} \cdot \text{g}^{-1}$ in *Ulva*, $6,4 \text{ pg} \cdot \text{g}^{-1}$ in *Laminaria* und $10,6 \text{ pg} \cdot \text{g}^{-1}$ in *Porphyra*. Zum Vergleich wurden $2,5 \text{ pg}$ Melatonin in das HPLC-1-System injiziert und nach Derivatisierung in das HPLC-2-System aufgegeben (unterstes Chromatogramm). Hier wurde nur die Melatoninfraktion eines einzelnen Laufes aufgefangen und extrahiert. $\lambda_{\text{ex}} = 247 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 384 \text{ nm}$.

Ergebnisse

Die Chloroformphasen der 3 parallelen Extrakte wurden zusammengegeben, eingedampft, in Wasser aufgenommen und die Derivatisierung durch Zugabe von Natriumcarbonatlösung und Wasserstoff-peroxid bei 92°C eingeleitet.

Abbildung 3-14 zeigt Beispielchromatogramme für Etherextrakte von verschiedenen Makroalgen, in denen der Melatoninderivat-Peak mit einer Retentionszeit von 10,8 Minuten deutlich zu erkennen ist. Die dargestellten Kurven entsprechen einem Melatoningehalt von 6,4 $\text{pg} \cdot \text{g}^{-1}$ in der *Laminaria*-, 10,6 $\text{pg} \cdot \text{g}^{-1}$ in der *Porphyra*- und 28,8 $\text{pg} \cdot \text{g}^{-1}$ in der *Ulva*-Probe. Zum Vergleich wurden 2,5 pg Melatoninstandard in das präparative HPLC-1-System injiziert, extrahiert, derivatisiert und in HPLC-2 aufgegeben. Hierbei wurde nur eine einzelne Fraktion aufgefangen und extrahiert.

Eine direkte Messung des Melatoningehalts ohne vorherige Aufreinigung durch präparative HPLC war nicht möglich, da der Peak des Melatoninderivats nicht von diversen Peaks mit ähnlicher Retentionszeit abgetrennt werden konnte.

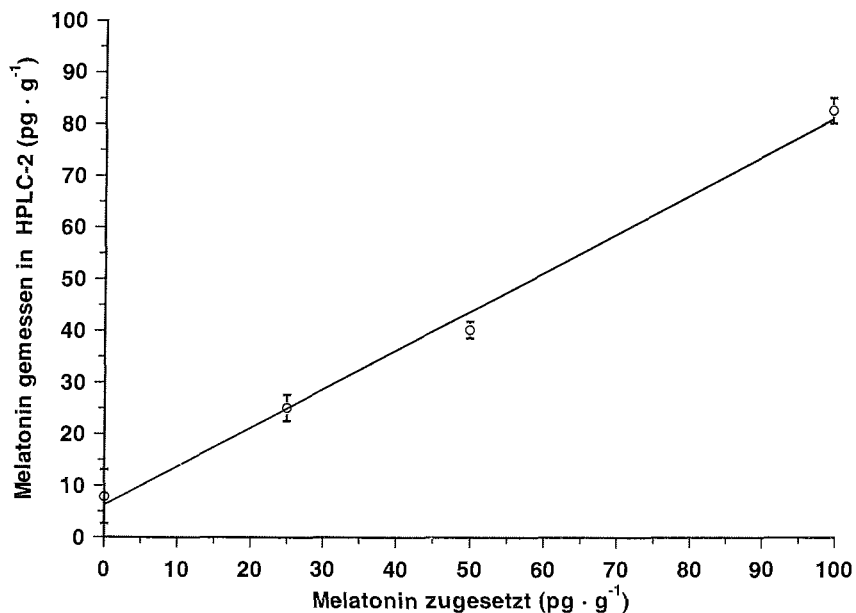


Abb. 3-15: Eichung auf Matrix bei Messung mit HPLC-2 in Kombination mit Vorsäulenderivatisierung bei *Porphyra*.

Es wurden jeweils die Melatoninfraktionen von drei HPLC-1-Läufen extrahiert, gepoolt und derivatisiert. Kreise: Mittelwert von 3 Parallelbestimmungen. Vertikale Linien: Standardabweichung. Die Probe in dem dargestellten Beispiel hatte einen Melatoningehalt von 6,2 $\text{pg} \cdot \text{g}^{-1}$ (8,3 $\text{pg} \cdot \text{g}^{-1}$ bei Einbeziehung der Wiederfindungsrate).

Durch Zugabe von 0 bis 100 pg Melatonin · g⁻¹ (FG) zu einer homogenen *Porphyra*-Probe zu Beginn der Extraktion ließ sich eine Eichung auf die biologische Matrix erstellen (Abb. 3-15). Für eine möglichst hohe Vergleichbarkeit wurden hier ebenfalls die Melatoninfraktionen von drei HPLC-1-Läufen aufgefangen und gepoolt. Der Kurvenverlauf läßt sich mit einer Ausgleichsgeraden mit der Funktion $f(x) = 0,75x + 6,23$ mit hoher Genauigkeit beschreiben ($r^2 = 0,994$). Somit betrug die Wiederfindungsrate für zugesetztes Melatonin in dem dargestellten Beispiel 75% und lag in einer vergleichbaren Größenordnung wie die Wiederfindungsraten bei Quantifizierung mittels LC-ELISA. Der Melatoningehalt der untersuchten Probe betrug 6,2 pg · g⁻¹, bzw. 8,3 pg · g⁻¹ unter Einbeziehung der Wiederfindungsrate.

5.2.4 Korrelation zwischen Quantifizierungen des Melatoningehalts durch ELISA und Hochdruckflüssigkeitschromatographie nach Vorsäulenderivatisierung in HPLC-aufgereinigten Extrakten

Für jede Quantifizierung mit HPLC nach Vorsäulenderivatisierung sind zunächst drei präparative HPLC-Läufe notwendig, um eine für das verwendete Material ausreichende Empfindlichkeit zu erzielen. Auf diese Weise wird eine vergleichbare Nachweisgrenze der Messungen wie für die zuvor beschriebenen Messungen mit ELISA erreicht. Trotz des relativ hohen Arbeitsaufwandes mit entsprechend geringem Probendurchsatz bietet diese Methode eine relativ einfach durchzuführende Möglichkeit zur Validierung von ELISA-Messungen und ermöglicht so einen direkten Vergleich zwischen Quantifizierungen durch ELISA und HPLC.

Hierzu wurden von den Arten *Porphyra*, *Ulva* und *Laminaria* jeweils sieben unabhängige Proben mittels präparativer HPLC aufgereinigt und der Melatoningehalt in der entsprechenden Fraktion anschließend parallel mit ELISA und mit HPLC bestimmt (Abb. 3-16). Die Unterschiede der mit beiden Methoden bestimmten Melatoninmengen sind meist sehr gering. Mit Hilfe eines Wilcoxon-Tests für Paarvergleiche konnten keine Unterschiede zwischen den beiden Methoden für die Messung von Melatonin festgestellt werden (Signifikanzniveau = 0,88; n = 21). Die in Abbildung 3-17 dargestellte Auftragung der gemessenen Melatoningehalte gegeneinander wird durch eine lineare Ausgleichsfunktion ($f(x) = 0,85x + 1,62$) mit hoher Korrelation beschrieben ($r^2 = 0,95$). Die mittels ELISA bestimmten Konzentrationen sind tendenziell etwas niedriger als die Konzentrationen, die durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie nach Vorsäulenderivatisierung ermittelt wurden.

Ergebnisse

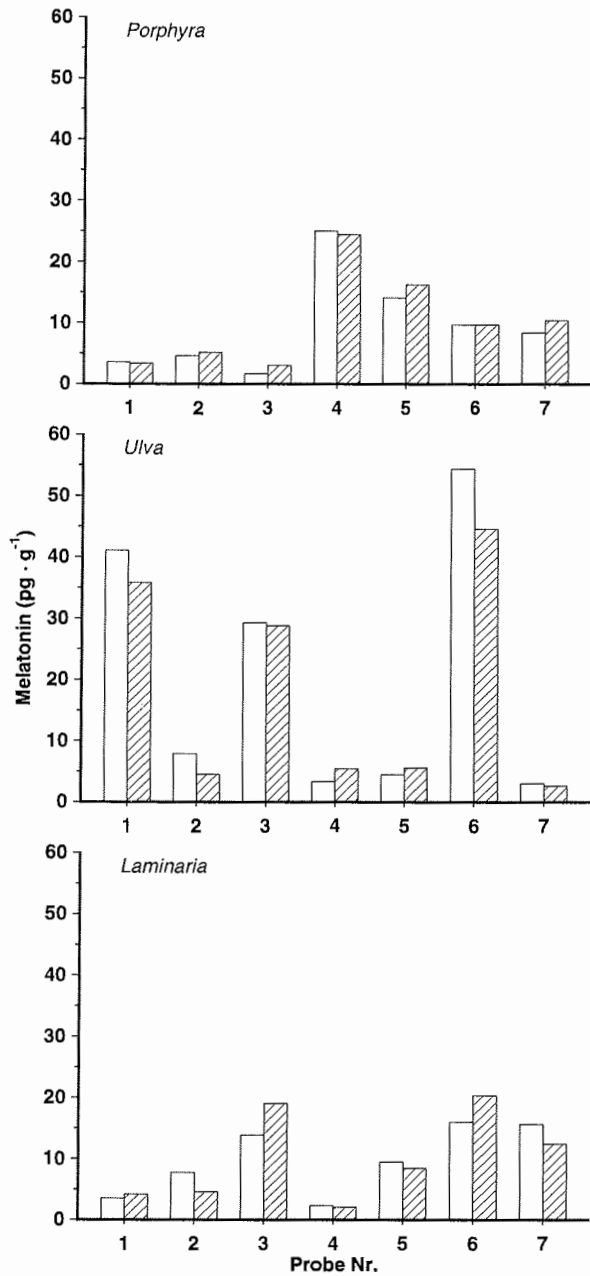


Abb. 3-16: Vergleich von Quantifizierungen mittels HPLC-2 und ELISA nach vorheriger Aufreinigung der Extrakte durch HPLC-1.

Es wurde der Melatoningehalt von 7 unabhängigen Proben mittels ELISA und HPLC-2 parallel bestimmt. Leere Säulen: durch HPLC-2 bestimmter Melatoningehalt. Gestreifte Säulen: durch ELISA ermittelter Melatoningehalt.

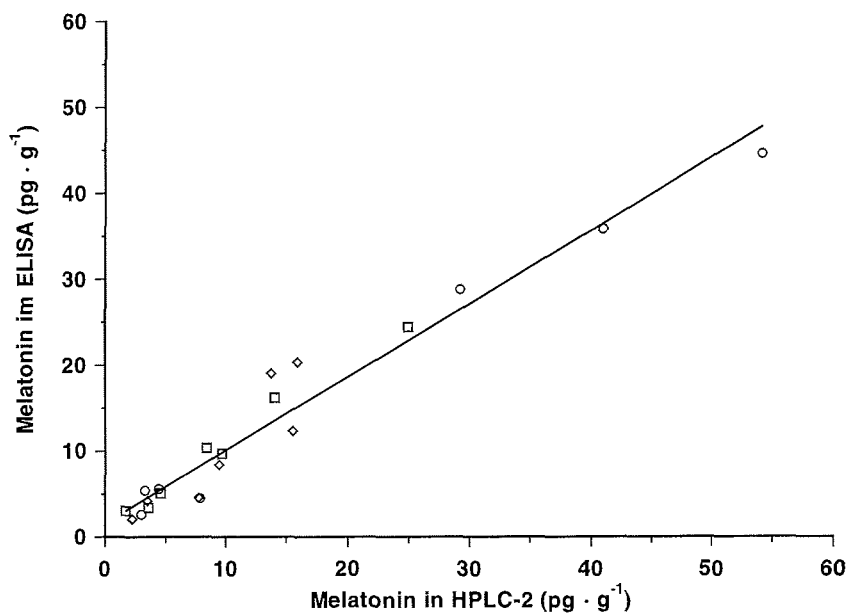


Abb. 3-17: Korrelation zwischen Quantifizierungen mit ELISA und HPLC-2 nach Vorsäulenderivatisierung in HPLC-aufgereinigten Extrakten von *Porphyra*, *Ulva* und *Laminaria*.

Kreise: *Ulva*. Quadrate: *Porphyra*. Rauten: *Laminaria*. Schwarze Linie: Regressionsgerade mit der Funktion $f(x) = 0,85x + 1,62$. Korrelationskoeffizient $r^2 = 0,95$.

5.3 Extraktion von Melatonin aus Makroalgen

5.3.1 Vergleich der Extraktionsmethoden sowie zwischen HPLC-aufgereinigten und direkten ELISA-Quantifizierungen

Viele der bislang zur Extraktion von Melatonin aus phototrophen Organismen eingesetzten Extraktionsmethoden basieren auf unterschiedlichen Prozeduren und Lösungsmitteln. Um die Extraktionseffizienz für Melatonin für einige dieser Methoden zu bewerten, wurden vergleichende Messungen vorgenommen. Da neben der Extraktion von Melatonin auch Substanzen, die bei einer immunologischen Quantifizierung durch Kreuzreaktivitäten zu falsch-positiven Ergebnissen führen, mit unterschiedlicher Effizienz extrahiert werden, wurde parallel zwischen HPLC-aufgereinigten Extrakten sowie direkten Extrakten verglichen. Um eine möglichst hohe Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurden die Extraktionsmethoden so abgestimmt, dass die eingesetzten Konzentrationen unabhängig der verwendeten Methode immer gleich hoch sind. Durch grobes Vormörsern einer großen Menge Algenmaterial wurden weitgehend homogene Proben gewonnen, die dann mit den verschiedenen Extraktionsmethoden untersucht wurden. Neben der Messung von nativem Melatonin wurde parallel Melatoninstandard zugegeben, um neben

Ergebnisse

der Extraktionseffizienz auch die Wiederfindungsrate zu bestimmen und so auf eine mögliche (extrazelluläre) Zerstörung von Melatonin während des Extraktionsvorganges schließen zu können. Diese vergleichenden Messungen wurden an jeweils drei unabhängigen Proben an den Arten *Porphyra*, *Ulva* und *Laminaria* vorgenommen. Bei *Laminaria* konnte eine Extraktion mit Tris-HCl-Puffer in Kombination mit Perchlorsäure nicht untersucht werden, da durch ausfallende Alginat keine Abtrennung der festen Bestandteile durch Zentrifugation erzielt werden konnte.

Die beobachteten Melatoninkonzentrationen waren bei allen HPLC-aufgereinigten Extrakten relativ ähnlich und lagen in einer vergleichbaren Größenordnung wie die zuvor beobachteten Melatoninkonzentrationen (Abb. 3-18). Im Vergleich dazu waren bei den nicht-aufgereinigten Extrakten deutliche Unterschiede zu erkennen. Hier zeigten die direkten PCA-extrahierten Proben immer eine höhere Immunoreaktivität als die aufgereinigten Extrakte (Wilcoxon-Test für Paarvergleiche; $p = 0,027$; $n = 6$). Auch bei der Acetonextraktion wurde ein signifikanter Unterschied zwischen HPLC- und nicht-aufgereinigten Extrakten beobachtet ($P = 0,007$; $n = 9$), wobei die Immunoreaktivität bei direkter Messung meist höher war. Die (apparenten) Melatoninkonzentrationen, die in nicht-aufgereinigten Etherextrakten gemessen wurden, entsprechen etwa denen in HPLC-aufgereinigten Extrakten ($P = 0,68$; $n = 9$).

Wurde Melatoninstandard vor der Extraktion zugegeben ($100 \text{ pg} \cdot \text{g}^{-1}$), wurde dieser in allen Proben und mit allen Extraktionsmethoden mit relativ hoher Rate wiedergefunden. Dies trifft sowohl für direkte Quantifizierungen als auch für Messungen von HPLC-aufgereinigten Extrakten zu. Die mittlere Wiederfindungsrate für zugesetztes Melatonin betrug $60,4 (\pm 12,4)\%$. Dies war allerdings geringfügig niedriger als die zuvor beobachteten Wiederfindungsraten, was vermutlich auf die zusätzlichen Arbeitsschritte zur Aufteilung der Proben zurückzuführen ist. Zwischen den verschiedenen Extraktionsmethoden konnten keine signifikanten Unterschiede in der Wiederfindungsrate beobachtet werden. Ebenso war die Wiederfindungsrate unabhängig von der untersuchten Art und davon, ob die Extrakte vor der immunologischen Messung aufgereinigt wurden oder nicht.

Trotz der geringen Unterschiede zwischen aufgereinigten und nicht aufgereinigten Extrakten bei der Etherextraktion wurde im weiteren Verlauf dieser Arbeit immer mit flüssigkeitschromatographisch aufgereinigten Extrakten gearbeitet.

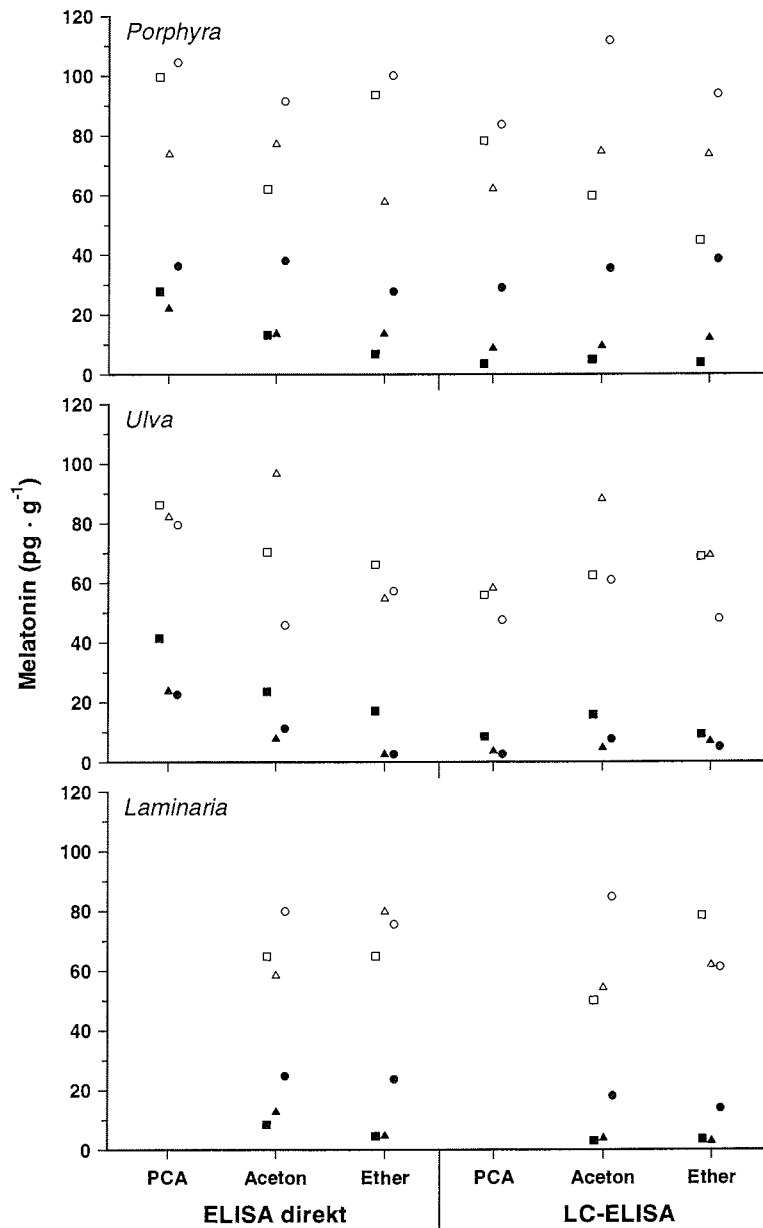


Abb. 3-18: Vergleich der Extraktionseffizienz verschiedener Extraktionsmethoden sowie zwischen direkter und flüssigkeitschromatographisch aufgereinigter Extrakte bei Messung im ELISA.

Drei individuelle Proben wurden jeweils mit PCA-, Aceton- und Etherextraktion aufgearbeitet und der Melatoningehalt der Extrakte entweder direkt oder nach vorheriger Aufreinigung durch HPLC-1 immunologisch im ELISA bestimmt. Quadrat, Dreieck und Kreis repräsentieren jeweils 3 individuelle Proben ohne Zugabe von Melatoninstandard (geschlossene Symbole) oder nach Zugabe von 100 pg · g⁻¹ Melatoninstandard vor Beginn der Extraktion (offene Symbole).

5.3.2 Stabilität des Melatonins in Algenproben während der Lagerung bei -80°C unter Lichtausschluss

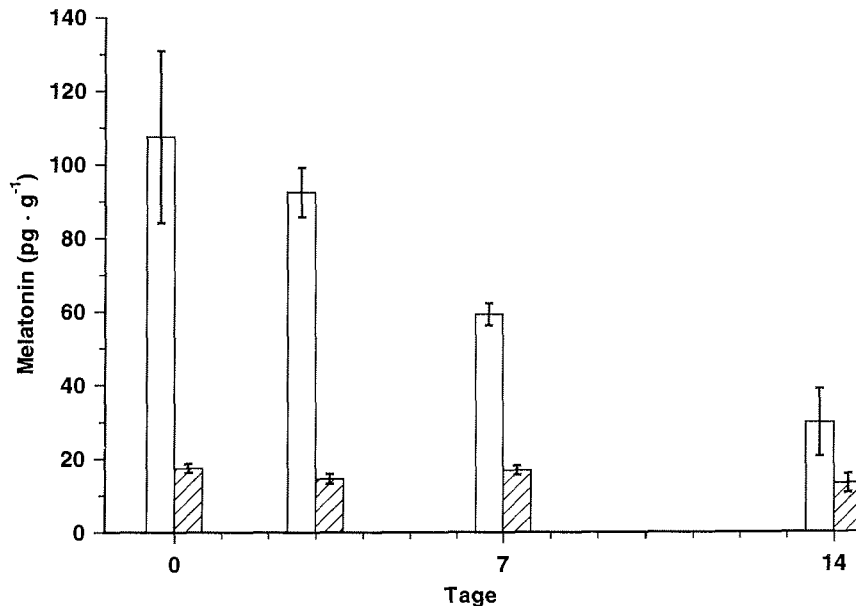


Abb. 3-19: Stabilität des (apparenten) Melatonins in einer *Porphyra*-Probe während der Lagerung bei -80°C unter Lichtausschluss.

Vergleich zwischen HPLC-1- und LC-ELISA-Quantifizierungen von Etherextrakten von *Porphyra*. Leere Säulen: Mittelwert von 4 Parallelbestimmungen mit HPLC-1. Gestreifte Säulen: Mittelwert von 4 Parallelbestimmungen durch LC-ELISA. Abszisse: Dauer der Aufbewahrung der Proben bei -80°C im Dunkel in Tagen. Vertikale Linien: Standardabweichung. Die mittels HPLC-1 direkt bestimmten Werte stellen vermutlich Überbewertungen durch eine Substanz dar, die mit Melatonin koeluiert und bei -80°C instabil ist.

Die Stabilität von Melatonin einer *Porphyra*-Probe während der Lagerung bei -80°C im Dunkeln sollte untersucht werden. Eine geringe Verlustrate des Melatonins in den Algenproben während der Lagerung zwischen Probennahme und Aufarbeitung ist Voraussetzung, um größere Probenserien wie etwa Tag-Nacht-Vergleiche oder Tagesgänge mit der notwendigen Anzahl an Parallelen bearbeiten zu können.

Zur Untersuchung der Stabilität von Melatonin in tiefgefrorenen Algenproben wurden mehrere Algenhalli in flüssigem Stickstoff grob vorgemörsert und dieses weitgehend homogene Algenpulver direkt und nach 3, 7 und 14 Tagen aufgearbeitet und der Melatoningehalt nach Etherextraktion mittels LC-ELISA bestimmt (Abb. 3-19).

Bei Quantifizierung mittels LC-ELISA betrug der mittlere Melatoningehalt (ohne Einbeziehung der Wiederfindungsrate) der untersuchten Proben 15,5 (±2,5) pg · g⁻¹. Der Melatoningehalt der untersuchten Proben war über den Untersuchungszeitraum weitgehend stabil. Mit Hilfe eines t-Tests konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Probennahmetagen bei der Quantifizierung mittels ELISA beobachtet werden.

Die zusätzlich dargestellten Messwerte der HPLC-1-Messungen zeigen ein Beispiel für Coelution einer unbekanntes Substanz mit einer identischen Retentionszeit wie der Melatoninstandard. Diese Substanz ist instabil oder flüchtig, da ihre Konzentration bei längerer Lagerung bei -80°C abnimmt.

Es konnten keine Anzeichen für einen Abbau des in der Probe enthaltenen Melatonins während der 14-tägigen Aufbewahrung bei -80°C im Dunkeln beobachtet werden. Vorsichtshalber wurden bei allen Versuchen die Algenproben nie länger als 14 Tage tiefgefroren, bevor die Aufarbeitung erfolgte.

5.3.3 Einfluss des Zellaufschlusses auf die gefundenen Melatoninkonzentrationen und auf die Wiederfindungsraten zugesetzten Melatoninstandards

Als ein weiterer Parameter für die Messung des Melatoningehalts von Makroalgen sollte untersucht werden, in welchem Maße der Zellaufschluss während des Extraktionsvorgangs die gemessenen Melatoninkonzentrationen beeinflusst. Da es auch vorstellbar wäre, dass das enthaltene Melatonin bei sehr intensivem Mörsern beispielsweise durch die längere Exposition mit Luftsauerstoff bereits zerstört wird, wurden parallel Proben mit Melatoninstandard versetzt und der Einfluss der Mörserintensität auf die Wiederfindungsrate des zugesetzten Melatonins untersucht. Die Messungen wurden am Beispiel von *Porphyra* durchgeführt. Die Proben wurden mit Natriumcarbonatlösung und Ether extrahiert und der Melatoningehalt der Extrakte durch LC-ELISA bestimmt.

Der in der untersuchten Probe von *Porphyra* gefundene Melatoningehalt war mit $>30 \text{ pg} \cdot \text{g}^{-1}$ relativ hoch. Mit zunehmendem Zellaufschluss war eine leichte Zunahme des gemessenen Melatoningehalts zu beobachten (Abb. 3-20). Während nach nur kurzem Mörsern in flüssigem Stickstoff (15 Sekunden) ein Melatoningehalt von nur $30,4 \text{ pg} \cdot \text{g}^{-1}$ gemessen wurde, wurden nach etwas intensiverem Mörsern (1 Minute) $46,9 \text{ pg} \cdot \text{g}^{-1}$ und nach längerem Mörsern in flüssigem Stickstoff (3 Minuten) $53,9 \text{ pg} \cdot \text{g}^{-1}$ gemessen. Mit Hilfe eines zweiseitigen t-Test konnten aufgrund der großen Streuung der Messwerte und der geringen Stichprobengröße ($n=3$) keine signifikanten Unterschiede zwischen den Proben beobachtet werden (Intensität 1 gegen Int. 2: $p=0,074$; Int. 1 gegen Int. 3: $p=0,076$ und Int. 2 gegen Int. 3: $p=0,466$).

Die Wiederfindungsrate für zugesetztes, synthetisches Melatonin ($100 \text{ pg} \cdot \text{g}^{-1}$) betrug im Mittel $58,4 (\pm 13,6)\%$ und war unabhängig von der Mörserintensität. Die höchste Wiederfindungsrate wurde in der am intensivsten gemörserten Probe gemessen ($64,6 \text{ pg} \cdot \text{g}^{-1}$). Es konnten somit keine Anzeichen für eine Zerstörung des Melatonins durch intensives Mörsern in flüssigem Stickstoff beobachtet werden.

Ergebnisse

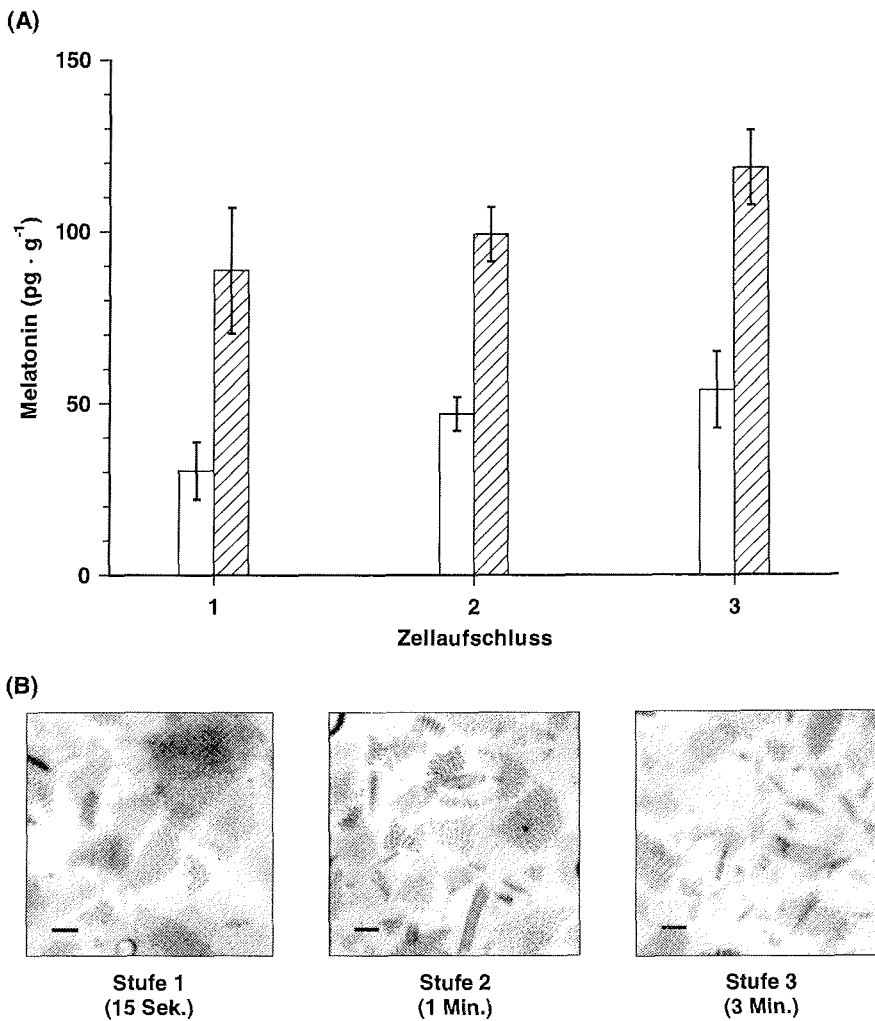


Abb. 3-20: Einfluss des Zellaufschlusses auf die gemessenen Melatoninmengen am Beispiel von *Porphyra*.

(A): Leere Säulen: Mittelwert von 3 Parallelbestimmungen ohne zugesetztes Melatonin. Gestreifte Säulen: Mittelwert von 3 Parallelbestimmungen nach Zugabe von $100 \text{ pg} \cdot \text{g}^{-1}$ Melatonin. Vertikale Linien: Standardabweichung.

(B): Mittels Binokular aufgenommene Fotos von den verschiedenen Zellaufschlussstufen. Werte in Klammern geben an, wie lange jeweils in flüssigem Stickstoff gemörsert wurde. Schwarzer Balken, unten links entspricht $100 \mu\text{m}$.

In den Fotos vom Zellaufschluss (Abb. 3-20 B) ist deutlich zu erkennen, dass trotz relativ langem (= 3 Minuten) Mörsern in flüssigem Stickstoff ein vollständiger Aufschluss der Zellen des Algenhallus nicht erreicht wird.

5.3.4 Einfluss der Beleuchtungsstärke während der Aufarbeitung auf die beobachteten Melatoninwerte

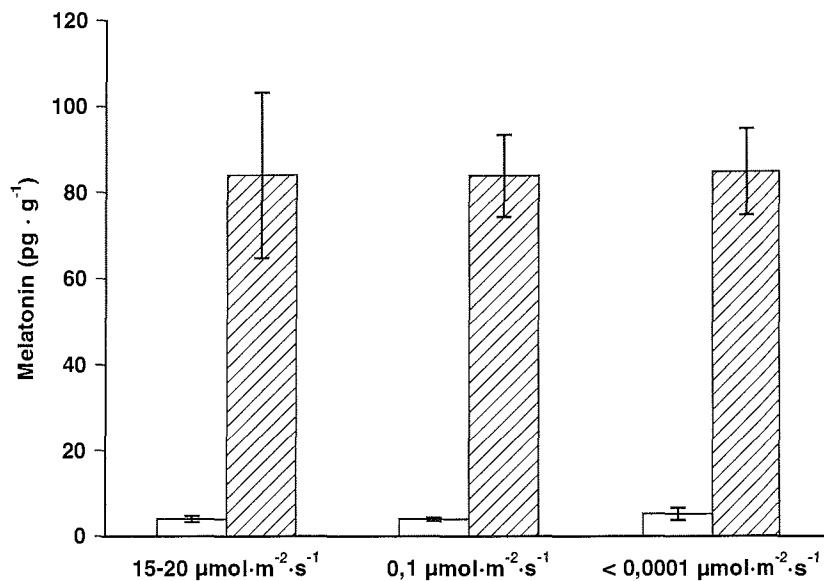


Abb. 3-21: Quantifizierung des Melatoningehalts in *Porphyra umbilicalis* nach Aufarbeitung bei unterschiedlicher Lichtintensität.

Leere Säulen: Mittelwert von 3 Parallelbestimmungen des Melatoningehalts ohne zugesetzten Melatoninstandard. Gestreifte Säulen: Mittelwert von 3 Parallelbestimmungen des Melatoningehalts nach Zugabe von $100 \text{ pg} \cdot \text{g}^{-1}$ zu Beginn der Extraktion. Vertikale Linien: Standardabweichung.

Für die verwendete Extraktionsmethode mit Natriumcarbonatlösung und Ether sollten am Beispiel von *Porphyra* die Auswirkungen von Licht während der Probenaufarbeitung quantitativ erfasst werden. Hierzu wurde eine durch grobes Vormörsern mehrerer *Porphyra*-Thalli weitgehend homogene Probe bei unterschiedlichen Lichtintensitäten aufgearbeitet und der Melatoningehalt durch LC-ELISA bestimmt. Parallel wurde zu Beginn der Extraktion Melatoninstandard ($100 \text{ pg} \cdot \text{g}^{-1}$) zugesetzt, um den Einfluss von Licht auf die Wiederfindungsrate zu bestimmen. Der Mittelwert des Melatoningehalts aller Messungen war in dem untersuchten Beispiel mit $4,4 (\pm 1,2) \text{ pg} \cdot \text{g}^{-1}$ Frischgewicht sehr gering und nahe der unteren Quantifizierungsgrenze der verwendeten Methode, wodurch ein Vergleich erschwert wurde. Innerhalb dieser geringen Konzentrationen konnte kein Einfluss von Licht auf den gemessenen Melatoningehalt beobachtet werden (Abb. 3-21). Auch in den Proben, zu denen zusätzlich Melatoninstandard gegeben wurde, ist kein Unterschied zwischen den bei unterschiedlichen Lichtintensitäten aufgearbeiteten Proben erkennbar. Die mittlere Wiederfindungsrate betrug 79,9% ohne signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen.

Ausserhalb dieser Messreihe wurden alle Proben im abgedunkelten Labor bei Schwachlicht ($< 0,1 \text{ } \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) extrahiert und aufgearbeitet.

5.4 Melatonin in marinen Makroalgen unter chronobiologischen Gesichtspunkten

Der Melatoniningehalt verschiedener Makroalgen wurde jeweils zur Mitte der Photo- und der Scotophase bestimmt, um auf mögliche Tag/Nacht-Unterschiede zu testen. Hierzu wurde der Melatoniningehalt von jeweils sechs um 13:00 und um 1:00 Uhr (MESZ) genommene Proben bestimmt (Tab. 3-3). Die Extraktion erfolgte mit der Ether-Methode mit anschließender Quantifizierung des Melatoniningehalts mit LC-ELISA.

Tab. 3-3: Tag-Nacht-Vergleiche des Melatoniningehalts verschiedener Makroalgenarten.

Die Probennahme erfolgte jeweils um 13:00 (Sommerzeit) und um 1:00 Uhr. Angegeben sind die Mittelwerte von 6 Parallelbestimmungen (\pm Standardabweichung). t-Test: Signifikanzniveau im zweiseitigen, heteroskedastischen t-Test. Alle dargestellten Werte ohne Einbeziehung der Wiederfindungsrate.

Art	Tag ($\text{pg} \cdot \text{g}^{-1}$)	Nacht ($\text{pg} \cdot \text{g}^{-1}$)	t-Test (p)
<i>Porphyra</i>	3,2 ($\pm 2,0$)	10,4 ($\pm 1,8$)	<0,001
<i>Porphyra</i> (Wiederholung)	7,3 ($\pm 2,7$)	10,3 ($\pm 3,2$)	0,114
<i>Ulva</i>	12,9 ($\pm 17,6$)	8,6 ($\pm 4,1$)	0,586
<i>Laminaria</i>	11,1 ($\pm 3,8$)	15,6 ($\pm 3,2$)	0,052
<i>Palmaria palmata</i>	10,6 ($\pm 11,9$)	8,7 ($\pm 1,4$)	0,714
<i>Pterygophora californica</i>	0,9 ($\pm 0,6$)	1,3 ($\pm 0,8$)	0,319
<i>Kappaphycus alvarezii</i>	3,9 ($\pm 1,0$)	3,2 ($\pm 0,7$)	0,193

Lediglich in einer Messreihe von *Porphyra* konnten signifikante Tag/Nacht-Unterschiede im Melatoniningehalt beobachtet werden ($p < 0,001$). Hierbei war der mittlere Melatoniningehalt der Tag-Proben mit $3,2 \text{ pg} \cdot \text{g}^{-1}$ deutlich geringer als in den Nacht-Proben ($10,4 \text{ pg} \cdot \text{g}^{-1}$). Eine Wiederholung dieser Messung zeigte zwar einen tendentiell niedrigeren Melatoniningehalt während des Tages, jedoch waren die Unterschiede deutlich geringer und nicht signifikant ($p = 0,114$). Auch in *Laminaria* wurde ein geringfügig höherer Melatoniningehalt in den während der Nacht genommenen Proben beobachtet, die jedoch mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5,2% knapp über dem lag, was als statistisch signifikant festgelegt wurde (5%).

In den Proben von *Palmaria palmata* und *Ulva* war die Standardabweichung teilweise größer als die Mittelwerte. Dies deutet darauf hin, dass andere Faktoren als der Probennahmezeitpunkt für den Melatoniningehalt von Bedeutung waren. Insbesondere bei *Ulva* wurden während der Ausbildung von Gameten sehr hohe Konzentrationen einer Substanz mit identischer Retentionszeit wie Tryptamin beobachtet. Mögliche Veränderungen des Tryptophanstoffwechsels könnten sich auch auf den Melatoniningehalt ausgewirkt haben.

Der in *Pterygophora californica* festgestellte Melatoniningehalt ist sehr gering und liegt in einigen Einzelproben unterhalb der Quantifizierungsgrenze der

verwendeten Methode. Die Werte wurden lediglich zu Vergleichszwecken durch Extrapolation der ELISA-Eichung ermittelt und angegeben.

Bei *Ulva*, *Palmaria palmata* und *Kappaphycus alvarezii* wurden in den Tagproben im Mittel höhere Melatoninkonzentrationen beobachtet als in den Nacht-Proben.

Zur Suche nach einem möglichen diurnalen Rhythmus des Melatoningehalts in *Porphyra* mit einer höheren zeitlichen Auflösung wurden über einen Zeitraum von 24 Stunden in 3-Stundenintervallen Proben von *Porphyra* genommen und deren Melatoningehalt nach Etherextraktion mittels LC-ELISA bestimmt (Abb. 3-22). Der Melatoningehalt war in den untersuchten Proben im Tagesgang weitgehend konstant. Die Mittelwerte von fünf Parallelbestimmungen je Probennahmezeitpunkt betragen zwischen 13,1 und 16,8 $\text{pg} \cdot \text{g}^{-1}$. Signifikante Unterschiede im Melatoningehalt in Abhängigkeit von der Tageszeit konnten bei Auswertung durch einen zweiseitigen heteroskedastischen t-Test nicht festgestellt werden (Tab. 3-4).

Ergebnisse

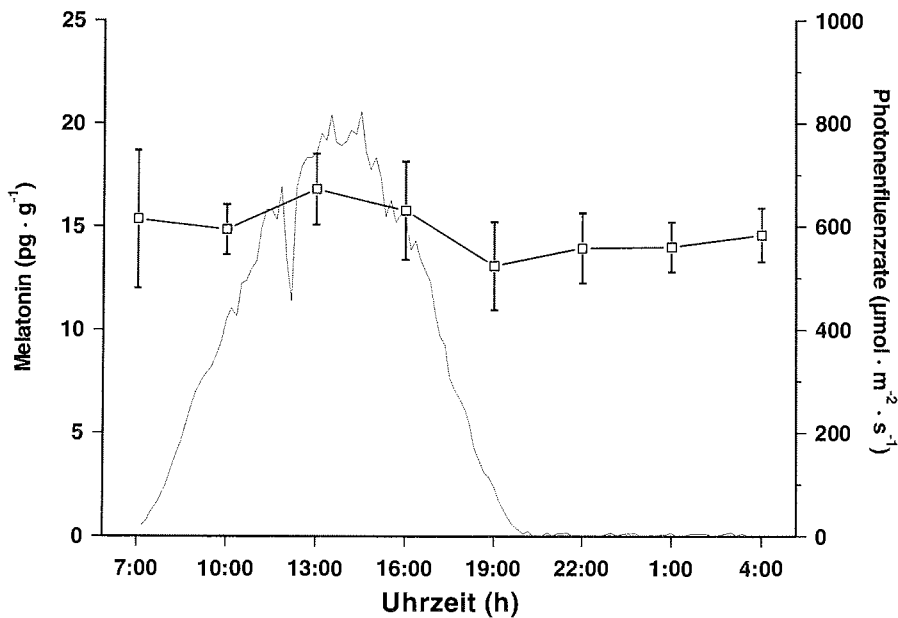


Abb. 3-22: Melatoningehalt in *Porphyra* in Abhängigkeit von der Tageszeit. Quadrate: Mittelwert von fünf Parallelbestimmungen. Vertikale Linien: Standardabweichung. Dünne schwarze Linie: Photonenflussrate während der Probenahme. Die Wiederfindungsrate wurde nicht mit einbezogen.

Tab. 3-4: Signifikanzniveaus im zweiseitigen, heteroskedastischen t-Test zu der unter Abb. 3-22 dargestellten Messreihe. n = 5.

Uhrzeit	7:00	10:00	13:00	16:00	19:00	22:00	1:00	4:00
7:00	1,000	0,895	0,710	0,921	0,587	0,723	0,721	0,839
10:00	0,895	1,000	0,383	0,745	0,497	0,681	0,635	0,883
13:00	0,710	0,383	1,000	0,733	0,212	0,272	0,222	0,333
16:00	0,921	0,745	0,733	1,000	0,427	0,555	0,535	0,677
19:00	0,587	0,497	0,212	0,427	1,000	0,759	0,719	0,569
22:00	0,723	0,681	0,272	0,555	0,759	1,000	0,980	0,778
1:00	0,721	0,635	0,222	0,535	0,719	0,980	1,000	0,754
4:00	0,839	0,883	0,333	0,677	0,569	0,778	0,754	1,000

5.5 Melatonin in *Lycopersicon*

Das HPLC-1-Chromatogramm eines Natriumcarbonat-Ether-Extraktes von *Lycopersicon* zeigte eine Fülle von Peaks (Abb. 3-23). Aufgrund der vielen, bei den verwendeten Wellenlängen stark fluoreszierenden Substanzen musste die Empfindlichkeit des Fluoreszenzdetektors auf eine um den Faktor vier geringere Verstärkung eingestellt werden (Gain 1 statt 2). Da zahlreiche Substanzen erst sehr spät eluiert wurden, verlängerte sich die Dauer pro HPLC-Lauf auf über 70 Minuten. Kurz vor der Retentionszeit des Melatonins wurde eine Substanz mit einem starken Fluoreszenzsignal eluiert, so dass eine direkte Quantifizierung möglichen endogenen Melatonins bei den verwendeten Chromatographiebedingungen nicht möglich war. Ein kleinerer Peak einer Substanz, die nach etwa 10,5 Minuten eluiert wurde, sowie ein sehr großer nach etwa 24 Minuten eluierter Peak entsprechen den Retentionszeiten von N-Acetyltryptamin und Tryptamin.

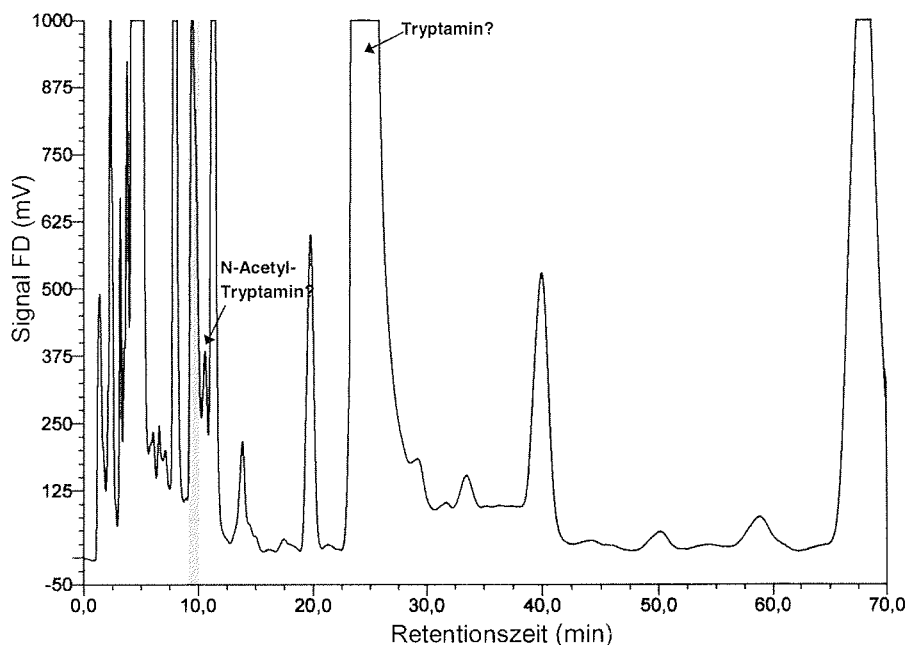


Abb. 3-23: HPLC-1-Chromatogramm eines Natriumcarbonat-Ether-Extrakts von *Lycopersicon*.

Die injizierte Menge entsprach dem Extrakt von 150 mg Tomate. Aufgrund des hohen Gehalts fluoreszierender Substanzen wurde die Empfindlichkeit des Fluoreszenzdetektors auf Gain 1 (statt sonst 2) eingestellt. Grau hinterlegter Bereich: Melatoninfraktion, die zur späteren Quantifizierung durch ELISA oder HPLC nach Vorsäulenderivatisierung aufgefangen und anschließend mit Chloroform extrahiert wurde. Pfeile zeigen auf Peaks mit einer Retentionszeit identisch mit N-Acetyltryptamin bzw. Tryptamin.

Ergebnisse

Anhand der vielen, stark fluoreszierenden Substanzen war eine direkte Detektion des Melatonins durch Veränderung der Chromatographiebedingungen kaum zu erreichen. Aus diesem Grund wurde das HPLC-1-System nur als präparative HPLC zur Aufreinigung der Extrakte verwendet. Die zu diesem Zweck aufgefangene und anschließend mit Chloroform extrahierte Melatoninfraktion ist grau hinterlegt. Hierbei wird der hohe Grad der Aufreinigung deutlich.

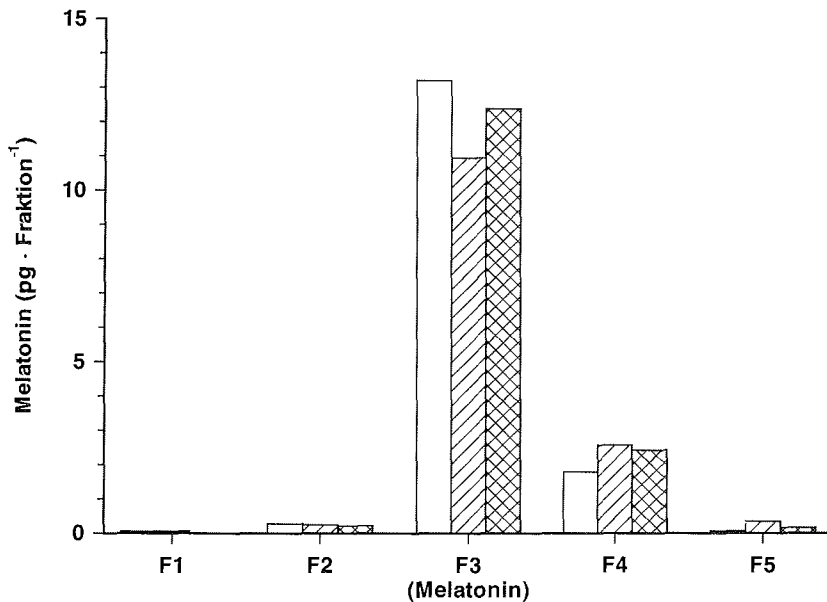


Abb. 3-24: Melatonin-Immunoreaktivität in verschiedenen Fraktionen HPLC-1-aufgereinigter Extrakte von *Lycopersicon*.

Es wurden jeweils 1-Minuten-Fractionen aufgefangen, beginnend 2,4 Minuten vor der Melatoninretentionszeit bis 2,6 Minuten danach. Die Proben aus Fraktion 3 mussten vor Einsetzen in den ELISA 1:2 verdünnt werden, um den Messbereich des Assays nicht zu überschreiten. Die in das HPLC-1-System injizierte Menge entsprach dem Extrakt von 150 mg Tomate. Leere, gestreifte und schraffierte Säulen repräsentieren die Extrakte von 3 Früchten.

Die Melatonin-Immunoreaktivität in der Melatoninfraktion, sowie in zwei Fraktionen vor und nach dem Melatonin-Peak wurde mittels ELISA bestimmt (Abb. 3-24). Hierbei zeigte sich deutlich, dass die höchste Immunoreaktivität in der Fraktion gemessen wurde, in der Melatonin eluiert wurde (Fraktion F3). Aufgrund der hohen Konzentration an den Antikörper des ELISA bindender Substanzen mussten die Proben der Melatoninfraktion vor der Messung 1:2 mit ELISA-Rekonstitutionspuffer verdünnt werden. Auch in Fraktion F4 wurde noch eine Melatonin-Immunoreaktivität deutlich oberhalb der Nachweisgrenze (zwischen 1,8 und 2,6 pg · Fraktion⁻¹) beobachtet. Diese war vermutlich auf in dieser Fraktion eluierendes N-Acetyltryptamin oder auf eine etwas verzögerte Elution endogenen Melatonins zurückzuführen. Die Melatonin-Immunoreaktivität in den Fraktionen F1, F2 und F5 war sehr gering und meist unterhalb der Detektionsgrenze des ELISA.

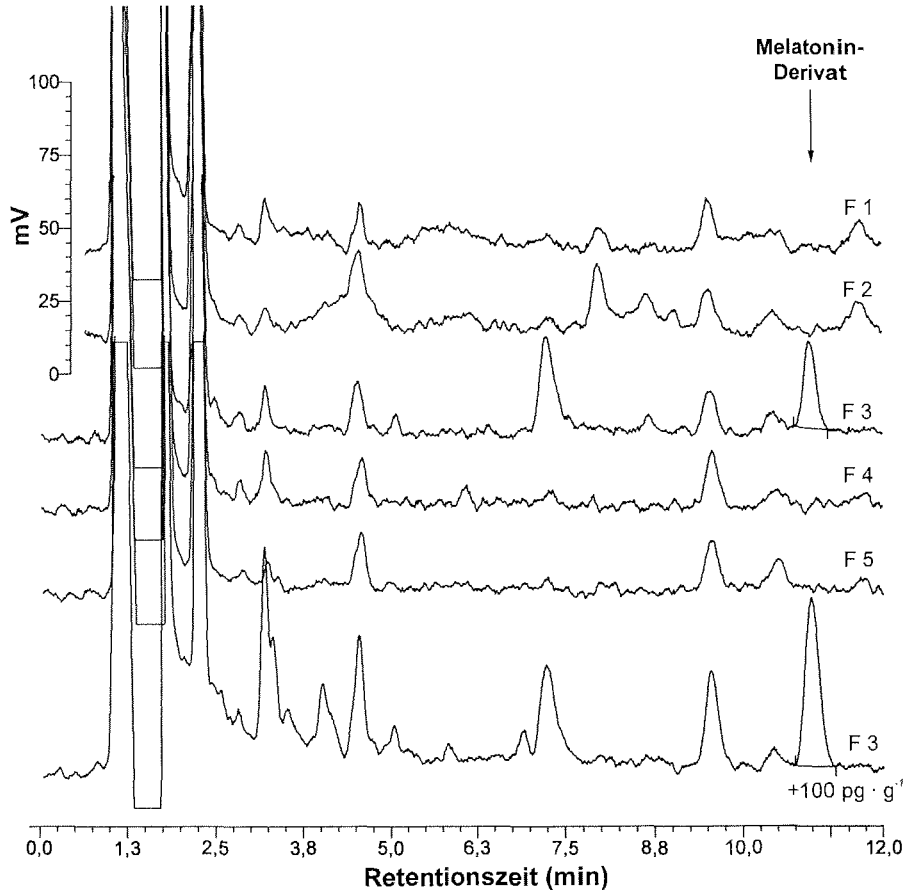


Abb. 3-25: HPLC-2-Chromatogramme von aufgereinigten und fraktionierten Natriumcarbonat-Ether-Extrakten von *Lycopersicon*.

Der Extrakt wurde zunächst in das HPLC-1-System injiziert und die Melatoninfraktion (F3) sowie 2 Fraktionen davor und danach aufgefangen, extrahiert und derivatisiert. Bei dem unteren Chromatogramm der Melatoninfraktion wurden zu Beginn der Extraktion $100 \text{ pg} \cdot \text{g}^{-1}$ Melatoninstandard zugesetzt. Das Melatoninderivat wird mit einer Retentionszeit von 11,0 Minuten eluiert. Skala: Signalstärke des Fluoreszenzdetektors. $\lambda_{\text{ex}} = 247 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 384 \text{ nm}$. Zeitfenster der Fraktionen vgl. Abb. 3-24.

Die Einzelproben stammten von 3 Früchten einer Ripse, wobei die Unterschiede in der Melatonin-Immunoreaktivität zwischen den Einzelproben relativ gering waren. Der gemessene Melatoningehalt in Fraktion 3 betrug zwischen 10,9 und 13,2 pg . Dies entspricht bei einer Injektion entsprechend 150 mg Tomate einem Melatoningehalt von 72,9 bis 87,9 $\text{pg} \cdot \text{g}^{-1}$ (FG; Wiederfindungsrate nicht einbezogen). Die Wiederfindungsrate für $100 \text{ pg} \cdot \text{g}^{-1}$ zu Beginn der Extraktion zugesetztes Melatonin betrug 68%.

Neben einer Quantifizierung des Melatonins in aufgereinigten Extrakten von *Lycopersicon* durch ELISA konnte auch durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie nach vorheriger Derivatisierung der Melatoningehalt in den

Ergebnisse

HPLC-1-Fractionen bestimmt werden (Abb. 3-25). Anders als bei der Messung von Melatonin in marinen Makroalgen, bei denen drei HPLC-1-Fractionen gepoolt wurden, reichten für die Messungen an Tomate aufgrund des höheren Melatoningehalts jeweils einzelne HPLC-1-Fractionen für die Quantifizierung des Melatoninderivats aus. Ein Peak mit einer identischen Retentionszeit wie das Derivat synthetischen Melatonins wurde ausschließlich in der Melatoninfraktion (F3) beobachtet. In den Fraktionen F1, F2, F4 und F5 wurde kein Melatoninderivat-Peak beobachtet.

Zu Beginn der Extraktion zugegebenes Melatonin ($100 \text{ pg} \cdot \text{g}^{-1}$) bewirkte etwa eine Verdoppelung der Fläche des Melatoninderivat-Peaks in der Fraktion F3 (unterstes Chromatogramm).

Tab. 3-5: Vergleich des Melatoningehalts in drei Proben von *Lycopersicon* zwischen Quantifizierungen mit HPLC-2 nach Vorsäulenderivatisierung und ELISA.

Für beide Analysen wurden die Proben zunächst flüssigkeitschromatographisch aufgereinigt. Angaben mit Einbeziehung der Wiederfindungsrate.

Probe	HPLC-2 ($\text{pg} \cdot \text{g}^{-1}$)	ELISA ($\text{pg} \cdot \text{g}^{-1}$)
1	97,4	129,4
2	100,2	107,2
3	92,8	121,2

Beim Vergleich von 3 Proben von *Lycopersicon*, deren Melatoningehalt sowohl mittels ELISA als auch durch HPLC nach vorheriger Derivatisierung des Melatonins bestimmt wurde, wurden weitgehend identische Melatoninkonzentrationen ermittelt (Tab. 3-5). Dabei war der immunologisch bestimmte Melatoningehalt der Proben im Mittel um den Faktor 1,23 höher als bei einer Quantifizierung des Melatoninderivats mit HPLC-2.

6 Diskussion

Für diverse Rot-, Grün- und Braunalgen konnte das Vorkommen von Melatonin erstmals nachgewiesen werden. Da der Melatoningehalt in den untersuchten Makroalgenarten mit Werten von meist weniger als $50 \text{ pg} \cdot \text{g}^{-1}$ Frischgewicht sehr gering war, waren für Quantifizierungen des Indolamins hochsensitive Methoden notwendig. Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit wurde auf die Entwicklung und Validierung dieser Methoden gelegt, wobei die wichtigsten Schritte dieser Prozedur jeweils an den Arten *Porphyra umbilicalis*, *Ulva lactuca* und *Laminaria saccharina* exemplarisch demonstriert wurden.

Tag/Nacht-Vergleiche des Melatoningehalts bei sechs Makroalgenarten lieferten wenige Hinweise für Änderungen des Melatoningehalts parallel zur diurnalen Lichtexposition. Lediglich bei *Porphyra* konnte in einer Messreihe ein signifikanter Unterschied mit einem höheren Melatoningehalt während der Nacht beobachtet werden. Dieses Ergebnis konnte jedoch bei einer Wiederholung der Messung nicht bestätigt werden und auch eine 24-Stunden Messung an dieser Art zeigte weitgehend konstante Werte über den Tagesverlauf. Abschließend wurde am Beispiel von *Lycopersicon esculentum* (Tomate) die Anwendbarkeit der erarbeiteten Methoden zur Bestimmung des Melatoningehalts an einem weiteren phototrophen Organismus demonstriert.

Diverse Ergebnisse zur Quantifizierung von Melatonin und zur Validierung der Bestimmungsmethoden sollen im Folgenden detailliert diskutiert werden. Darüber hinaus soll die Bedeutung der Messergebnisse für die Evaluierung von Melatonin als ubiquitäres Antioxidanz und Radikalfänger sowie die mögliche Funktion als photoperiodische Signalsubstanz und putatives Phytohormon erörtert werden. Abschließend wird ein Schema vorgestellt, wie unter Verwendung der hier vorgestellten Extraktions- und Quantifizierungsmethoden die Bestimmung von Melatonin in bisher noch nicht untersuchtes pflanzliches Material angegangen werden kann.

Versuche, Melatonin in Extrakten von Makroalgen mittels Hochdruck-flüssigkeitschromatographie mit Fluoreszenz- oder elektrochemischer Detektion (HPLC-FD / -ECD) direkt zu quantifizieren, scheiterten aufgrund des geringen Melatoningehalts und eines oftmals hohen Gehalts an Substanzen, die mit ähnlicher Retentionszeit eluierten und bei den verwendeten Wellenlängen ebenfalls fluoreszierten bzw. von dem elektrochemischen Detektor oxidiert und registriert wurden. Direkte HPLC-Messungen konnten zur Bestimmung von Melatonin an Vertebraten (RAYNAUD & PÉVET, 1991; BECHGAARD *et al.*, 1998; CHANUT *et al.*, 1998) sowie an dem Dinoflagellaten *Lingulodinium polyedrum* (POEGGELER *et al.*, 1991) und diversen höheren Pflanzen angewandt werden (HATTORI *et al.*, 1995; MANCHESTER *et al.*, 2000; MURCH *et al.*, 2000). Diese Untersuchungsobjekte unterscheiden sich jedoch, da der Melatoningehalt entweder deutlich höher (z.B. bei der Messung von Pinealorganen, Samen oder *L. polyedrum*) und / oder die chemische Matrix der Extrakte weniger komplex war (Pineal und Serum von Vertebraten; CASSONE & NATESAN, 1997). Obwohl die Empfindlichkeit des verwendeten HPLC-FD-Systems (HPLC-1) mit einer Nachweisgrenze von $1,5 \text{ bis } 2 \text{ pg} \cdot \text{Injektion}^{-1}$ vergleichsweise hoch war (vgl.

HARUMI & MATSUSHIMA, 2000), wäre für eine direkte Messung ein starkes Aufkonzentrieren der Extrakte notwendig gewesen, wobei auch Substanzen mit einer ähnlichen Retentionszeit wie Melatonin aufkonzentriert worden wären. Trotz zahlreicher Veränderungen der Chromatographiebedingungen wie Änderungen des pH-Wertes, des Methanolgehalts des Eluenten oder der Konzentration des Ionenpaarreagens ist es nicht gelungen, den Melatonin-Peak sauber von benachbarten Peaks zu separieren. Da die HPLC-Chromatogramme von verschiedenen Algenarten, aber auch innerhalb einer Art, deutlich variierten, wurde eine generelle Freistellung des Melatonin-Peaks nicht erzielt.

Die Validierung der Peakidentität ist ein weiteres Problem von HPLC-Quantifizierungen. Eine Möglichkeit stellt in diesem Zusammenhang der Vergleich des Fluoreszenzspektrums des putativen Melatonin-Peaks sowie synthetischen Melatonins dar. Da hierzu ein Extrakt wiederholt bei verschiedenen Exzitations- und Emissionswellenlängen injiziert werden muss, ist diese Art der Validierung extrem arbeitsaufwändig und eine große Probenmenge ist notwendig. Ein auf diese Weise erstelltes Fluoreszenzspektrum für einen vermeintlichen Melatonin-Peak im Extrakt von *Porphyra umbilicalis* unterschied sich deutlich von dem Fluoreszenzspektrum, welches durch wiederholte Injektion des Melatoninstandards aufgezeichnet wurde. Dies ist ein Hinweis dafür, dass es sich bei dem Peak entweder nicht um Melatonin handelte oder der Melatonin-Peak mit einer oder mehreren Substanzen verunreinigt war.

Die Standardmethode zur Validierung der Peakidentität bei HPLC-Messungen, Coelution mit einem authentischen Standard bei variierenden Chromatographiebedingungen (Temperatur, pH, Ionenpaarreagens, Methanolgehalt), stellt für die Messung von Melatonin in Pflanzenextrakten kein hinreichendes Kriterium dar (CASSONE & NATESAN, 1997; VAN TASSEL & O'NEILL, 2001). In der vorliegenden Arbeit, aber auch bei VAN TASSEL *et al.* (2001), wurde durch Bestimmung der Melatonin-Immunoreaktivität in der HPLC-Fraktion, in der das Melatonin eluierte, auf eine mögliche Korrelation zwischen der Fläche putativer Melatonin-Peaks und der mittels ELISA bzw. RIA bestimmten Immunoreaktivität geprüft. In beiden Fällen wurde jedoch beobachtet, dass Proben, die große Peaks mit identischer Retentionszeit wie synthetisches Melatonin in der HPLC aufwiesen, nicht zwangsweise auch eine entsprechende Immunoreaktivität in der Melatoninfraktion zeigten.

Aus diesen Gründen wurde im weiteren Verlauf der Arbeit von Quantifizierungen mit Hilfe direkter HPLC-Messungen abgesehen, jedoch konnte das beschriebene System sehr gut präparativ zur Aufreinigung der Extrakte eingesetzt werden. Hierzu wurden die aufgefangenen Fraktionen mit Chloroform extrahiert, welches anschließend in der Vakuumzentrifuge eingedampft wurde. Auf diese Weise wurden die in dem Eluenten enthaltenen Salze abgetrennt, da diese potentiell mit den anschließenden Quantifizierungsmethoden interferieren könnten. Diese Methode ermöglicht eine hohe Aufreinigung und die Wiederfindungsrate für Melatoninstandard, welcher zunächst in das HPLC-1-System aufgegeben wurde und anschließend mittels ELISA quantifiziert wurde, war mit 95% sehr hoch. Eine Aufreinigung der Extrakte durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie wurde ebenfalls für Bestimmungen des Melatingehalts an *Pharbits nil*, *Lycopersicon esculentum*

und *Chenopodium rubrum* eingesetzt (VAN TASSEL *et al.*, 2001; KOLÁŘ *et al.*, 1997). Alle diese Arten zeichnen sich durch einen sehr geringen Melatoningehalt aus (*C. rubrum*: Tagwerte).

Quantifizierungen des Melatoningehalts in den HPLC-aufgereinigten Extrakten erfolgten mit Hilfe eines kommerziellen Enzym-gekoppelten Immunoassay (ELISA). Immunologische Quantifizierungsmethoden wie RIA oder ELISA können jedoch oftmals durch Kreuzreaktivitäten mit strukturverwandten Substanzen zu falsch-positiven Ergebnissen führen. Selbst wenn die relative Kreuzreaktivität gering ist, kann es zu drastischen Fehlbewertungen kommen, sobald die Substanz in nennenswert höheren Konzentrationen vorliegt als das Melatonin.

Der verwendete ELISA wurde für Melatoninbestimmungen an Speichel-, Serum-, Plasma- und Urinproben entwickelt und validiert und zeichnet sich durch eine hohe Empfindlichkeit und geringe Kreuzreaktivitäten gegenüber strukturverwandten Tryptophanmetaboliten aus (WEBER *et al.*, 1998). Während für die Messung von Melatonin in Speichel die Proben direkt ohne weitere Aufreinigungs- oder Extraktionsschritte eingesetzt werden können, ist für Bestimmungen des Melatoningehalts in Serum-, Urin- oder Plasmaproben eine vorherige Festphasenextraktion mit C₁₈-Extraktionssäulen notwendig.

Versuche an Extrakten von Makroalgen zeigten jedoch, dass ein Einsatz unaufgereinigter oder nur mittels Festphasenextraktion aufgereinigter Extrakte meist nicht möglich war, da die Melatonin-Immunoreaktivität nicht-aufgereinigter Extrakte oftmals höher war als die Immunoreaktivität in der Melatoninfraktion. Dies ist ein Hinweis dafür, dass in den Extrakten noch weitere Substanzen enthalten waren, die an den Antikörper binden, was zu Überbewertungen des Melatoningehalts geführt hätte. Dass die höhere Immunoreaktivität nicht aufgereinigter Extrakte durch reversibel umgesetztes oder gebundenes und dadurch in der Retentionszeit verändertes Melatonin zu erklären ist (vgl. VAN TASSEL *et al.*, 2001), erscheint unwahrscheinlich, da zugesetzter Melatoninstandard ausschließlich in der Melatoninfraktion wiedergefunden wurde und die Wiederfindungsrate je nach untersuchter Art mit 69 bis 81% vergleichbar hoch war, wie bei Messungen nicht-aufgereinigter Extrakte oder direkter HPLC-Messungen. Dies zeigte, dass zugesetztes und vermutlich auch natives Melatonin praktisch vollständig in der Melatoninfraktion eluiert wurden.

Bei Untersuchungen an *Pharbitis nil* und *Lycopersicon esculentum*, bei denen eine vergleichbare Kombination aus präparativer HPLC und immunologischer Quantifizierung zur Bestimmung des Melatoningehalts verwendet wurde, waren keine Unterschiede zwischen der Melatonin-Immunoreaktivität der Melatoninfraktionen und benachbarter Fraktionen zu erkennen. Erst nach Zugabe von Melatoninstandard zu Beginn der Extraktion setzte sich die Immunoreaktivität in der Melatoninfraktion deutlich ab (VAN TASSEL *et al.*, 2001). Dies deutet darauf hin, dass in den HPLC-aufgereinigten Fraktionen noch relativ große Mengen an Substanzen enthalten waren, die an den verwendeten Antikörper gebunden und zu falsch-positiven Ergebnissen geführt haben. Parallele Quantifizierungen mittels GC-MS zeigten durchweg deutlich geringere Melatoninwerte an (VAN TASSEL *et al.*, 2001).

Bei vergleichbaren Untersuchungen an Extrakten von Makroalgen und *L. esculentum* wurde hingegen auch ohne Zugabe von Melatoninstandard die

höchste Melatonin-Immunoreaktivität in der HPLC-Fraktion beobachtet, in der Melatonin eluierte. Die Melatonin-Immunoreaktivität in den Fraktionen um die Melatoninfraktion war bei Extrakten von Makroalgen durchweg unterhalb der Nachweisgrenze des verwendeten ELISA. Lediglich bei Extrakten von *Lycopersicon* war auch in der HPLC-Fraktion nach der Melatoninfraktion eine erhöhte Immunoreaktivität zu beobachten. Diese könnte durch verzögert eluiertes Melatonin und/oder durch in dieser Fraktion eluierendes N-Acetyltryptamin zu erklären sein, da dieses mit geringer Affinität ebenfalls an den Anti-Melatonin-Antikörper des ELISA bindet (s.u.).

Diese Unterschiede zwischen den beiden Untersuchungen sind möglicherweise durch einen höheren Aufreinigungsgrad des präparativen HPLC-Systems zu erklären, da einerseits kleinere Probenvolumina (100 statt 500 µl) aufgegeben wurden und zudem ein kürzeres Zeitfenster (1 statt 2 Minuten) zum Auffangen der Fraktionen gewählt wurde. Auch könnte eine höhere Selektivität des Anti-Melatonin-Antikörpers des ELISA zu den beobachteten Unterschieden beigetragen haben.

In Applikationsversuchen mit radioaktiv markiertem Tryptophan an *Hypericum perforatum* wurde Tryptamin neben Serotonin, Heteroauxin und Melatonin als Produkt des Tryptophanstoffwechsels identifiziert (MURCH *et al.*, 2000). Auch in den Extrakten verschiedener Makroalgenarten, insbesondere in Extrakten von *Porphyra* und *Ulva*, wurden häufig bei direkten HPLC-Messungen Peaks mit einer identischen Retentionszeit wie Tryptamin beobachtet. Dieses kann durch Aktivität der N-Acetyltransferase, einem Enzym der Melatoninsynthese, zu N-Acetyltryptamin umgesetzt werden (NAMBOODIRI, *et al.*, 1987; ITOH *et al.*, 1995). N-Acetyltryptamin weist mit einer Kreuzreaktivität von bis zu 2% (IC₅₀-Wert = 0,83%) eine nennenswerte Bindungsaffinität zu dem Anti-Melatonin-Antikörper des ELISA auf und könnte zu einer Überbewertung des immunologisch quantifizierten Melatonins beigetragen haben, wenn es in deutlich höheren Konzentrationen vorlag als Melatonin. Unter den verwendeten Chromatographiebedingungen des präparativ eingesetzten HPLC-1-Systems wurde N-Acetyltryptamin mit einer Retentionszeit von 10,50 Minuten sicher von Melatonin getrennt und erst nach der Melatoninfraktion eluiert. Bei der Bestimmung der Melatonin-Immunoreaktivität in Extrakten von Tomate könnte N-Acetyltryptamin zu einer erhöhten apparenten Melatoninkonzentration in der Fraktion F4 (10,05 - 11,05 Minuten) beigetragen haben. Bei der Aufreinigung der Tomaten-Extrakte mittels HPLC-1 wurden Peaks mit einer identischen Retentionszeit wie Tryptamin und N-Acetyltryptamin beobachtet.

Zur Validierung immunologischer Melatonin-Quantifizierungen an Extrakten phototropher Organismen ist eine zweite, unabhängige Methode erforderlich, da die Standardmethoden zur Validierung von Immunoassays, serielle Verdünnung und parallele Inhibition (PENGELLY, 1985), keine ausreichende Sicherheit über die Identität der Substanz zulassen. VAN TASSEL *et al.* (2001) beobachteten für die HPLC-fraktionierten Extrakte von *Pharbitis nil* große Diskrepanzen zwischen RIA- und GC-MS-Quantifizierungen, obwohl diese Extrakte selbst ohne HPLC-Aufreinigung bereits den von PENGELLY (1985) aufgestellten Kriterien entsprachen.

Zur Validierung der ELISA-Messwerte wurde erstmals die von IINUMA *et al.* (1999) beschriebene Methode zur Messung von Melatonin nach Vorsäulen-

derivatisierung für die Bestimmung des Melatoningehalts an Extrakten phototropher Organismen eingesetzt. Durch eine Oxidation des Melatonins in alkalischem Milieu bei 90°C durch Zugabe von Wasserstoffperoxid entsteht N-[(6-methoxy-4-oxo-1,4-dihydroquinolin-3-yl)methyl]acetamid. Dieses Melatonin-derivat weist Exzitations- und Emissionsmaxima bei 245 bzw. 380 nm auf und zeichnet sich im Vergleich zu Melatonin durch eine um den Faktor 6,8 höhere Fluoreszenzintensität aus (TOMITA *et al.*, 2003). Bei anschließender Quantifizierung durch HPLC mit Fluoreszenzdetektion konnten Nachweisgrenzen zwischen 0,2 und 1 fmol (entsprechend 0,046 – 0,232 pg Melatonin · Injektion⁻¹) erzielt werden (INUMA *et al.*, 1999; HAMASE *et al.*, 2000; TOMITA *et al.*, 2003). In eigenen Untersuchungen wurde durch Erstellung eines Fluoreszenzspektrums für derivatisierten Melatoninstandard sichergestellt, dass der für die Quantifizierung erfasste HPLC-Peak dem zuvor beschriebenen Melatoninderivat entsprach, jedoch lag die Nachweisgrenze bei dem verwendeten System bei 1,8 – 2,7 fmol (entsprechend 0,4 bis 0,6 pg Melatonin · Injektion⁻¹). Damit war die Empfindlichkeit im Vergleich zu einer direkten Messung etwa um den Faktor 3,5 bis 4 höher und das System eignete sich gut zur Quantifizierung der meist sehr geringen Melatoninkonzentrationen der HPLC-aufgereinigten Extrakte. Für Quantifizierungen von Proben mit einem Melatoningehalt unter 20 pg · g⁻¹ (FG) konnten die Melatoninfraktionen mehrerer präparativer HPLC-Läufe gepoolt werden um den Messbereich dem des ELISA anzugleichen.

Ebenso wie für ELISA-Bestimmungen ist auch für HPLC-Quantifizierungen nach Vorsäulenderivatisierung eine vorherige Aufreinigung der Proben mittels präparativer HPLC notwendig gewesen, da sonst der Melatoninderivat-Peak nicht freigestellt werden konnte.

Probleme bei der Anwendung dieser Methode bereiteten allerdings noch die Kalibrierungen. Obwohl die erstellten Eichgeraden sich durch einen linearen Verlauf auszeichneten, wurden zwischen verschiedenen Messreihen deutliche Unterschiede festgestellt. Die beobachteten Divergenzen zwischen direkter Eichung und Eichung nach HPLC-Fraktionierung deuten darauf hin, dass die Umsetzung zu dem o.g. Melatoninderivat nicht vollständig erfolgte. Hierfür spricht auch die geringere Steigerung der Fluoreszenzintensität durch die Derivatisierung als von TOMITA *et al.* (2003) beschrieben. Durch Verunreinigungen der Ansätze, z.B. durch Spuren von Übergangsmetallen wie Kupfer- oder Eisenionen, könnte es durch eine Fenton-Reaktion zur Bildung von Hydroxylradikalen und einer Umsetzung des Melatonins zu zyklischem 3-Hydroxymelatonin gekommen sein (CHEVION *et al.*, 1988; TAN *et al.*, 1998). Darüber hinaus wurde die Oxidation von Melatonin zu AFMK durch Carbonat-Radikale in einem H₂O₂-basierten System beschrieben (HARDELAND *et al.*, 2003). Ein Teil des Melatonins könnte bereits reagiert haben, bevor durch Erhöhung der Temperatur die Derivatisierung eingeleitet wurde. Bei zukünftigen Messungen könnten diese Probleme ggf. durch Verwendung eines internen Standards wie Methoxyindolessigsäure (MIAA) besser erfasst und kontrolliert werden, da dieser Tryptophanmetabolit ebenfalls bei den verwendeten Bedingungen derivatisiert wird und zusammen mit dem Melatoninderivat mittels HPLC-FD quantifiziert werden kann (TOMITA *et al.*, 2003). Voraussetzung für eine aussagekräftige Erfassung der relativen Umsetzungsrate wäre eine

Korrelation zwischen der Oxidation der Methoxyindolessigsäure und der des Melatonins.

Bislang waren für die Aufreinigung der Extrakte und für die Quantifizierungen des Melatoninderivats noch zwei geringfügig unterschiedliche HPLC-Systeme notwendig, die sich in der Zusammensetzung des Eluenten und in der Hauptsäule unterschieden. IINUMA *et al.* (1999) konnten während einer Lagerung über 10 Tage bei 4°C unter Lichtausschluss keine Verluste des Melatoninderivats beobachten. Aufgrund der hohen Stabilität der Substanz wäre auch ein periodisches Wechseln zwischen präparativem und analytischem System durch Austausch von Eluent und Hauptsäule vorstellbar.

Die Integration beider Funktionen in einem System ist Ziel weiterer Arbeiten. Da die Fluoreszenzintensitäten in einem 20%-igen Methanol/Wasser-Gemisch nur geringfügig niedriger sind als in einem Gemisch aus 10% Acetonitril und 90% Wasser (TOMITA *et al.*, 2003), sollte auch die Verwendung eines Methanol-Wasser-basierten Eluenten für die Quantifizierung des Melatoninderivats möglich sein.

Bestimmungen des Melatoningehalts mit zwei unabhängigen Methoden sollten, wie dies für *Lingulodinium polyedrum* und *Chenopodium rubrum* demonstriert werden konnte, zu identischen Ergebnissen führen (POEGGELER *et al.*, 1991; KOLÁŘ *et al.*, 1997; HARDELAND & POEGGELER, 2003).

Die sehr gute Korrelation paralleler Quantifizierungen des Melatoningehalts HPLC-aufgereinigter Extrakte durch ELISA und HPLC nach Vorsäulenderivatisierung stellt das entscheidende Kriterium für eine Absicherung gegen falsch-positive Ergebnisse dar. Die beobachteten und vergleichsweise geringen Unterschiede zwischen den Quantifizierungen durch beide Methoden waren möglicherweise auf Kalibrierungsfehler zurückzuführen. Die breite und artübergreifende Anwendbarkeit der vorgestellten Methoden wurde durch parallele Bestimmungen des Melatoningehalts an jeweils einer Rot-, Grün- und Braunalgenart (*Porphyra*, *Ulva*, *Laminaria*) sowie an Früchten von *Lycopersicon* demonstriert.

Sowohl die ELISA- als auch die HPLC-Messungen des Melatoninderivats zeichnen sich durch eine sehr hohe Empfindlichkeit aus und konnten in Kombination mit der HPLC-Fraktionierung für die Bestimmung von Melatonin an pflanzlichem Material eingesetzt werden. Mit einer unteren Quantifizierungsgrenze von etwa $2 \text{ pg} \cdot \text{g}^{-1}$ Frischgewicht sind die vorgestellten Methoden ausreichend empfindlich, um auch an Arten mit einem sehr niedrigen Melatoningehalt wie beispielsweise bei den untersuchten Makroalgenarten oder *Chenopodium rubrum* (Tagwerte; KOLÁŘ *et al.*, 1997; WOLF *et al.*, 2001) sichere Quantifizierungen des Melatoningehalts durchzuführen. Auf der biologischen Matrix erstellte Eichungen zeigten einen linearen Verlauf und die Wiederfindungsraten für zu Beginn der Extraktion zugesetzten Melatoninstandard waren mit Werten zwischen 60 und 80% weitgehend unabhängig von der verwendeten Quantifizierungsmethode und der untersuchten Art.

Vergleichende Untersuchungen zur Extraktion von Melatonin an *Lingulodinium polyedrum* zeigten große Unterschiede bezüglich der

Wiederfindungsrate und der Extraktionseffizienz in Abhängigkeit von dem verwendeten Lösungsmittel (POEGGELER & HARDELAND, 1994). Dagegen war der immunologisch ermittelte Melatoningehalt hochdruckflüssigkeitschromatographisch aufgereinigter Extrakte verschiedener Makroalgenarten weitgehend unabhängig von der verwendeten Extraktionsmethode. Die Extraktionseffizienz der miteinander verglichenen Methoden für Melatonin war vergleichbar hoch. Nur wenn die Extrakte ohne vorherige HPLC-Aufreinigung in den ELISA eingesetzt wurden, konnten deutliche Unterschiede der Melatonin-Immunoreaktivität zwischen den verwendeten Extraktionsmethoden mit Perchlorsäure, Aceton oder Ether beobachtet werden. Diese Unterschiede deuten auf eine unterschiedliche Extraktionseffizienz für Substanzen hin, die bei immunologischer Quantifizierung durch Kreuzreaktivitäten zu einer Überbewertung des Melatoningehalts führen. PCA-extrahierte Proben zeigten in nicht-aufgereinigten Extrakten die höchste Melatonin-Immunoreaktivität und auch bei Acetonextrakten war die apparente Melatoninkonzentration im Vergleich zu den HPLC-aufgereinigten Extrakten erhöht. Lediglich Proben, die mit einer Ether-basierten Extraktion nach DUBBELS *et al.* (1995) aufgearbeitet wurden, zeigten keine Unterschiede der Melatonin-Immunoreaktivität zwischen HPLC-aufgereinigten und direkten ELISA-Quantifizierungen. Diese Extraktionsmethode war daher selektiver für Melatonin, was sich auch in einem relativ flachen Profil des Chromatogramms direkter HPLC-Messungen im Vergleich zu den PCA- und Acetonextrakten widerspiegelt.

Da mit sehr unterschiedlichen Extraktionsmethoden weitgehend identische Melatoninkonzentrationen ermittelt werden konnten und die Unterschiede zwischen den einzelnen Proben mit allen Methoden herausgestellt wurden, erscheint es unwahrscheinlich, dass z.B. durch radikalische Interaktion eine Zerstörung von einem großen Anteil des enthaltenen Melatonins während der Extraktion erfolgte und die ermittelten Werte extreme Unterbewertungen darstellen. Die hohen Wiederfindungsraten für Melatoninstandard, welcher zu Beginn der Extraktion zugegeben wurde, sprechen ebenfalls gegen eine hohe Destruktionsrate während der Extraktion, wenngleich Wiederfindungsraten, welche durch externe Zugabe von Melatonin bestimmt wurden, nur bedingt Aussagen über eine mögliche Zerstörung innerhalb des Gewebes zulassen.

Der Melatoningehalt der untersuchten Makroalgenarten war mit Werten von unter $50 \text{ pg} \cdot \text{g}^{-1}$ relativ gering. In einer vorangegangenen Untersuchung an *Pterygophora californica* wurde ein deutlich höherer Melatoningehalt von etwa $15 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ (FG) beobachtet (FUHRBERG *et al.*, 1996), während in der vorliegenden Arbeit die gemessenen Werte für Makroalgen im Bereich der unteren Quantifizierungsgrenze von wenigen $\text{pg} \cdot \text{g}^{-1}$ (FG) lagen. Da FUHRBERG *et al.* (1996) neben Quantifizierungen mittels HPLC-ECD die Messwerte auch immunologisch durch RIA-Bestimmungen absicherten, dürften die höheren Werte nicht auf methodische Messfehler oder Überbewertungen durch Cochromatographie oder Kreuzreaktivitäten zurückzuführen sein. Auch für *Zingiber officinale* (Ingwer) wurden in verschiedenen Publikationen sehr unterschiedliche Melatoningehalte beschrieben. Nachdem zunächst ein Melatoningehalt von $584 \text{ pg} \cdot \text{g}^{-1}$ (FG) für Ingwer gemessen wurde (HATTORI *et al.*, 1995), konnten in späteren Untersuchungen trotz einer sehr niedrigen Nachweisgrenze lediglich Spuren von Melatonin nachgewiesen werden (VAN TASSEL & O'NEILL, 2001). In einer dritten Untersuchung wurden wieder deutlich

höhere Konzentrationen beobachtet ($1,4 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$; BADIRA, 2002). Möglicherweise führten selten auftretende physiologische Zustände zu Extremgehalten an Melatonin (s.u.).

Versuche, den Melatoningehalt von Extrakten verschiedener Makroalgenarten direkt ohne eine vorherige HPLC-Aufreinigung zu bestimmen, führten häufig zu Überbewertungen aufgrund von Kreuzreaktivitäten (ELISA) oder Coelution (HPLC). Diese Beobachtungen bestätigen die Warnungen verschiedener Autoren vor diesen Risiken (CASSONE & NATESAN, 1997; VAN TASSEL & O'NEILL, 2001) und bisherige Veröffentlichungen von Daten, deren Quantifizierungen lediglich auf HPLC oder einer immunologischen (RIA oder ELISA) Methode basieren, sollten überprüft werden.

Bei *Saccharomyces cerevisiae* war der Melatoningehalt stark von der Verfügbarkeit von Vorstufen der Melatoninbiosynthese abhängig (SPRENGER *et al.*, 1999). Während der Melatoningehalt von Hefezellen, deren Nährlösung durch ein Salzmedium ersetzt worden war, unterhalb der Nachweisgrenze der HPLC-ECD-Messungen lag, konnten nach Zugabe von Tryptophan, Serotonin oder

N-Acetylserotonin Melatoninkonzentrationen von mehreren $\text{ng} \cdot \text{mg}^{-1}$ Protein beobachtet werden. In einem Vollmedium gewachsene Zellen wiesen einen Melatoningehalt in einer vergleichbaren Größenordnung auf (SPRENGER *et al.*, 1999). Auch die beobachteten Unterschiede im Melatoningehalt von *Pterygophora californica* könnten auf eine unterschiedliche Zusammensetzung des Mediums zurückzuführen sein. Während für die erste Untersuchung die Hälterung der Algenhalli in einer statischen Kultur in Provasoli-angereichertem Seewasser (PES; STARR & ZEIKUS, 1987) erfolgte (FUHRBERG *et al.*, 1996; FUHRBERG, 1997), wurde für die vorliegende Untersuchung ein Durchflusstank verwendet und es wurden lediglich Nährstoffe in Form von Ammoniumnitrat sowie di-Ammoniumhydrogenphosphat zugegeben (BIDWELL *et al.*, 1985). Auch könnte die Synthese von derart großen Melatoninmengen konditional als Reaktion auf weitere bisher nicht mit der Melatonsynthese in Verbindung gebrachte biotische oder abiotische Faktoren erfolgt sein.

Für die untersuchten Tomatenproben wurde mit beiden Quantifizierungsmethoden ein Melatoningehalt von etwa $100 \text{ pg} \cdot \text{g}^{-1}$ (FG) ermittelt. In bisherigen Untersuchungen wurden Werte zwischen 2 und $500 \text{ pg} \cdot \text{g}^{-1}$ (FG) bestimmt (DUBBELS *et al.*, 1995; HATTORI *et al.*, 1995; VAN TASSEL *et al.*, 2001) und es konnte eine Zunahme des Melatoningehalts mit zunehmendem Reifungsgrad beobachtet werden (VAN TASSEL *et al.*, 2001). Neben einer Abhängigkeit des Melatoningehalts von der Tomaten-Sorte (DUBBELS *et al.*, 1995; VAN TASSEL *et al.*, 2001) könnten die großen Unterschiede davon abhängen, ob bei den Untersuchungen auch die Samen mit extrahiert wurden sind oder diese zuvor entfernt wurden. In Samen zahlreicher höherer Pflanzen wurden sehr hohe Melatoninkonzentrationen beobachtet (MANCHESTER *et al.*, 2000) und es ist wahrscheinlich, dass auch Tomatensamen einen höheren Melatoningehalt aufweisen als das Fruchtfleisch.

Trotz der geringen beobachteten Melatoninkonzentrationen in den untersuchten Rot-, Grün- und Braunalgen untermauern die Beobachtungen bisherige Hypothesen über eine ubiquitäre Verbreitung des Indolamins im Tier- und Pflanzenreich (HARDELAND & FUHRBERG, 1996).

Aussagen über eine mögliche physiologische Funktion der Substanz bei den untersuchten Makroalgenarten sind jedoch aufgrund der geringen Konzentrationen und dem weitgehenden Fehlen einer Modulation des Melatoningehalts kaum möglich.

Eine signifikante Variation der Melatoninkonzentration parallel zur diurnalen Lichtexposition konnte lediglich in einer Messreihe an *Porphyra* beobachtet werden, jedoch konnte diese Beobachtung nicht reproduziert werden. Auch bei einer

24-Stunden-Messreihe an dieser Art konnten keine Hinweise für einen diurnalen Rhythmus beobachtet werden und weitere Tag/Nacht-Vergleiche an diversen Arten zeigten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede des Melatoningehalts. Auch bei früheren Untersuchungen an *Pterygophora californica* konnten keine erhöhten Konzentrationen des Indolamins während der Nacht beobachtet werden (FUHRBERG, 1997).

Obwohl ein ausgeprägter Rhythmus der Melatoninkonzentration an den untersuchten Algenarten nicht nachgewiesen werden konnte, kann eine Funktion als photoperiodische Signalsubstanz nicht ausgeschlossen werden. Es ist vorstellbar, dass die Ausbildung eines Melatoninrhythmus auf einen engen permissiven Bereich abiotischer und biotischer Faktoren beschränkt ist oder durch das Fehlen von Synthesestufen verhindert war. Auch ist es möglich, dass während der Tag/Nacht-Vergleiche sowie bei Probennahme-Intervallen von 3 Stunden ein Anstieg des Melatoningehalts aufgrund der geringen zeitlichen Auflösung nicht erfasst wurde. Bei *Chenopodium rubrum* dauerte der nächtliche Anstieg des Melatoningehalts zwischen 4 und 6 Stunden und hätte teilweise von einer einzelnen Probennahme in der Mitte der Scotophase nicht erfasst werden können (KOLÁŘ *et al.*, 1997; WOLF *et al.*, 2001).

Die weite Verbreitung von Melatonin und die Tatsache, dass dessen Funktion als Antioxidanz und Radikalfänger artunabhängig ist, führten zu der Hypothese, dass der Schutz vor oxidativem Stress unter evolutiven Gesichtspunkten die primäre Funktion des Indolamins darstellt (HARDELAND *et al.*, 1995). Diese These wurde durch Beobachtungen relativ hoher Melatoninkonzentrationen in zahlreichen phylogenetisch ursprünglichen Organismen unterstützt (MANCHESTER *et al.*, 1995; HARDELAND *et al.*, 1996; SPRENGER *et al.*, 1999). In *Lingulodinium polyedrum* schützten sehr hohe, aber physiologisch mögliche Melatoninkonzentration vor sonst letalen oxidativen Stress (ANTOLÍN & HARDELAND, 1997; ANTOLÍN *et al.*, 1997). Für eine Funktion von Melatonin als Antioxidanz und Radikalfänger in marinen Makroalgen sind die beobachteten Konzentrationen jedoch sehr gering. Auch wenn Aussagen über die Verteilung des Melatonins in den Zellen problematisch und Angaben zu den tatsächlich auftretenden physiologischen Konzentrationen daher kaum möglich sind (MENENDEZ-PELAEZ & REITER, 1993; HARDELAND & PÖGGELER, 2003), wird Melatonin in den beobachteten Konzentrationen in Makroalgen nur eine untergeordnete Bedeutung beim Schutz vor oxidativem Stress zukommen.

Da weder die Messung von Metaboliten der Interaktion von Melatonin mit freien Radikalen erfolgte, noch Enzymaktivitäten des Melatoninstoffwechsels bestimmt wurden, sind nur bedingt Aussagen über die Synthese- und

Destruktionsraten von Melatonin möglich und für eine vollständige Bewertung bedarf es weiterer Untersuchungen.

Vergleichbar einem Anstieg der Konzentration des Antioxidanz GSH in diversen höheren Pflanzen als Reaktion auf eine Temperaturabnahme (SMITH *et al.*, 1990), führte bei *Aloe vera* sowie *Hypericum perforatum* eine Abnahme der Temperatur von 25°C auf 4°C zu einem signifikanten Anstieg des Melatoningehalts (MANCHESTER *et al.*, unveröffentl. aus TAN *et al.*, 2000b). Der Anstieg des Melatonin- und GSH-Gehalts wurde als eine adaptive Schutzreaktion interpretiert (TAN *et al.*, 2000b).

Insbesondere die intertidalen Makroalgenarten *Porphyra* und *Ulva* sind einem ständigen Wechsel zwischen extremen Bedingungen ausgesetzt. Hierzu gehören osmotischer Stress durch Eintrocknung oder Niederschlag während des Trockenfallens, sowie extreme Temperaturschwankungen und Änderungen der Lichtexposition. Der Melatoningehalt dieser Arten unterschied sich jedoch nicht von Arten, die unter vergleichsweise konstanten Bedingungen gewachsen waren.

Eine Betrachtung von Melatonin als putatives Phytohormon nach den von JACOBS (1959) aufgestellten PESIGS-Regeln (*parallel variation, excision, substitution, isolation, generality, specificity*; s.u.) zeigt, dass bei höheren Pflanzen und Makroalgen bislang wenige der aufgestellten Kriterien erfüllt sind. Selbst die Schritte der Isolierung und der chemischen Identifizierung sind noch problematisch, wenngleich inzwischen in zahlreichen Untersuchungen das weit verbreitete Vorkommen von Melatonin mit ausreichender methodischer Sicherheit belegt werden konnte (*isolation*; KOLÁŘ *et al.*, 1997; FUHRBERG *et al.*, 1996; VAN TASSEL *et al.*, 2001; MURCH *et al.*, 1997, 2000). Lediglich bei *Chenopodium rubrum* konnte ein Zusammenhang zwischen der diurnalen Lichtexposition und dem Melatoningehalt beobachtet werden (*parallel variation*; KOLÁŘ *et al.*, 1997; WOLF *et al.*, 2001), während bei zahlreichen Untersuchungen weiterer Arten kein solcher Zusammenhang nachgewiesen werden konnte (FUHRBERG *et al.*, 1996; VAN TASSEL *et al.*, 2001; MANCHESTER *et al.*, unveröffentl. Daten aus MANCHESTER *et al.*, 2000). Die bislang in Applikationsversuchen beobachteten Auswirkungen von Melatonin bei *Pterygophora californica* auf die Wachstumsrate und bei *Chenopodium rubrum* auf die Blütenausbildung (*substitution*; FUHRBERG *et al.*, 1996; KOLÁŘ *et al.*, 1999) könnten auch durch Effekte von Melatonin auf das Zytoskelett durch die Bindung an Calmodulin erklärt werden (BENÍTEZ-KING & ANTÓN-TAY, 1993).

Auch die vorgestellten Methoden der Extraktion, Aufreinigung und Quantifizierung stellen keinen generellen Weg zur Bestimmung von Melatonin in phototrophen Organismen dar. Insbesondere die Extraktionsmethoden müssen dem zu untersuchenden Material angepasst und deren Extraktionseffizienz sowie deren Wiederfindungsraten ermittelt werden. Ebenso ist für die anschließenden Quantifizierungen eine intensive Validierung erforderlich, um falsch-positive Ergebnisse ausschließen zu können. Trotzdem bieten die vorgestellten Methoden zahlreiche Vorteile, um den Melatoningehalt in bisher nicht untersuchtem pflanzlichem Material zu ermitteln. Durch den hohen Grad der Aufreinigung des vorgestellten präparativen HPLC-Systems und der Möglichkeit paralleler, hochsensitiver Quantifizierungen des

Melatoningehalts der HPLC-Fractionen mittels ELISA und HPLC nach Vorsäulenderivatisierung konnte der Melatoningehalt von so unterschiedlichen Materialien wie diversen Makroalgenarten und Tomaten ermittelt werden.

Abschließend soll ein Methoden-Schema vorgestellt werden, das unter Verwendung der hier eingesetzten Extraktions- und Quantifizierungsmethoden Untersuchungen des Melatoningehalts an bisher nicht charakterisiertem pflanzlichem Material ermöglicht.

Durch Mörsern einer großen Probe des zu untersuchenden Materials in flüssigem Stickstoff kann ein homogenes Ausgangsmaterial geschaffen werden. Der Melatoningehalt einer derartig vorgemörserten Probe erwies sich bei Lagerung bei -80°C unter Lichtausschluss über einen Zeitraum von 2 Wochen als stabil. Anschließend sollte die Probe mit verschiedenen Extraktionsmethoden aufgearbeitet werden. Neben den vorgestellten Extraktionsmethoden mit Perchlorsäure, Aceton und Ether sollte auch eine Extraktion auf Methanol- oder Ethanol-Basis eingesetzt werden, da diese sich insbesondere für die Extraktion von lipidreichen Samen als geeignet erwies (MANCHESTER *et al.*, 2000). Nach anschließender Aufreinigung der Extrakte mittels präparativer HPLC kann durch ELISA-Bestimmungen die Immunoreaktivität für Melatonin in der entsprechenden Fraktion bestimmt werden. Die Extraktionsmethode, bei welcher der höchste (apparente) Melatoningehalt im ELISA ermittelt wurde, sollte in weiteren Versuchen auf eine mögliche Korrelation des mittels ELISA und HPLC nach Vorsäulenderivatisierung ermittelten Melatoningehalts geprüft werden. Parallel dazu sollten Proben vor Beginn der Aufarbeitung und Extraktion mit Melatoninstandard versetzt und die Wiederfindungsrate bestimmt werden. Sofern der mit den beiden Methoden ermittelte Melatoningehalt weitgehend identisch ist, sind bereits die sonst schwierige Auswahl der effizientesten Extraktionsmethode sowie eine erste Validierung durch parallele Quantifizierung mit zwei unabhängigen Methoden erreicht. Stimmt der mit den Methoden ELISA und HPLC nach Vorsäulenderivatisierung ermittelte Melatoningehalt nicht überein, da in dem HPLC-fraktionierten Extrakt noch Substanzen enthalten sind, die mit den Quantifizierungen interferieren, kann entweder auf die Extraktionsmethode mit der nächstniedrigeren Immunoreaktivität in der Melatoninfraktion ausgewichen werden oder es kann versucht werden, durch Änderung der Chromatographiebedingungen des präparativen Systems eine Abtrennung der störenden Substanzen zu erreichen.

Auf diese Weise sollte es mit einem vergleichsweise geringen Arbeitsaufwand und relativ hohen Probendurchsatz möglich sein, für eine Vielzahl weiterer phototropher Organismen den Melatoningehalt zu bestimmen. Eine schnelle, zuverlässige und möglichst artübergreifend anwendbare Quantifizierungsmethode für Melatonin in höheren Pflanzen und Algen stellt eine wichtige Voraussetzung für die Evaluierung von Melatonin als putatives Phytohormon dar und könnte dazu beitragen, dessen physiologische Funktion in phototrophen Organismen aufzuklären.

7 Literaturverzeichnis

- Abran D, Anctil M, Ali MA, 1994: Melatonin activity rhythms in eyes and cerebral ganglia of *Aplysia californica*. Gen. Comp. Endocrinol. 96, 215-222.
- Antolín I, Hardeland R, 1997: Suppression of the *Gonyaulax* glow peak by paraquat and its restoration by melatonin. In: Hardeland R (ed.), Biological Rhythms and Antioxidative Protection. Cuvillier, Göttingen, pp. 86-97.
- Antolín I, Obst B, Burkhardt S, Hardeland R, 1997: Antioxidative protection in a high melatonin organism: The dinoflagellate *Gonyaulax polyedra* is rescued from lethal oxidative stress by strongly elevated, but physiologically possible concentrations of melatonin. J. Pineal Res. 23, 182-190.
- Antolín I, Rodríguez C, Sáinz RM, Mayo JC, Uría H, Kotler ML, Rodríguez-Colunga MJ, Tolivia D, Menéndez-Peláez A, 1996: Neurohormone melatonin prevents cell damage: Effect on gene expression for antioxidant enzymes. FASEB J. 10, 882-890.
- Antón-Tay F, Martínez I, Tovar R, Benítez-King G, 1998: Modulation of subcellular distribution of calmodulin by melatonin in MDCK cells. J. Pineal Res. 24, 35-42.
- Arendt J, 1985: Mammalian pineal rhythms. Pineal Res. Rev. 3, 161-213.
- Arendt J, 1986: Role of the pineal gland and melatonin in seasonal functions in mammals. In: Clarke JR (ed.), Oxford reviews of reproductive biology, Vol. 8. Oxford University Press, Oxford, pp. 266-320.
- Arendt J, 1995: Biochemistry of the pineal. In: Arendt J (ed.), Melatonin and the Mammalian Pineal Gland. Chapman & Hall, London, pp. 27-65.
- Asada K, Takahashi M, 1987: Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. In: Kyle DJ, Osmond CB, and Arntzen CJ (eds.), Topics in photosynthesis, Vol. 9: Photoinhibition. Elsevier, Amsterdam, pp. 227-287.

Asada K, 1994: Production and action of active oxygen in photosynthetic tissue. In: Foyer CH and Mullineaux PM (eds.), Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 77-104.

Axelrod J, 1974: The pineal gland: A neurochemical transducer. *Science* 184, 1341-1348.

Badira FA, 2002: Melatonin, serotonin, and tryptamine in some egyptian food and medicinal plants. *J. Med. Food* 5, 153-157.

Balzer I, Hardeland R, 1991: Photoperiodism and effects of indoleamines in a unicellular alga, *Gonyaulax polyedra*. *Science* 253, 795-797.

Balzer I, Hardeland R., 1992: Effects of indoleamines and short photoperiods on the encystment of *Gonyaulax polyedra*. *Chronobiol. Int.* 9, 260-265.

Balzer I, Hardeland R, 1993: Effects of short-days, melatonin and 5-methoxy-tryptamine in the marine alga, *Gonyaulax polyedra* (Gonyaulacaceae). In: Aldrich JC (ed.), Quantified Phenotypic Responses in Morphology and Physiology. (Proceedings of the twenty seventh European Marine Biology Symposium, Dublin, Ireland. 7-11th September, 1992) JAPAGA, Ashford, pp. 109-113.

Balzer I, Hardeland R, 1996: Melatonin in algae and higher plants - Possible new roles as a phytohormone and antioxidant. *Bot. Acta* 109, 180-183.

Banerjee S, Margulis L, 1973: Mitotic arrest by melatonin. *Exp. Cell. Res.* 78, 314-318.

Barlow-Walden LR, Reiter RJ, Abe M, Pablos MI, Menéndez-Peláez A, Chen L-D, Poeggeler B, 1995: Melatonin stimulates brain glutathione peroxidase activity. *Neurochem. Int.* 26, 497-502.

Bechgaard E, Lindhardt K, Martinsen L, 1998: High-performance liquid chromatographic analysis of melatonin in human plasma and rabbit serum with on-line column enrichment. *J. Chromatogr. B* 712, 177-181.

Literaturverzeichnis

- Benítez-King G, Antón-Tay F, 1993: Calmodulin mediates melatonin cytoskeletal effects. *Experientia* 49, 635-641.
- Benítez-King G, Huerto-Delgadillo L, Antón-Tay F , 1993: Binding of ³H-melatonin to calmodulin. *Life Sci.* 53, 201-207.
- Bettahi I, Pozo D, Osuna C, Reiter RJ, Acuña-Castroviejo D, Guerrero JM, 1996: Melatonin reduces nitric oxide synthase activity in rat hypothalamus. *J. Pineal Res.* 20, 205-210.
- Bidwell RGS, McLachlan J, Lloyd NDH, 1985: Tank Cultivation of Irish Moss, *Chondrus crispus* Stackh. *Bot. Mar.* 28, 87-97.
- Burkhardt S, Hardeland R, 1996: Circadian rhythmicity of tryptophan hydroxylase in the marine dinoflagellate *Gonyaulax polyedra* Stein and the role of tryptophan hydroxylation in bioluminescence. *Comp. Biochem. Physiol.* 115B, 411-416.
- Burkhardt S, Tan DX, Manchester LC, Hardeland R, Reiter RJ , 2001: Detection and quantification of the antioxidant melatonin in Montmorency and Balaton Tart Cherries (*Prunus cerasus*). *J. Agric. Food Chem.* 49, 4898-4902.
- Callebert J, Jaunay J-M, Jallon J-M, 1991: Control of *Drosophila* biorhythms. *Adv. Pineal Res.* 5, 81-84.
- Cassone VM, Natesan AK, 1997: Time and Time Again: The Phylogeny of Melatonin as a Transducer of Biological Time. *J. Biol. Rhythm.* 12, 489-497.
- Chanut W, Nguyen-Legros J, Versaux-Botteri C, Trouvin J-H, Launay J-M, 1998: Determination of melatonin in rat pineal, plasma and retina by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Chromatogr. B* 709, 11-18.
- Chen G, Huo Y, Tan D-X, Liang Z, Zhang W, Zhang Y, 2003: Melatonin in chinese medicinal herbs. *Life Sci.* 73, 19-26.

Chevion M, 1988: A site specific mechanism for free radical induced biological damage: The essential role of redox-active transition metals. *Free Radical Bio. Med.* 5, 27-37.

Collén J, Del Río MJ, García-Reina G, Pedersén M, 1995: Photosynthetic production of hydrogen peroxide by *Ulva rigida* C. Ag. (Chlorophyta). *Planta* 196, 225-230.

Costa EJ, Lopes RH, Lamy-Freund MT, 1995: Permeability of pure lipid bilayers to melatonin. *J. Pineal Res.* 19, 123-126.

Cumming BC, Seabrook JEA, 1985: In: Halevy AH (ed.), *Handbook of Flowering*. CRC Press, Boca Raton, Florida.

Dring MJ, 1984: Photoperiodism and phycolgy. *Progr. Phycol. Res.* 3, 159-192.

Dubbels R, Reiter RJ, Klenke E, Goebel A, Schnakenberg A, Ehlers C, Schiwara HW, Schloot W, 1995: Melatonin in edible plants identified by radioimmunoessay and by high performance liquid chromatography-mass spektrometry. *J. Pineal Res.* 18, 28-30.

Dubocovich ML, Benloucif S, Masana MI, 1996: Melatonin receptors in the mammalian suprachiasmatic nucleus. *Behav. Brain Res.* 73, 141-147.

Edwards BJ, Atkinson G, Waterhouse J, Reilly T, Godfrey R, Budgett R, 2000: Use of melatonin in recovery from jet-lag following an eastward flight across 10 time-zones. *Ergonomics* 43, 1501-1513.

Elstner EF, 1990: *Der Sauerstoff: Biochemie, Biologie, Medizin*. Bi-Wissenschaftsverlag, Mannheim.

Forman JF, Boveris A, 1982: Superoxide radical and hydrogen peroxide in mitochondria. In: Pryor WA (ed.), *Free Radicals in Biology*. Academic Press, London, pp. 65-90.

Fowler G, Daroszewska M, Ingold KU, 2003: Melatonin does not "directly scavenge hydrogen peroxide": demise of another myth. *Free Radical Bio. Med.* 34, 77-83.

Literaturverzeichnis

- Fuhrberg B, 1997: Melatonin und verwandte 5-Methoxyindole bei Einzellern und einfachen Vielzellern. Vergleichende Untersuchungen an Dinoflagellaten, Hefe und einer Phaeophyceae. Mechanismen der Cysteininduktion und der Integration photoperiodischer und Temperatursignale bei *Gonyaulax polyedra*. Cuvillier Verlag, Göttingen.
- Fuhrberg B, Balzer I, Hardeland R, Werner A, Lüning K, 1996: The vertebrate pineal hormone melatonin is produced by the brown alga *Pterygophora californica* and mimics dark effects on growth rate in the light. *Planta* 200, 125-131.
- Gassmann G, Müller DG, Fritz P, 1995: Pheromones in marine algae: a technical approach. *Helgoländer Meeresun.* 49, 797-804.
- Granbom M, Pedersén M, Kadel P, Lüning K, 2001: Circadian rhythm of photosynthetic oxygen evolution in *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta): Dependence of light quantity and quality. *J. Phycol.* 37, 1020-1025.
- Gwinner E, Hau M, Heigel S, 1994: Phase and tonic effects of melatonin on avian circadian systems. In: Hiroshige T and Honma K (eds.), *Evolution of circadian clock*. Hokkaido University Press, Sapporo, pp. 127-137.
- Halliwell B, Gutteridge JM, 1989: *Free Radicals in Biology and Medicine*. Clarendon Press, Oxford.
- Hamase K, Tomita T, Kiyomizu A, Kiyoshi Z, 2000: Determination of pineal melatonin by precolumn derivatization reversed-phase high-performance liquid chromatography and its application to the study of circadian rhythm in rats and mice. *Anal. Biochem.* 279, 106-110.
- Hardeland R, 1993: The presence and function of melatonin and structurally related indoleamines in a dinoflagellate, and a hypothesis on the evolutionary significance of these tryptophan metabolites in unicells. *Experientia* 49, 614-622.

Hardeland R, 1994: Melatonin and 5-methoxytryptamine did not mediate short day effects in the lemnaean species *Spirodela polyrhiza*, *Lemna minor* and *Lemna trisulca*. In: Hardeland R (ed.), Cell Biological Problems in Chronobiology. University of Göttingen, Göttingen, pp. 136-137.

Hardeland R, 1999: Melatonin and 5-methoxytryptamine in non-metazoans. *Reprod. Nutr. Dev.* 39, 399-408.

Hardeland R, Balzer I, Poeggeler B, Fuhrberg B, Uría H, Behrmann G, Wolf R, Meyer TJ, Reiter RJ, 1995: On the primary functions of melatonin in evolution: Mediation of photoperiodic signals in a unicell, photooxidation, and scavenging of free radicals. *J. Pineal Res.* 18, 104-111.

Hardeland R, Burkhardt S, 1997: On the restoration of the *Gonyaulax* glow peak following suppression of indolamine biosynthesis by inhibitors of tryptophan hydroxylase: an update. In: Hardeland R (ed.), Biological Rhythms and Antioxidative Protection. Cuvillier, Göttingen, pp. 78-85.

Hardeland R, Fuhrberg B, 1996: Ubiquitous melatonin - presence and effects in unicells, plants and animals. *Trends in Comparative Biochem. & Physiol.* 2, 25-45.

Hardeland R, Poeggeler B, 2003: Non-vertebrate melatonin. *J. Pineal Res.* 34, 233-241.

Hardeland R, Poeggeler B, Niebergall R, Zelosko V, 2003: Oxidation of melatonin by carbonate radicals and chemiluminescence emitted during pyrrole ring cleavage. *J. Pineal Res.* 34, 17-25.

Hardeland R, Reiter RJ, Poeggeler B, Tan D-X, 1993: The significance of the metabolism of the neurohormone melatonin: Antioxidative protection and formation of bioactive substances. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 17, 347-357.

Hardeland R, Rodríguez C, 1995: Versatile melatonin: A pervasive molecule serves various functions in signaling and protection. *Chronobiol. Int.* 12, 157-165.

Literaturverzeichnis

Harumi T, Akutsu H, Matsushima S, 1996: Simultaneous determination of serotonin, N-acetylserotonin and melatonin in the pineal gland of the juvenile golden hamster by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Chromatogr. B* 675, 152-156.

Harumi T, Matsushima S, 2000: Separation and assay methods for melatonin and its precursors. *J. Chromatogr. B* 747, 95-110.

Hattori A, Migitaka H, Iigo M, Itho M, Yamamoto K, Ohtani-Kaneko R, Hara M, Suzuki T, Reiter RJ, 1995: Identification of Melatonin in Plants and its Effects on Plasma Melatonin Levels and Binding to Melatonin Receptors in Vertebrates. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 35, 627-634.

Horgan R, 1981: Modern methods for the quantitative analysis of plant hormones. In: Davies PJ (ed.), *Progress in Phytochemistry*. Nijhoff, Dordrecht, pp. 222-239.

Huether G, 1993: The contribution of extrapineal sites of melatonin synthesis to circulating melatonin levels in higher vertebrates. *Experientia* 49, 665-670.

Ianas O, Olenescu R, Badescu I, 1991: Melatonin involvement in oxidative stress. *Rom. J. Endocrinol.* 29, 147-153.

Iinuma F, Hamase K, Matsubayashi S, Takahashi M, Watanabe M, Zaito K, 1999: Sensitive determination of melatonin by precolumn derivatization and reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 835, 67-72.

Itoh MT, Hattori A, Nomura T, Sumi Y, Suzuki T, 1995: Melatonin and arylalkylamine N-acetyltransferase activity in the silkworm, *Bombyx mori*. *Mol. Cell. Endocr.* 115, 59-64.

Jackson WT, 1969: Regulation of mitosis. II. Interaction of isopropyl N-phenyl-carbamate and melatonin. *J. Cell. Sci.* 5, 745-755.

Jacobs WP, 1959: What substance normally controls a given biological process? I. Formulation of some rules. *Dev. Biol.* 1, 527-533.

- Jacobsen S, Lüning K, Goulard F, 2003: Circadian changes in the relative abundance of two photosynthetic transcripts in the marine macroalga *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta). *J. Phycol.* 39, 888-896
- Klein DC, Weller JL, 1970: Indole metabolism in the pineal gland, a circadian rhythm in N-acetyltransferase. *Science* 169, 1093-1095.
- Kolář J, Johnson CH, Macháčková I, 1999: Presence and Possible Role of Melatonin in a Short-Day Flowering Plant, *Chenopodium rubrum*. *Adv. Exp. Med. Biol.* 460, 391-393.
- Kolář J, Macháčková I, Eder J, Prinsen E, von Dongen W, van Onckelen H, Illnerová H, 1997: Melatonin: Occurrence and daily rhythm in *Chenopodium rubrum*. *Phytochemistry* 44, 1407-1413.
- Lerner AB, Case JD, Heinzelman RV, 1959: Structure of melatonin. *J. Am. Chem. Soc.* 81, 6084-6087.
- Lerner AB, Case JD, Takahashi Y, Lee TH, Mori W, 1958: Isolation of melatonin, the pineal factor that lightens melanoocytes. *J. Am. Chem. Soc.* 80, 2587.
- Lüning K, 1990: Seaweeds. Their environment, biogeography, and ecophysiology. Wiley, New York.
- Lüning K, 1991: Circannual growth rhythm in a brown alga, *Pterygophora californica*. *Bot. Acta* 104, 157-162.
- Lüning K, 1992: Day and night kinetics of growth rate in green, brown, and red seaweeds. *J. Phycol.* 28, 794-803.
- Lüning K, 1994: Circadian growth rhythm in juvenile sporophytes of Laminariales (Phaeophyta). *J. Phycol.* 30, 190-199.
- Maestroni GJM, Conti A, 1990: The pineal neurohormone melatonin stimulates activated CD4⁺, Thy-1⁺ cells to release opioid agonist(s) with immunoenhancing and anti-stress properties. *J. Neuroimmunol.* 28, 167-176.

Literaturverzeichnis

- Manchester LC, Poeggeler B, Alvares FL, Ogden GB, Reiter RJ, 1995: Melatonin immunoreactivity in the photosynthetic prokaryote *Rhodospirillum rubrum*: implications for an ancient antioxidant system. *Cell. Mol. Biol. Res.* **41**, 391-395.
- Manchester LC, Tan D-X, Reiter RJ, Park W, Monis K, Qi W, 2000: High levels of melatonin in the seeds of edible plants: Possible function in germ tissue protection. *Life Sci.* **67**, 3023-3029.
- Menendez-Pelaez A, Reiter RJ, 1993: Distribution of melatonin in mammalian tissues: The relative importance of nuclear versus cytosolic localization. *J. Pineal Res.* **15**, 59-69.
- Moffat AS, 1995: Plants proving their worth in toxic metal cleanup. *Science* **269**, 302-303.
- Morrey KM, McLachlan JA, Serkin CD, Bakouche O, 1994: Activation of human monocytes by the pineal hormone melatonin. *J. Immunol.* **153**, 2671-2680.
- Murch SJ, Cambell SSB, Saxena PK, 2001: The role of serotonin and melatonin in plant morphogenesis: regulation of auxin-induced root organogenesis in *in vitro*-cultured explants of St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L.). *In Vitro Cell. Dev.-Pl.* **37**, 786-793.
- Murch SJ, KrishnaRaj S, Saxena PK, 2000: Tryptophan is a precursor for melatonin and serotonin biosynthesis in *in vitro* regenerated St. John's wort (*Hypericum perforatum* L. cv. Anthos) plants. *Plant Cell Rep.* **19**, 698-704.
- Murch SJ, Saxena PK, 2002: Mammalian neurohormones: potential significance in reproductive physiology of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.). *Naturwissenschaften* **89**, 555-560.
- Murch SJ, Simmons CB, Saxena PK, 1997: Melatonin in feverfew and other medicinal plants. *Lancet* **350**, 1598-1599.
- Namboodiri MAA, Dubbels R, Klein DC, 1987: Arylalkylamine N-acetyltransferase from mammalian pineal gland. *Meth. Enzymology* **142**, 583-590.

Pablos MI, Agapito MT, Gutierrez R, Recio JM, Reiter RJ, Barlow-Walden LR, Acuña-Castroviejo D, 1995: Melatonin stimulates the activity of the detoxifying enzyme glutathione peroxidase in several tissues of chicks. *J. Pineal Res.* **19**, 111-115.

Pengelly WL, 1985: Validation of immunoassays. In: Bopp M (ed.), *Plant growth substances*. Springer Verlag, Berlin, pp. 35-43.

Peniston-Bird JF, Di W-L, Street CA, Kadva A, Stalteri MA, Silman RE 1993: HPLC assay of melatonin in plasma with fluorescence detection. *Clin. Chem.* **39**, 2242-2247.

Poeggeler B, 1992: Vergleichende Untersuchungen über Melatonin und strukturverwandte Thyptophanmetabolite; Zur Rolle von Melatonin und 5-Methoxythiptamin bei einem Dinoflagellaten, *Gonyaulax polyedrea*, sowie pinealen und extrapinealen 5-methoxylierten Indolaminen bei Vertebraten. Dissertation, Universität Göttingen.

Poeggeler B, Balzer I, Hardeland R, Lerchl. A., 1991: Pineal hormone melatonin oscillates also in the dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*. *Naturwissenschaften* **78**, 268-269.

Poeggeler B, Hardeland R, 1994: Detection and quantification of melatonin in a dinoflagellate, *Gonyaulax polyedra*: Solutions to the problem of methoxyindole destruction in non-vertebrate material. *J. Pineal Res.* **17**, 1-10.

Poeggeler B, Reiter RJ, Tan D-X, Chen L-D, Manchester LC, 1993: Melatonin, hydroxyl radical-mediated oxidative damage, and aging: A hypothesis. *J. Pineal Res.* **14**, 151-168.

Pozo D, Reiter RJ, Calvo JR, Guerrero JM, 1994: Physiological concentrations of melatonin inhibit nitric oxide synthase in rat cerebellum. *Life Sci.* **55**, 455-460.

Pévet P, Vivien-Roels B, Masson-Pévet M, 1991: Annual changes in the daily pattern of melatonin synthesis and release. In: Fraschini F and Reiter RJ (eds.), *Role of Melatonin and Pineal Peptides in Neuromodulation*. Plenum Press, New York, pp. 147-157.

Literaturverzeichnis

Quay WB, 1963a: Circadian rhythm in rat pinal serotonin and its modification by estrous cycle and photoperiod. *Gen. Comp. Endocr.* 3, 473-479.

Quay WB, 1963b: Differential spectrofluorometric measurements of diverse 5-hydroxy- and 5-methoxyindoles. *Anal. Biochem.* 5, 51-59.

Raynaud F, Pévet P, 1991: Determination of 5-methoxyindoles in pineal gland and plasma samples by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Chromatogr.* 564, 103-116.

Reiter RJ, 1991a: Melatonin: The chemical expression of darkness. *Mol. Cell. Endocr.* 79, C153-C159.

Reiter RJ, 1991b: Pineal melatonin: Cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr. Rev.* 12, 151-180.

Reiter RJ, 1991c: Pineal gland: Interface between the photoperiodic environment and the endocrine system. *Trends Endocrinol. Metab.* 2, 13-49.

Reiter RJ, 1993: The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. *Experientia* 49, 654-664.

Reppert SM, Godson C, Mahle CD, Weaver DR, Slaugenhaupt SA, Gusella JF, 1995: Molecular characterization of a second melatonin receptor in human retina and brain: the Mel_{1b}-melatonin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 8734-8738.

Reppert SM, Weaver DR, Ebisawa T, 1994: Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron* 13, 1177-1185.

Rivkees SA, Carlson LL, Reppert SM, 1989: Guanine nucleotide-binding protein regulation of melatonin receptors in lizard brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 3882-3885.

Rolčík J, Lenobel R, Siglerova V, Strnad M, 2002: Isolation of melatonin by immunoaffinity chromatography. *J. Chromatogr. B* 775, 9-15.

Sachs L, 2002: Angewandte Statistik. 10. Auflage, Springer Verlag, Berlin.

Shida CS, Castrucci AML, Lamy-Freund MT, 1994: High melatonin solubility in aqueous medium. *J. Pineal Res.* 16, 198-201.

Skene DJ, Pévet P, Vivien-Roels B, Masson-Pévet M, Arendt J, 1986: Effect of different photoperiods on concentrations of 5-methoxytryptamine and melatonin in the pineal gland of the Syrian hamster. *J. Endocrinol.* 114, 301-309.

Skene DJ, 1996: Use of melatonin in circadian rhythm disorders and following phase shifts. *Acta Neurobiol. Exp.* 56, 359-362.

Smith LK, Polle A, Rennenberg H, 1990: Glutathione. In: Alscher RG and Cumming JR (eds.), *Stress Response in Plants: Adaptation and Acclimation Mechanisms*. Wiley-Liss, New York, pp. 201-217.

Sprenger J, Hardeland R, Fuhrberg B, Han S-Z, 1999: Melatonin and other 5-methoxylated indoles in yeast: Presence in high concentrations and dependence on tryptophan availability. *Cytologia* 64, 209-213.

Starr RC, Zeikus JA, 1987: UTEX - The culture collection of algae at the University of Texas at Austin. *J. Phycol.* 23 (suppl.), 1-47.

Tan D-X, Chen LD, Poeggeler B, Manchester LC, Reiter RJ, 1993: Melatonin: A potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocr. J.* 1, 57-60.

Tan D-X, Manchester LC, Reiter RJ, Plummer BF, Hardies LJ, Weintraub ST, Vijayalaxmi, Shepherd AMM, 1998: A novel melatonin metabolite, cyclic 3-hydroxymelatonin: a biomarker of *in vivo* hydroxyl radical generation. *Biochem. and Bioph. Res. Co.* 253, 614-620.

Tan D-X, Manchester LC, Reiter RJ, Plummer B.F., Limson J, Weintraub ST, Qi W, 2000a: Melatonin directly scavenges hydrogen peroxide: a potentially new metabolic pathway of melatonin biotransformation. *Free Radical Bio. Med.* 29, 1177-1185.

Literaturverzeichnis

- Tan D-X, Manchester LC, Reiter RJ, Qi W-B, Karbownik M, Calvo JR, 2000b: Significance of melatonin in antioxidative defense system: Reactions and products. *Biol. Signals Recept.* *9*, 137-159.
- Thoresen TS, 1978: Radioimmunoassay for melatonin in human serum. *Scand. J. clin. Lab. Invest.* *38*, 687-692.
- Tilden AR, Becker MA, Amma LL, Arciniega J, McGaw AK, 1997: Melatonin production in an aerobic photosynthetic bacterium: An evolutionary early association with darkness. *J. Pineal Res.* *22*, 102-106.
- Tomita T, Hamase K, Hayashi H, Fukuda H, Hirano J, Zaitso K, 2003: Determination of endogenous melatonin in the individual pineal glands of inbred mice using precolumn oxidation reversed-phase micro-high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* *316*, 154-161.
- Tosini G, Menaker M, 1995: Melatonin release by cultured parietal eye, pineal and retina in *Iguana iguana*. *Physiologist* *38*, A-25.
- Tosini G, Menaker M, 1998: Multiosciatory circadian organisation in a vertebrate, *Iguana iguana*. *J. Neurosci.* *18*, 1105-1114.
- Turjanski AG, Leonik F, Estrin DA, Rosenstein RE, Doctorovich F, 2000: Scavenging of NO by melatonin. *J. Am. Chem. Soc.* *122*, 10468-10469.
- Turjanski AG, Rosenstein RE, Estrin DA, 1998: Reactions of melatonin and related indoles with free radicals. A computational study. *J. Med. Chem.* *41*, 384-389.
- Udenfriend S, Lovenberg W, Sjoerdsma A, 1959: Physiologically active amines in common fruits and vegetables. *Arch. Biochem. Biophys.* *85*, 487-490.
- Urata Y, Honma S, Goto S, Todoroki S, Iida T, Cho S, Honma K, Kondo T, 1999: Melatonin induces g-glytamylcysteine synthetase mediated by activator protein-1 in human vascular endothelial cells. *Free Radical Bio. Med.* *27*, 838-847.

Uría H, Hardeland R, Menéndez-Peláez A, Fuhrberg B, 1995: Extracts of the Syrian hamster Harderian gland catalyse photooxidation of melatonin. In: Hardeland R (ed.), Cellular Rhythms and Indoleamines. University of Göttingen Göttingen, pp. 140-144.

Van Tassel DL, O'Neill SD, 2001: Putative regulatory molecules in plants: evaluating melatonin. J. Pineal Res. 31, 1-7.

Van Tassel DL, Roberts N, Lewy A, O'Neill SD, 2001: Melatonin in plant organs. J. Pineal Res. 31, 8-15.

Vivien-Roels B, Pévet P, 1993: Melatonin: presence and formation in invertebrates. Experientia 49, 642-647.

Vivien-Roels B, Pévet P, Beck O, Fevre-Montange M, 1984: Identification of melatonin in the compound eyes of an insect, the locust (*Locusta migratoria*), by radioimmunoassay and gas chromatography-mass spectrometry. Neurosci. Lett. 49, 153-157.

Watanabe H, Kobayashi T, Tomii M, Sekiguchi Y, Uchida K, Aoki T, Cyong J-C, 2002: Effects of kampo herbal medicine on plasma melatonin concentration in patients. Am. J. Chinese Med. 30, 65-71.

Weber, JM, Unger, I, Wirz-Justice, A, and Schwander, JC, 1998: Sensitive monitoring of alterations in circadian rhythms by supersensitive melatonin immunoassays. Posterpresentation: 14th Congress of the European Sleep Research Society (ESRS), Madrid, Spain 9-12 September, 1998.

Wolf K, Kolář J, Witters E, van Dongen W, Onckelen H, Macháčková I, 2001: Daily profile of melatonin levels in *Chenopodium rubrum* L. depends on the photoperiod. J. Plant Physiol. 158, 1491-1493.

Zhang J, Squadrito GL, Pryor WA, 1998: The reaction of melatonin with peroxynitrate: formation of melatonin radical cation and absence of stable nitrated product. Biochem. Biophys. Res. Commun. 251, 83-87

8 Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Prof. Dr. Klaus Lüning für die Unterstützung und die Betreuung während meiner Arbeit und dafür, dass ich immer die Freiheit hatte, eigene Ideen zu verfolgen.

Herrn Prof. Dr. Rüdiger Hardeland danke ich für die Übernahme des Korreferats und für zahlreiche anregende Diskussionen zu dem bearbeiteten Thema.

Herzlichsten Dank auch an Petra Kadel, die mich in die Künste der HPLC eingewiesen hat und stets mit technischer sowie tatkräftiger Unterstützung zur Seite stand.

Allen Mitarbeitern der Wattenmeerstation auf Sylt des Alfred-Wegener-Instituts möchte ich für die freundliche Aufnahme und die netten 3 1/2 Jahre danken.

Während dieser Doktorarbeit wurde ich vom Alfred-Wegener-Institut finanziert, ein gut ausgestatteter Arbeitsplatz zur Verfügung gestellt, sowie die technischen Voraussetzungen für die Anfertigung und das Gelingen dieser Arbeit geschaffen.

Sabine – Danke für alles!

Abschließend möchte ich auch meinen Eltern danken, die mir das Studium ermöglicht und mich in allen Belangen unterstützt haben.

Auch den zahlreichen, hier nicht namentlich aufgeführten Personen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, nochmals ein ganz herzliches Dankeschön!

