

**Oxidativer Metabolismus von Kynurensäure
und ihren Analoga**

Untersuchungen an dem einzelligen Modellorganismus *Lingulodinium
polyedrum* und an radikalgenerierenden Systemen

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Beate Zsizsik
aus Szeged / Ungarn

Göttingen 2001

D 7

Referent: Prof. Dr. R. Hardeland

Korreferent: Prof. Dr. N. Elsner

Tag der mündlichen Prüfungen: 26.06.2001

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis.....	V
1. Einleitung.....	1
2. Material und Methoden.....	10
2.1 Versuchsorganismus und Haltungsbedingungen.....	10
2.1.1 <i>Lingulodinium polyedrum</i>	10
2.1.2 Zellhaltung unter experimentellen Bedingungen.....	10
2.2 Tests für aromatische Aminosäure-Aminotransferasen.....	11
2.2.1 L-Tryptophan:2-Oxoglutarat-Aminotransferase.....	11
2.2.2 L-Kynurenin:2-Oxoglutarat-Aminotransferase.....	12
2.3 Messung der Aktivität der Tryptophan- und Kynurenin-Aminotransferase über 24 h im LD 12:12 und LL.....	13
2.4 Beeinflussung der Aminotransferase-Aktivitäten durch Indolverbindungen.....	13
2.4.1 Behandlung mit L-Tryptophan.....	14
2.4.2 Behandlung mit Melatonin.....	14
2.5 Messung von Kynurensäure im Kulturmedium.....	14
2.5.1 Fluorometrie des Kynurensäure-Zink-Komplexes.....	14
2.5.2 Prüfung auf chemischen und biologischen Umsatz von L-Kynurenin.....	15
2.5.3 Bildung und Freisetzung von Kynurensäure bei <i>Lingulodinium polyedrum</i>	16
2.6 Oxidation von L-Kynurenin zu Kynurensäure durch H ₂ O ₂ in Gegenwart und Abwesenheit von Peroxidase.....	17
2.7 Bildung von Kynurensäure unter Beeinflussung der H ₂ O ₂ -Produktion durch CCCP, Paraquat und DCMU im Homogenat von <i>Lingulodinium polyedrum</i>	18
2.8 Untersuchungen der radikalfangenden Eigenschaften von Kynurensäure und ihrer Analoge.....	19

2.8.1	Reaktionen mit Hydroxylradikalen und Reduktion des ABTS-Kationradikals.....	19
2.8.2	Reaktionen mit Superoxidationradikalen.....	21
2.9	Untersuchungen zum Abbau von 2-Desoxyribose in Gegenwart von Hydroxylradikalfängern.....	22
2.9.1	Einsatz von N-Hydroxy-2-pyridinthion zur Generierung von Hydroxylradikalen.....	22
2.9.2	Einsatz von δ -Aminolävulinsäure zur Generierung reaktiver Sauerstoffspezies.....	24
2.10	Chemilumineszenzmessung.....	24
2.10.1	Einsatz konkurrierender Radikalfänger.....	26
2.11	Fluorometrische Untersuchungen zur Oxidation von Indol-3-pyruvat, Kynurensäure und deren Analoga.....	26
2.12	Biolumineszenzmessung an <i>Lingulodinium polyedrum</i>	27
2.13	Bestimmung der Xanthurensäure durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) mit elektrochemischer Detektion (ECD).....	27
2.13.1	Behandlung von <i>Lingulodinium polyedrum</i> mit 3-Hydroxykynurenin.....	27
2.13.2	Probenaufbereitung.....	28
2.13.3	Aufbau der HPLC-ECD-Apparatur.....	29
2.13.4	Zusammensetzung und Begasung des Eluenten.....	30
2.13.5	HPLC-Kalibrierung durch externen Standards.....	30
2.14	Bestimmung der Kynurensäure und ihres Produktes durch HPLC mit UV-Detektion.....	30
2.15	Proteinbestimmung.....	31
3.	Ergebnisse.....	32
3.1	Tagesgänge der Tryptophan- und der Kynurenin-Aminotransferase von <i>Lingulodinium polyedrum</i> im LD 12:12.....	32
3.2	Effekte von Tryptophan, Melatonin und LL auf die Tryptophan-Aminotransferase zu verschiedenen Tageszeiten.....	36
3.3	Umsatz von L-Kynurenin zu Kynurensäure bei <i>Lingulodinium polyedrum</i>	38

3.4 Freisetzung von Kynurensäure durch <i>Lingulodinium polyedrum</i> ins Medium: Tagesgänge im LD 12:12, LL und DD.....	41
3.5 Ein neuer Stoffwechselweg der Kynurensäure-Bildung durch Wasserstoffperoxid in Gegenwart und Abwesenheit von Peroxidase.....	46
3.6 Einfluß von CCCP, Paraquat und DCMU auf die Kynurensäure-Bildung im Homogenat von <i>Lingulodinium polyedrum</i>	50
3.7 Entstehung der Kynurensäure aus Indol-3-pyruvat in einem radikalgenerierenden System.....	54
3.8 Eigenschaften von Indol-3-pyruvat als Radikalfänger.....	56
3.8.1 Reaktionen mit Hydroxylradikalen und Reduktion des ABTS- Kationradikals.....	56
3.8.2 Reaktionen mit Superoxidanionradikalen.....	59
3.8.3 Chemilumineszenz bei der radikalischen Oxidation von Indol-3-pyruvat.....	62
3.9 Eigenschaften der Kynurensäure als Radikalfänger.....	67
3.9.1 Reaktionen mit Hydroxylradikalen und Reduktion des ABTS- Kationradikals.....	67
3.9.2 Reaktionen mit Superoxidanionradikalen.....	67
3.9.3 Chemilumineszenz bei der Oxidation von Kynurensäure.....	71
3.10 Eigenschaften von 4-Hydroxychinolin als Radikalfänger.....	77
3.10.1 Reaktionen mit Hydroxylradikalen und Reduktion des ABTS- Kationradikals.....	77
3.10.2 Reaktionen mit Superoxidanionradikalen.....	77
3.10.3 Chemilumineszenz bei der Oxidation von 4-Hydroxychinolin.....	80
3.11 Eigenschaften von Chinaldinsäure als Radikalfänger.....	83
3.11.1 Reaktionen mit Hydroxylradikalen und Reduktion des ABTS- Kationradikals.....	83
3.11.2 Prüfung auf Reaktion mit Superoxidanionradikalen.....	83
3.11.3 Chemilumineszenz bei der Oxidation von Chinaldinsäure.....	87
3.12 Eigenschaften der Xanthurensäure als Radikalfänger.....	90
3.12.1 Reaktionen mit Hydroxylradikalen und Reduktion des ABTS- Kationradikals.....	90
3.12.2 Reaktionen mit Superoxidanionradikalen.....	90

3.12.3 Chemilumineszenz bei der Oxidation von Xanthurensäure.....	90
3.13 Xanthurensäure und ihr Vorläufer 3-Hydroxykynurenin bei <i>Lingulodinium polyedrum</i>	97
3.13.1 3-Hydroxykynurenin und Xanthurensäure als physiologische Metaboliten...	97
3.13.2 Metabolisierung von 3-Hydroxykynurenin im Dauerdunkel.....	97
3.13.3 Metabolisierung von 3-Hydroxykynurenin unter dem Einfluß von Licht.....	97
3.14 Effekte verschiedener 3-Hydroxykynurenin-Konzentrationen auf die Biolumineszenz von <i>Lingulodinium polyedrum</i>	115
3.15 Oxidative Folgeprodukte von Kynurensäure und deren Analoga.....	121
3.16 Weitere Charakterisierung des Oxidationsprodukts von Kynurensäure; Trennung von Kynurensäure und ihrem Produkt durch HPLC mit UV-Detektion und durch Dünnschichtchromatographie.....	126
3.17 Abbau von 2-Desoxyribose in Gegenwart von Hydroxylradikalfängern.....	128
4. Diskussion.....	134
5. Zusammenfassung.....	156
6. Literaturverzeichnis.....	160

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABTS	2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonat)
AFMK	N ¹ -Acetyl-N ² -formyl-5-methoxykynuramin
ALA	δ-Aminolävulinsäure
aqua dest.	Aqua destillata
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CCCP	Carbonylcyanid-m-chlorphenylhydrazon
cm	Zentimeter
cpm	counts per minute
CT	Circadian Time
DCMU	Dichlorphenyldimethylharnstoff
DD	Dauerdunkel
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECD	elektrochemische Detektion
EDTA	Ethylendiaminotetraacetat
Em.	Emission
<i>et al.</i>	<i>et alteri</i> : und andere
Exz.	Exzitation
FeSO ₄	Eisensulfat
g	Gramm
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
ggf.	gegebenenfalls
GSH	reduziertes Glutathion
h	Stunde
HCL	Salzsäure
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid

HPLC	high pressure liquid Chromatography = Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie
HPT	N-Hydroxy-2-pyridinthion
KAT	Kynurenin-Aminotransferase
KH ₂ PO ₄	Kaliumphosphat
l	Liter
LD	Licht-Dunkel-Wechsel
LL	Dauerlicht
lx	Lux
M	Molar
m	milli (10 ⁻³)
MDA	Malondialdehyd
μ	mikro (10 ⁻⁶)
min	Minute
Mio	Millionen
mV	Millivolt
N	Normal
n	nano (10 ⁻⁹)
nA	Nanoampere
NaCl	Natriumchlorid
NADH	reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
NADPH	reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinucleotidphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
nm	Nanometer
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO	Stickstoffmonoxid
O.D.	Optische Dichte
o.g.	obengenannt
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PC	Personal-Computer
pers. Mitt.	persönliche Mitteilung

RFU	Relative Fluoreszenz
s	Sekunde
s.a.	siehe auch
SOD	Superoxiddismutase
s.u.	siehe unten
TBA	Thiobarbitursäure
Tiron	di-Natrium-4,5-dihydroxybenzol-1,3-sulfonat
Tris	Tris (-Hydroxymethyl-) aminomethan
U	Umdrehungen
u.a.	unter anderem
unpubl.	unpubliziert
unveröff.	unveröffentlicht
UV	Ultraviolett
vgl.	vergleiche
z.B.	zum Beispiel
ZT	Zeitgeber Time
z.T.	zum Teil
%	Prozent

1. Einleitung

Kynurensäure (= 4-Hydroxychinolin-2-carboxylsäure) ist seit langem als Metabolit des hochgradig verzweigten Tryptophan-Katabolismus bekannt. Der zuerst identifizierte, klassische Entstehungsweg wird durch die L-Kynurenin:2-Oxoglutarat-Aminotransferase eingeleitet; die entstehende Oxosäure (Anthraniloylbrenztraubensäure) zyklisiert spontan zur Kynurensäure (Abb. 1). Trotz ihres Vorkommens bei recht verschiedenen Organismengruppen wie Vertebraten, Insekten und Pilzen fehlten über lange Zeit funktionelle Untersuchungen zur Rolle von Kynurensäure. Dies änderte sich mit der Entdeckung der antiexzitatorischen und antiexzitotoxischen Wirkung dieses Metaboliten im Säugerhirn. Diese Rolle wurde zunächst nur durch nicht-selektive Hemmung der drei zentralnervösen Glutamat-Rezeptoren (Perkins & Stone, 1982), insbesondere die Affinität zur Glycinbindungsstelle des NMDA-Rezeptors, erklärt (Stone, 1993; Moroni *et al.*, 1996; Schwarcz *et al.*, 1996; Speciale *et al.*, 1996). Weitere Bindungsstellen sind offenbar darüber hinaus vorhanden und möglicherweise von noch größerer Bedeutung (Schwarcz *et al.*, 1999). Das über das Säugerhirn weit hinausreichende Vorkommen von Kynurensäure sollte jedoch ein breiteres Spektrum biologischer Wirkungen nahelegen. Wiewohl hier vergleichend-physiologische Untersuchungen fehlen, hat sich mit Blick auf die antiexzitotoxischen Wirkungen ein neuer Ansatz von potentiell allgemeinerer Bedeutung ergeben: Da Exzitotoxizität oft den Teilaspekt der Oxidotoxizität beinhaltet, war der Befund bedeutsam, daß Kynurensäure auch die Eigenschaften eines Radikalfängers besitzt (Goda *et al.*, 1996, 1999). Die protektive Doppelfunktion der Kynurensäure ist auch insofern interessant, als ein anderer Tryptophan-Metabolit, Chinolinsäure, die nach Induktion der mikroglialen Indolamin-2,3-dioxygenase parallel zur Kynurensäure vermehrt produziert wird, sowohl ein endogenes Exzitotoxin (Pellegrini-Giampietro *et al.*, 1990; Puttfarcken *et al.*, 1993; Giusti *et al.*, 1996) als auch eine Quelle oxidativen Stresses darstellt (Goda *et al.*, 1996).

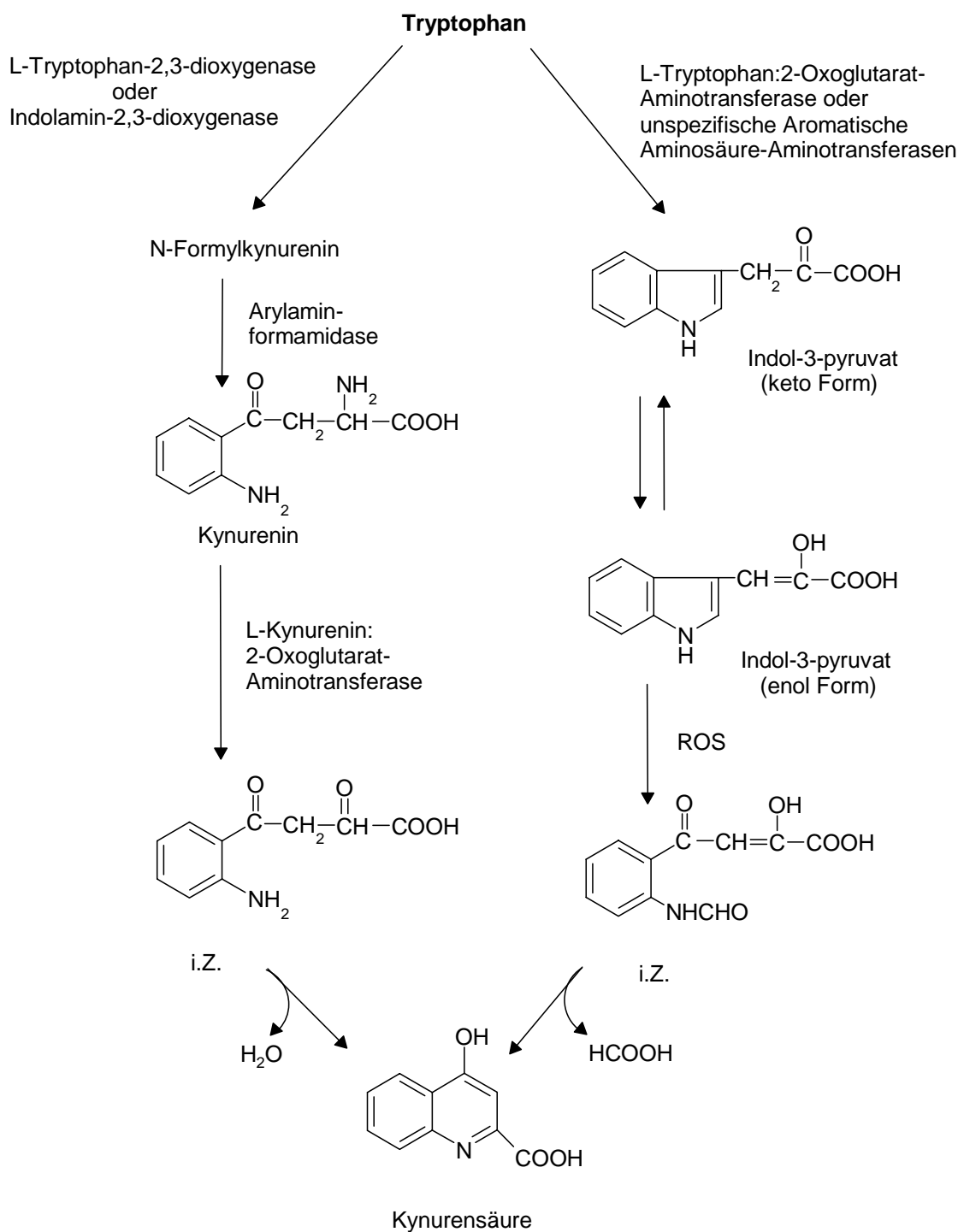


Abb. 1: Zwei Stoffwechselwege der Kynurensäure-Bildung, die durch Transaminierungsschritte eingeleitet werden.

Der potentiell wichtige Befund des Radikalfangens durch Kynurensäure ist bislang nicht systematisch weiterverfolgt worden, sondern blieb auf die Bestimmung der Reaktivität gegenüber einem völlig unphysiologischen Radikal, dem Galvinoxylradikal, sowie die Messung der Destruktion von Lipiden und DNA beschränkt (Goda *et al.*, 1996, 1999). Was demnach fehlte, waren Untersuchungen über Interaktionen mit reaktiven Sauerstoffspezies von physiologischer Relevanz.

Ebensowenig waren die Folgeprodukte der radikalischen Oxidation von Kynurensäure bekannt, noch die für die Interaktion entscheidenden funktionellen Gruppen oder das Verhalten der im Stoffwechsel gebildeten Strukturanaloga. Unter diesen besonders interessant ist die Xanthurensäure, die auf einem ganz dem der Kynurensäure entsprechenden Wege entsteht, sogar durch dasselbe Enzym, die Kynurenin:2-Oxoglutarat-Aminotransferase, und aufgrund ihrer zusätzlichen Hydroxylgruppe in Position 8 eine höhere Reaktivität erwarten lassen sollte. Der Beachtung der Xanthurensäure als potentiell protektiver Substanz hat vor allem ein Umstand entgegengestanden, nämlich ihre Entstehung aus 3-Hydroxykynurenin. Dieses vermag sich prooxidativ zu verhalten und vor allem in die bereits als neurotoxisch erwähnte Chinolinsäure überzugehen. Viele Bemühungen waren daher darauf gerichtet gewesen, den verzweigten Stoffwechsel des Tryptophans derart zu steuern, daß die Kynurenin-Hydroxylierung zugunsten der Transaminierung, also der Kynurensäurebildung, unterdrückt wurde (Moroni *et al.*, 1996, 1999; Speciale *et al.*, 1996; Costantino *et al.*, 1996; Giordani *et al.*, 1996; Cini *et al.*, 1996). Die Bildung der Xanthurensäure war hierdurch zugleich supprimiert.

Die Rolle freier Radikale gewinnt zunehmende Beachtung. Diese oft hochreaktiven Verbindungen entstehen bereits in erheblichem Umfang im normalen Stoffwechsel, vor allem im Zusammenhang mit Elektronentransportketten, und werden unter dem Einfluß diverser chemischer und physikalischer Noxen, insbesondere Mutagenen, UV A- und ionisierenden Strahlen vermehrt generiert (Übersicht: Halliwell & Gutteridge, 1999). Aufgrund ihrer Reaktivität vermögen sie in allen biologischen Makromolekülen sowie in Lipidmembranen Schäden zu erzeugen, die zu Zelltod, Mutagenese oder Carcinogenese führen können.

Eine erhebliche Zahl von Erkrankungen läßt sich mit Schäden durch freie Radikale in Verbindung bringen, wobei diese im Einzelfall kausativ oder Begleitphänomene sind (Reiter *et al.*, 1993; Poeggeler *et al.*, 1993; Reiter, 1998; Halliwell & Gutteridge, 1999). Mit Blick auf den zuvor angesprochenen Gesichtspunkt der Neurotoxizität sei besonders hervorgehoben, daß in den soeben zitierten Zusammenfassungen eine Vielzahl von Belegen für eine Involvierung in neurodegenerative Prozesse enthalten ist. Im speziellen wären hier auch Alterung und altersassoziierte Erkrankungen zu erwähnen (Simic, 1992; Ceballos-Picot *et al.*, 1992; Hayakawa *et al.*, 1992; Smith *et al.*, 1992; Poeggeler *et al.*, 1993; Richardson *et al.*, 1996).

Wenn auch Schäden durch freie Radikale nicht grundsätzlich zu verhindern sind, so verfügen doch Organismen über effektive Schutzmechanismen zu deren Minimierung. Dies ist nicht allein ein Erfordernis bei Vertebraten, sondern stellt eine fundamentale Notwendigkeit für alle Aerobier dar. Die Mechanismen der antioxidativen Protektion beinhalten enzymatische und nicht-enzymatische Prozesse. Allerdings können nur niederreaktive Radikale enzymatisch eliminiert werden, wie das Superoxidanion durch die betreffenden Isoenzyme der Superoxiddismutase. Bei dieser Reaktion wird jedoch ein vergleichsweise wenig gefährliches und zudem keineswegs nur oxidierendes, sondern oft auch reduzierendes Radikal in Wasserstoffperoxid überführt, eine Verbindung, die eine Quelle für hochreaktive und somit weitaus gefährlichere Radikale darstellt, vor allem das Hydroxylradikal. Aufgrund dessen extremer Reaktivität kann dieses grundsätzlich nicht auf enzymatischem Wege eliminiert werden, da es jegliches aktive Zentrum zerstören würde; es bleibt den Organismen nur die Möglichkeit, das Wasserstoffperoxid durch diverse Formen von Peroxidasen – Hämoperoxidasen/Katalasen, Glutathionperoxidasen, ggf. Halo- und Ascorbatperoxidasen – vorab zu zerstören (Übersicht: Halliwell & Gutteridge, 1999). Dies gelingt jedoch nur unvollkommen, so daß Hydroxylradikale und von diesen ausgehende Folgeradikale, z.B. Peroxylradikale, mit einer gewissen Rate entstehen. Außerdem existieren Mechanismen der Hydroxylradikal-Generierung, etwa über NO und die Dekomposition des hieraus gebildeten Peroxidnitrits (Beckman *et al.*, 1990; Kaur *et al.*, 1997), die vom H₂O₂ unabhängig und daher nicht durch Peroxidasen zu verhindern sind. Aus diesem Grunde sind niedermolekulare Radikalfänger als zusätzlicher Schutz erforderlich.

Zunächst wird hier oft an antioxidative Vitamine gedacht, doch ist deren Wirksamkeit insofern räumlich begrenzt, als sie entweder sehr hydrophil (Ascorbat) oder sehr lipophil (α -Tocopherol, Retinol) sind und somit nicht in alle Kompartimente gelangen können. Intrazelluläre und auch relativ hochkonzentrierte Antioxidantien wie reduziertes Glutathion (GSH) und reduzierte Nicotinamid-Nucleotide (NADH, NADPH) leisten einen bedeutenden Beitrag zur Entgiftung von Radikalen, doch erscheint auch der hiervon ausgehende Schutz nicht ausreichend. GSH vermag sich in bestimmten Konstellationen prooxidativ zu verhalten (Fischer-Nielsen *et al.*, 1992; Spear & Aust, 1995) und ist außerdem die Quelle von DNA-Addukten, folglich von Mutagenese und Carcinogenese (Huang *et al.*, 1998). Reduzierte Nicotinamid-Nucleotide vermögen mit Sauerstoff zu interagieren und auf diese Weise Superoxidanionen zu erzeugen, welche in H_2O_2 übergehen können (Land & Swallow, 1971; Messner & Imlay, 1999); ferner partizipieren sie am Redox-Cycling (Rao & Cederbaum, 1997); beides führt zu prooxidativen Effekten.

Da die bisher beschriebenen Mechanismen offenbar für einen optimalen Schutz noch nicht ausreichen oder gar die Ursache für Destruktion sein können, ist die Suche nach weiteren Radikalfängern sinnvoll. Hierbei kommen insbesondere Metabolite der aromatischen Aminosäuren in Frage, welche aufgrund ihrer lipophilen Molekülteile ein hinreichendes Maß an Amphiphilie erlangen, um in allen Kompartimenten präsent sein zu können, und zum anderen mit ihren mesomeren Systemen nach Interaktion mit freien Radikalen hinreichend stabilisierte Zwischenprodukte bilden können, die, statt die radikalische Reaktionskette in andere wichtige Biomoleküle hineinzutragen, eine gute Chance besitzen, mit den im Vergleich zu den meisten Substanzen niedriger konzentrierten Radikalen erneut zu interagieren und somit die Reaktionskette zu terminieren.

Radikalreaktionen aromatischer Metabolite sind Teil des oxidativen Stoffwechsels. Dieser besitzt selbstverständlich auch enzymatische Komponenten. Beide Möglichkeiten im Zusammenhang zu sehen, erscheint wichtig und ist aus verschiedenen Gründen nicht trivial. Zum einen können über radikalische Mechanismen manchmal dieselben Produkte gebildet werden wie auf enzymatischem Wege. Ein augenfälliges Beispiel hierfür ist die Entstehung des substituierten Kynuramins AFMK (N^1 -Acetyl- N^2 -formyl-5-methoxykynuramin) aus Melatonin.

Das Oxidationsprodukt kann sowohl enzymatisch durch die Indolamin-2,3-dioxygenase gebildet werden (Hayaishi, 1976; Hayaishi & Yoshida, 1979) wie auch durch Interaktion mit freien Radikalen, letzteres sogar auf verschiedenen Wegen (Hardeland *et al.*, 1993, 1996; Hardeland & Fuhrberg, 1996). Ferner kann ein radikalisch gebildeter Metabolit enzymatisch weiterverstoffwechselt werden, AFMK beispielsweise zu seinem Deformylierungsprodukt unter der Wirkung von Arylaminformamidase (Kelly *et al.*, 1984; Hardeland *et al.*, 1993). Daß auch ein nicht-enzymatischer Schritt auf einen enzymatischen folgen kann, ist insofern trivial, als die Bildung endogener Radikalfänger zumeist, aber nicht immer (s.u.) durch Enzyme geschieht. Im oxidativen Metabolismus sind somit vielfach nicht-enzymatische und enzymatische Schritte miteinander vernetzt.

Diese Verflechtung wird auch im Falle der Kynurensäure deutlich. Neben dem eingangs erwähnten klassischen Weg über die L-Kynurenin:2-Oxoglutarat-Aminotransferase mit nachfolgender spontaner (also auch nicht-enzymatischer, wenn auch nicht radikalischer) Zyklisierung existiert ein Weg der radikalischen Genese: Indol-3-pyruvat, insbesondere dessen Enolform, vermag durch reaktive Sauerstoffspezies zu dem entsprechenden kynurischen Produkt (einer N-formylierten, enolischen Kynursäure – nicht zu verwechseln mit Kynurensäure!) oxidiert zu werden, welche unter Abspaltung von Ameisensäure zur Kynurensäure zyklisiert (Politi *et al.*, 1991, 1996; Abb. 1). Indol-3-pyruvat wurde als direkte Ausgangssubstanz der cerebralen Kynurensäure detektiert (Russi *et al.*, 1989; Politi *et al.*, 1991). Der oxidative Metabolismus ist demnach nicht nur in Hinblick auf Folgeprodukte der Kynurensäure von Bedeutung, sondern auch für deren Entstehung.

Der eben geschilderte Syntheseweg wirft auch ein Licht auf einen anderen, interessanten Aspekt des oxidativen Stoffwechsels, der seriellen Entstehung von Radikalfängern. Indol-3-pyruvat wird enzymatisch gebildet, entweder durch eine spezifische L-Tryptophan:2-Oxoglutarat-Aminotransferase oder eine unspezifische Aromatische Aminosäure-Aminotransferase. Der Radikalfänger Indol-3-pyruvat generiert jedoch nicht-enzymatisch einen weiteren Radikalfänger, die Kynurensäure. Ob die Kynurensäure nur einmal mit einem freien Radikal interagiert oder weitere Schritte des Radikalfangens einleitet, wird u.a. Gegenstand der hier vorgelegten Untersuchung sein.

Die multiplen Wege der Entstehung von Kynurensäure mögen bereits den Anschein erwecken, die Bildungsrate dieser Substanz zu erklären. Dies ist zumindest nicht bei jedem der fraglichen Objekte der Fall. Im Säugerhirn wurden Kynurensäure-Konzentrationen gemessen, die nicht ohne weiteres durch die übliche Kynurenin-Aminotransferase-Aktivität erklärt werden konnten, ein Umstand, der zur Suche nach weiteren Isoenzymen führte. In der Tat ließen sich schließlich zwei als KAT I und KAT II bezeichnete Isoenzyme unterscheiden, deren erstere auch Pyruvat als Oxosäure akzeptierte, während die letztere sich als eine α -Aminoacetyl:2-Oxoglutarat-Aminotransferase mit einschlägiger Nebenaffinität für L-Kynurenin erwies (Okuno *et al.*, 1991; Guidetti *et al.*, 1997). Gleichwohl überstieg die Gesamtbildungsrate von Kynurensäure die Summe der beiden Aktivitäten. In der hier vorgelegten Arbeit wird ein weiterer Weg aufgezeigt werden, der ebenfalls zur Bildung von Kynurensäure führt. Die Untersuchung des oxidativen Metabolismus kann bei manchen Objekten schwierig werden, wenn die Bildungsraten niedrig sind bzw. viel biologisches Ausgangsmaterial benötigt wird. Radikalische Reaktionen lassen sich jedoch auch in chemischen Systemen verfolgen. Diese weichen zwar in manchen Eigenschaften von der Situation in der Zelle ab, doch lassen sich prinzipielle Möglichkeiten sehr wohl identifizieren. Wichtig ist hierbei, daß die radikalischen Reaktionen nicht allein an einem einzigen System untersucht werden, etwa gar ausschließlich anhand eines unphysiologischen Radikals aus dem Repertoire des Chemikers, wie etwa dem Galvinoxyl-Radikal, mit der einzigen Zielsetzung einer Bestimmung der Reaktivität. Biologisch wichtiger sind Analysen, die die Interaktionen mit physiologisch relevanten Radikalen reflektieren, die ferner nicht allein die Reaktivität als Leitlinie haben, sondern auch die Bioverfügbarkeit eines Radikalfängers, welche bei zu hoher Reaktivität durch Interaktionen mit niederreaktiven aber relativ harmlosen Radikalen herabgesetzt ist, schließlich auch Analysen, bei denen die Termination radikalischer Reaktionsketten erkennbar wird und somit ein biologischer Schutzwert. Ein hochreaktiver, aber die Reaktionskette perpetuierender Radikalfänger ist von geringem biologischen Nutzen. Eine weitere Möglichkeit, die Wege des oxidativen Metabolismus, auch in seiner Vernetzung enzymatischer und nicht-enzymatischer Prozesse, zu durchschauen, besteht in dem Einsatz von biologischen Modellobjekten mit hohen Raten im Redox-Stoffwechsel.

Einem besonders hohen oxidativen Druck sind photosynthetisch aktive Zellen ausgesetzt, weil die Elektronentransportketten der Photosysteme mehr reaktive Sauerstoffverbindungen erzeugen, als dies üblicherweise andere zelluläre Komponenten tun (Zusammenfassung: Hardeland *et al.*, 2000). Aufgrund dessen müssen die betreffenden Organismen über besonders effektive antioxidative Schutzmechanismen verfügen und lassen daher auch höhere Spiegel oder Bildungsraten von Radikalfängern erwarten.

In der vorliegenden Arbeit wurde als Modellorganismus der marine Dinoflagellat *Lingulodinium polyedrum* (Stein) Dodge verwendet, besser bekannt unter seinem kürzlich in die Synonymie verwiesenen älteren Namen *Gonyaulax polyedra* Stein. Als Einzeller ist er leicht handhabbar und bereits für diverse vergleichend-pharmakologische Untersuchungen eingesetzt worden. Aufgrund seiner Befähigung zur Photosynthese kann in ihm der gewünschte hohe oxidative Druck erzeugt werden. Durch Variation der Belichtung bzw. Überführung ins Dunkle kann die Bildung von Oxidantien über eine breite Skala experimentell moduliert werden. Diese Möglichkeit bestünde bei anderen photoautotrophen Einzellern im Prinzip ebenfalls, jedoch besitzen viele einzellige Algen, die als Laborobjekte etabliert sind, gegenüber *L. polyedrum* einen entscheidenden Nachteil: Aufgrund einer Zellwand oder, wie etwa bei Euglenoiden, einer Schleimbedeckung der Zelloberfläche ist der Austausch vieler Substanzen zwischen Medium und Cytoplasma erheblich behindert. Bei Dinoflagellaten und somit auch *L. polyedrum* stellen die Thekaplatten jedoch keine zusammenhängende Diffusionsbarriere dar, so daß viele Metabolite aus dem Stoffwechsel der aromatischen Aminosäuren effektiv permeieren können (Balzer & Hardeland, 1991b; Burkhardt & Hardeland, 1996; Mueller & Hardeland, 1999a,b; Mueller *et al.*, 2000).

Für die vorliegende Untersuchung war *L. polyedrum* auch insofern vorteilhaft, als bei dieser Art detaillierte Erfahrungen über den Tryptophan-Stoffwechsel vorlagen, wie sie bei anderen vergleichbaren Objekten nicht vorhanden gewesen wären.

Die möglichen untoxischen Dosierungen von Tryptophan und diversen seiner Metabolite sind bekannt (Hardeland & Balzer, 1993; Burkhardt *et al.*, 1995), der Indolamin-Syntheseweg ist im einzelnen aufgeklärt (Hardeland & Balzer, 1993; Hardeland, 1993; Burkhardt & Hardeland, 1996), ein Indole oxidativ spaltendes Enzym, die Indolamin-2,3-dioxygenase, welches den Kynurenin-Weg des Tryptophan-Abbaus einleiten könnte, wurde nachgewiesen (Behrmann & Hardeland, 1996). Auch Kynurenin-Abbau konnte demonstriert werden: Die Aktivität der Kynureninase war einer Größenordnung, wie sie sonst z.B. in der Rattenleber gefunden wird, einem Organ mit besonders hohem Tryptophan-Katabolismus; des weiteren gab es Hinweise auf die Existenz einer Kynurenin-Aminotransferase (Behrmann & Hardeland, 1996), für die jedoch noch eine optimale Methode zu erarbeiten blieb. Die Entstehung von Kynurensäure in diesem Organismus besaß somit eine hohe Wahrscheinlichkeit.

Es war das Ziel der vorliegenden Untersuchung, die Vorteile der verschiedenen angesprochenen Systeme zu nutzen, um die Rolle von Kynurensäure im oxidativen Stoffwechsel sowohl in Hinblick auf enzymatische als auch radikalische Mechanismen verstehen zu lernen. Die Bildungswege dieser potentiell bedeutenden Substanz waren ebenso von Interesse wie die Abbaurouten. Die Interaktionen mit freien Radikalen sollten auf einer breiteren Basis als bisher verstanden werden, was die Berücksichtigung verschiedener Radikalspezies erfordert, insbesondere der biologisch relevanten Superoxidanionen und Hydroxylradikale, aber auch mesomeriestabilisierter, langlebiger organischer Radikale. Über die Reaktion mit einer einzelnen Radikalspezies hinaus war die Möglichkeit in Betracht zu ziehen, daß Kynurensäure in katalysierten Systemen auch zur Entgiftung niederreaktiver Radikale führen kann. Des weiteren waren die funktionellen Gruppen der Kynurensäure zu identifizieren, die für die radikalischen Reaktionen entscheidend sind. Hierfür boten sich Vergleiche mit Strukturanaloga an. Die Möglichkeiten des Modellorganismus *Lingulodinium polyedrum* sollten genutzt werden, um in Situationen hohen und niedrigen oxidativen Druckes den Umsatz im oxidativen Stoffwechsel von Kynurensäure zu studieren.

2. Material und Methoden

2.1 Versuchsorganismus und Haltungsbedingungen

2.1.1 *Lingulodinium polyedrum*

Der Versuchsorganismus, *Lingulodinium polyedrum* (Stein) Dodge, ist ein mariner, photoautotropher und biolumineszenter Dinoflagellat. Die Haltung der Zellen erfolgte in einem modifizierten f/2 Medium (Hoffmann & Hardeland, 1985) in gasaustauschfähigen 750 ml Falcon-Kulturflaschen bei einer Temperatur von 20°C und bei einem künstlichen Hell-Dunkel-Wechsel [LD 12:12 (ca. 2600:0 lx)]. Da der Einzeller unter sterilen Bedingungen kein hinreichendes Wachstum zeigt, wurden die Zellen unialgal jedoch nicht axenisch kultiviert.

2.1.2 Zellhaltung unter experimentellen Bedingungen

Für die Messung der Enzymaktivitäten und zur Bestimmung der Freisetzungsrates von Kynurensäure ins Medium wurden Kulturen verwendet, die durch Teilung aus derselben Stammkultur entstanden waren. Um eine annähernd gleiche Wachstumsphase und Zelldichte zu gewährleisten, wurden die Ansätze fünf Tage vor Versuchsbeginn letztmalig mit frischem Medium verdünnt.

Bei den Messungen der Aktivität der Tryptophan-Aminotransferase im LL (2600 lx) begannen die Probenahmen 12 h nach dem letzten „Licht-an“.

Für die Messungen der Kynurensäure-Freisetzungsrates im LL (2600 lx) wurden die Zellen 24 h vor Beginn der Versuchsserie in LL überführt.

Bei den Messungen der Kynurensäure-Freisetzungsrates im DD verblieben die Kulturen 12 h vor Beginn der Versuchsserie in Dunkelheit.

2.2 Tests für aromatische Aminosäure-Aminotransferasen

2.2.1 L-Tryptophan:2-Oxoglutarat-Aminotransferase

Die Bestimmung der Aktivität der Tryptophan-Aminotransferase erfolgte nach einer neu entwickelten Methode von Hardeland & Zsizsik (1997a).

Der Umsatz des eingesetzten L-Tryptophans durch die Tryptophan-Aminotransferase führt zur Bildung von Indol-3-pyruvat, das in einem stark alkalischen Milieu in seiner Enolform vorliegt, welche leicht zur Kynurensäure oxidiert (Politi *et al.*, 1996), was bei dem zur Beendigung der enzymatischen Reaktion gewählten pH spontan und rasch stattfindet.

Für die Bestimmung der Aktivität der Tryptophan-Aminotransferase wurden dichtgewachsene *Lingulodinium*-Kulturen mit einem Volumen von 200 ml verwendet. Die Zellen wurden zunächst durch einen Cellulosenitratfilter (Sartorius SM 130, Porengröße 8 µm) filtriert und auf ein Volumen von ca. 2 ml eingengt. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 2,9 %iger NaCl und einem Tris-HCl-Puffer (0,2 M, pH 8,0) gewaschen und durch Filtration auf ein Endvolumen von 3 ml konzentriert. Dieser Zellsuspension wurden 2 ml entnommen, in einen 10 ml Potter-Elvehjem Glas-homogenisator mit Glaspistill überführt und mit Tris-HCl-Puffer (0,2 M, pH 8,0) auf 10 ml aufgefüllt. Die Zellen wurden in 8 bis 10 Durchgängen bei mittlerer Geschwindigkeit homogenisiert. L-Tryptophan, Pyridoxal-5-phosphat, NaOH wurden in aqua dest. und 2-Oxoglutarsäure in Tris-HCl-Puffer (0,2 M, pH 8,0) gelöst.

Reaktionsansatz:

0,3 ml	L-Tryptophan ($3 * 10^{-2}$ M)
0,3 ml	Pyridoxal-5-phosphat ($2 * 10^{-3}$ M)
0,2 ml	2-Oxoglutarsäure ($1,5 * 10^{-1}$ M)
1,0 ml	<i>Lingulodinium</i> -Homogenat in Tris-HCl-Puffer (0,2 M, pH 8,0)

Die Leerwerte enthielten aqua dest. anstelle von L-Tryptophan. Für den Reaktionsansatz und den Leerwert wurden jeweils drei Parallelen verwendet.

Das Reaktionsgemisch wurde 60 min bei 30 °C im Schüttelwasserbad im Dunkeln inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen, erfolgte die Zugabe von 0,2 ml 10 N NaOH. Durch die Alkalisierung wurde zugleich das Homogenat soweit solubilisiert, daß nur noch Grobpartikel wie Thekaplatten ungelöst vorlagen, und außerdem die Autoxidation des Indol-3-pyruvats zu Kynurensäure eingeleitet. Anschließend wurden den Ansätzen der Leerwerte 0,3 ml L-Tryptophan ($3 \cdot 10^{-2}$ M) und denen der Analysen 0,3 ml aqua dest. hinzugefügt. Nach 20-minütigem Stehenlassen im Dunkeln wurden die Grobpartikel 10 min in einer Tischzentrifuge (Hettich EBA 3S) bei 6000 U/min abzentrifugiert.

Die Kynurensäure im Überstand wurde bei 330 nm photometrisch (PM 7, Zeiss) bestimmt. Es wurde ein Extinktionskoeffizient von $8850 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ zugrundegelegt.

2.2.2 L-Kynurenin:2-Oxoglutarat-Aminotransferase

Zur Bestimmung der Aktivität der Kynurenin-Aminotransferase wurde ebenfalls eine neu erarbeitete Methode nach Hardeland & Zsizsik (1997a) angewandt.

Dieser Test beruht auf der Umsetzung des als Substrat eingesetzten L-Kynurenins durch die Kynurenin-Aminotransferase zu β -Anthraniloylbrenztraubensäure, die spontan zu Kynurensäure zyklisiert.

Eine *Lingulodinium*-Kultur mit einem Volumen von 200 ml wurde wie unter 2.2.1 beschrieben filtriert, gewaschen, in Tris-HCl-Puffer überführt und homogenisiert. L-Kynurenin, Pyridoxal-5-phosphat, Perchlorsäure wurden in aqua dest. und 2-Oxoglutarensäure in Tris-HCl-Puffer (0,2 M, pH 8,0) gelöst.

Reaktionsansatz:

0,3 ml	L-Kynurenin ($3 \cdot 10^{-2}$ M)
0,3 ml	Pyridoxal-5-phosphat ($2 \cdot 10^{-3}$ M)
0,2 ml	2-Oxoglutarensäure ($1,5 \cdot 10^{-1}$ M)
1,0 ml	<i>Lingulodinium</i> -Homogenat in Tris-HCl-Puffer (0,2 M, pH 8,0)

Die Leerwerte enthielten aqua dest. anstelle von L-Kynurenin. Analysen und Leerwerte wurden jeweils dreifach angesetzt.

Die Reaktionsgemische wurden im Dunkeln 90 min bei 30 °C in einem Schüttelwasserbad inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 ml 0,4 N Perchlorsäure gestoppt. Den Ansätzen der Leerwerte wurde anschließend 0,3 ml L-Kynurenin ($3 \cdot 10^{-2}$ M) und denen der Analysen 0,3 ml aqua dest. hinzugefügt. Nach 15-minütiger Komplettierung der Fällung auf Eis erfolgte eine 10-minütige Zentrifugation bei 6000 U/min.

Die Extinktion der gebildeten Kynurensäure wurde bei 310 nm photometrisch (PM 7, Zeiss) gemessen. Im stark Sauren absorbiert Kynurenin nicht. Die Kynurensäure ist im sauren Milieu hinreichend stabil und absorbiert bei 310 nm. Der verwendete Extinktionskoeffizient betrug $5795 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

2.3 Messung der Aktivität der Tryptophan- und Kynurenin-Aminotransferase über 24 h im LD 12:12 und LL

Beginnend um ZT 0 wurden über einen Zeitraum von 24 h die Aktivitäten der beiden Aminotransferasen im LD 12:12 gemessen. Es wurden drei dichtgewachsene Kulturen verwendet, wobei, jeweils im Abstand von 3 h, 200 ml für eine Messung entnommen und wie unter 2.2.1 beschrieben verarbeitet wurden. Konzentrierung und Homogenisation der Zellen, die in der Scotophase entnommen wurden, erfolgten unter Rotlicht.

2.4 Beeinflussung der Aminotransferase-Aktivitäten durch Indolverbindungen

In den folgenden Versuchen wurde der Einfluß zweier Indolverbindungen von potentieller regulatorischer Bedeutung auf die Aktivitäten der beiden Aminotransferasen überprüft.

2.4.1 Behandlung mit L-Tryptophan

Da L-Tryptophan sowohl Substrat der Tryptophan-Aminotransferase als auch limitierender Vorläufer für die Synthese von L-Kynurenin ist, sollten die beiden Aminotransferasen auf Substratinduktionen überprüft werden. Hierbei wurden mögliche chronobiologische Variationen durch Behandlungen in unterschiedlichen circadianen Phasen berücksichtigt. Die Zugabe von 10^{-4} M L-Tryptophan erfolgte 6 Stunden vor dem jeweiligen Experiment.

2.4.2 Behandlung mit Melatonin

Um die Ursachen erhöhter Nachtwerte (s. Kap. Ergebnisse) zu überprüfen, wurde die Wirkung von Melatonin auf die Aktivität der Tryptophan-Aminotransferase untersucht. Melatonin wurde in einer Konzentration von 0,2 M in Dimethylsulfoxid (DMSO) vorgelöst und dann mit Medium verdünnt. Die Verabreichung von 10^{-4} M Melatonin erfolgte 3 Stunden vor der jeweiligen Aufarbeitung der Zellen. In den verwendeten Endkonzentrationen besitzt DMSO bei *Lingulodinium polyedrum* keine Effekte (Balzer & Hardeland, 1991a).

2.5 Messung von Kynurensäure im Kulturmedium

In diesen Experimenten wurde der Umsatz des als Substrat eingesetzten L-Kynurenins zu Kynurensäure fluorometrisch untersucht. Circadiane Phasen und exogene Lichtabhängigkeit wurden hierbei berücksichtigt.

2.5.1 Fluorometrie des Kynurensäure-Zink-Komplexes

Die Entstehung der Kynurensäure wurde mit Hilfe eines Spektrofluorophotometers (Amico-Bowmann, Nr.: JA-8965-E, mit ellipsoidalem Kondensationssystem) bei einer Anregungswellenlänge von 338 nm sowie einer Emissionswellenlänge von 398 nm verfolgt.

Zur Messung der Kynurensäure wurde die Methode von Shibata (1988) eingesetzt, die auf der fluorometrischen Detektion eines Kynurensäure-Zink-Komplexes beruht, welche eine um den Faktor fünfzig erhöhte Sensitivität im Vergleich zur Messung der unkomplexierten Kynurensäure besitzt (s. auch Bestätigung dieser Empfindlichkeit durch Swartz *et al.*, 1989).

Um die Fluoreszenz der Kynurensäure zu verstärken und damit die Sensitivität der Messung zu erhöhen, wurde den Ansätzen Zinkacetat in einer Konzentration von 0,5 M zugesetzt. Dies ermöglichte den sicheren Nachweis der Kynurensäure-Konzentration über einen Meßbereich von 0,004-20 µM. Es konnte in diesem Bereich eine lineare Beziehung zwischen Kynurensäure-Konzentration und relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU) nachgewiesen werden. So ergab eine Kynurensäure-Konzentration von 5 µM 32 RFU.

Einstellungen am Spektrofluorophotometer:

Meßmodus	Ratio
Photomultiplier	1
Spaltbreite	5
Sensitivität	1-100
Sensitivity Vernier	0
Response	3
Chopper	On

2.5.2 Prüfung auf chemischen und biologischen Umsatz von L-Kynurenin

Um eine mögliche chemische Umsetzung von L-Kynurenin zu Kynurensäure bereits im Kulturmedium in Abwesenheit der Organismen zu erfassen bzw. auszuschließen, wurde in einem Kontrollversuch L-Kynurenin in einer Konzentration von 10^{-4} M 18 h im Medium inkubiert. Die Messung der Fluoreszenz von L-Kynurenin im o.g. Ansatz nach 18 h sowie in einer Kontrolle mit frisch zugesetztem 10^{-4} M L-Kynurenin erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 365 nm und einer Emissionswellenlänge von 470 nm.

Die Fluoreszenz der Kynurensäure im o.g. Inkubationsgemisch und in einem Kontrollansatz mit 10^{-4} M Kynurensäure wurde in Abwesenheit von Zink bei einer Anregungswellenlänge von 338 nm und einer Emissionswellenlänge von 398 nm gemessen.

Zur Überprüfung des biologischen Umsatzes von L-Kynurenin zu Kynurensäure wurden zwei dichtgewachsene *Lingulodinium*-Kulturen mit jeweils einem Volumen von 150 ml 18 h mit 10^{-4} M bzw. 10^{-5} M L-Kynurenin inkubiert. Durch Filtration, wie unter 2.2.1 beschrieben, wurden die Zellen auf ein Volumen von ca. 2 ml eingengt und aus dem abfiltrierten Medium eine 1 ml Probe für die Messung des extrazellulären L-Kynurenin- sowie Kynurensäuregehalts entnommen. 750 μ l der Mediumprobe wurden 1:2 mit 0,5 M Zinkacetat in Na-Acetat-Puffer (0,1 M, pH 6,2) versetzt und nach 10-minütigem Stehenlassen bei $3700 \times g$ (Eppendorf, Modell 5417 C / R) 10 min zentrifugiert. Anschließend wurde 1 ml des Überstandes wie oben beschrieben fluorometrisch untersucht. Die eingengten Zellen wurden nach der Entnahme der Mediumprobe zweimal mit Medium gewaschen, um die noch vorhandenen Reste von L-Kynurenin und Kynurensäure zu entfernen. Nach Konzentrierung der Zellen auf ca. 1 ml wurden 750 μ l des Filtrats in ein Eppendorfgefäß überführt und zur Proteinfällung mit 750 μ l 0,4 N Perchlorsäure versetzt. Die Probe wurde nach 15-minütiger Komplettierung der Fällung auf Eis 10 min bei $3700 \times g$ zentrifugiert. Von dem Überstand wurde 750 μ l vorsichtig abgenommen und 1:2 mit 0,5 M Zinkacetat in Na-Acetat-Puffer (0,1 M, pH 6,2) versetzt. Nach einem 10-minütigen Stehenlassen des Ansatzes wurde dieser erneut bei $3700 \times g$ für 10 min zentrifugiert. Anschließend erfolgte die fluorometrische Untersuchung des Überstandes wie oben beschrieben.

2.5.3 Bildung und Freisetzung von Kynurensäure bei *Lingulodinium polyedrum*

Die Freisetzung von Kynurensäure durch *Lingulodinium polyedrum* ins Kulturmedium wurde nach 6-stündiger Inkubation der Zellen mit 10^{-4} M L-Kynurenin über einen Zeitraum von 24 h im LD 12:12, im LL und DD fluorometrisch untersucht.

Hierfür wurden 10 ml-Aliquots einer 10-11 Tage alten *Lingulodinium*-Kultur von 320 ml auf 32 Szintillationsröhrchen aufgeteilt.

Somit konnten zu acht unterschiedlichen Zeitpunkten vier Parallelansätze behandelt und gemessen werden. Beginnend um ZT 0 erfolgte die Zugabe von L-Kynurenin im Abstand von 3 h. Nach 6-stündiger Inkubation der Zellen mit 10^{-4} M L-Kynurenin wurden den jeweiligen Kulturen Proben von 1,5 ml entnommen und für die Messung weiterverarbeitet.

Die Zellen wurden durch 10-minütige Zentrifugation bei $3700 \times g$ (Eppendorf, Modell 5417 C / R) sedimentiert und für die Proteinbestimmung bei -75 °C eingefroren. Für die Messung der zinkabhängigen Fluoreszenz der gebildeten Kynurensäure wurden 750 μ l des Überstandes wie oben beschrieben verwendet (s. 2.5.1 und 2.5.2).

2.6 Oxidation von L-Kynurenin zu Kynurensäure durch H₂O₂ in Gegenwart und Abwesenheit von Peroxidase

Aminosäuren können als Substrate von Hämoperoxidasen fungieren (Chance & Maehly, 1968). Da auch L-Kynurenin eine Aminosäure darstellt, wurde ein etwaiger Umsatz mit Meerrettich-Peroxidase untersucht; eine hierdurch entstehende Iminosäure müßte nach Hydrolyse zur Ketosäure zu Kynurensäure zyklisieren. Hierfür wurde L-Kynurenin in Gegenwart von Peroxidase und H₂O₂ bei unterschiedlichen pH-Werten über einen Zeitraum von 2-2,5 h inkubiert und die Entstehung von Kynurensäure fluorometrisch (s. 2.5.1) verfolgt.

Reaktionsansatz:

6 ml	aqua dest. (pH 5,5) oder Tris-HCl-Puffer (0,2 M, pH 7,4; 8,0; 8,6)
1 ml	L-Kynurenin (10^{-3} M)
2 ml	Meerrettich-Peroxidase (100 Einheiten)
1 ml	H ₂ O ₂ (1 %)

Der Reaktionsansatz wurde in einem Schüttelwasserbad bei 25 °C 2,5 h inkubiert. Im Abstand von 30 min erfolgte jeweils eine Probennahme mit einem Volumen von 1 ml.

Nach einer 10-minütigen Zentrifugation der jeweiligen Probe bei $3700 \times g$ wurden 750 μl des Überstandes wie oben beschrieben für die Fluorometrie in Gegenwart von Zink aufgearbeitet.

Bei dem physiologischen pH-Wert von 7,4 wurde auch die Möglichkeit getestet, ob L-Kynurenin in Abwesenheit von Peroxidase bereits durch H_2O_2 zu Kynurensäure oxidiert werden kann. Die Prozedur unterschied sich nur insoweit, als Peroxidase durch Tris-HCl-Puffer (0,2 M, pH 7,4) ersetzt wurde.

2.7 Bildung von Kynurensäure unter Beeinflussung der H_2O_2 -Produktion durch CCCP, Paraquat und DCMU im Homogenat von *Lingulodinium polyedrum*

Um den Einfluß der Wasserstoffperoxid-Produktion durch den photosynthetischen Elektronentransport auf die Kynurensäure-Bildung aus L-Kynurenin zu untersuchen, wurden Effekte von CCCP, Paraquat und DCMU in lichtexponierten Homogenaten geprüft. Homogenate wurden intakten Zellen vorgezogen, um Diffusionsbarrieren für die drei genannten Substanzen zu minimieren.

Pro Ansatz wurden je 200 ml einer dichtgewachsenen *Lingulodinium*-Kultur wie unter 2.2.1 filtriert. Der eingengten Zellsuspension wurden 2-3 ml entnommen, in einen Potter-Elvehjem Glashomogenisator mit Glaspistill überführt und bei mittlerer Geschwindigkeit in 8-10 Durchgängen homogenisiert.

Inkubationsansatz (Analyse):

6 ml	Tris-HCl-Puffer (0,2 M, pH 7,4)
1 ml	L-Kynurenin (10^{-3} M)
1 ml	CCCP ($2,5 * 10^{-4}$ M) oder Paraquat (10^{-2} M) oder DCMU ($5 * 10^{-4}$ M)
2 ml	<i>Lingulodinium</i> -Homogenat

Die Kontrolle enthielt Puffer anstelle von CCCP, Paraquat oder DCMU. Sowohl die Analysen als auch die Kontrollen wurden jeweils als drei Parallelen angesetzt.

Die Ansätze wurden 4 h unter ständigem Schütteln mit 63.000 Lux belichtet. Sofort nach Reaktionsstart sowie nach 1, 2, 3, und 4 h Belichtungszeit wurden jeweils 1,5 ml entnommen und zur Pigmentextraktion und Proteinfällung mit 1,5 ml Ethylacetat versetzt. Nach 10-minütiger Komplettierung der Fällung auf Eis wurde die untere, wäßrige Phase mit einer Pasteurpipette vorsichtig abgesogen und 10 min bei $10.200 \times g$ abzentrifugiert. 750 μ l des Überstandes wurden 1:2 mit 0,5 M Zinkacetat im Na-Acetat-Puffer (0,1 M, pH 6,2) versetzt und kurzzeitig stehengelassen. Nach einer erneuten Zentrifugation der Probe (10 min bei $10.200 \times g$) wurde 1 ml des Überstandes entnommen und fluorometrisch gemessen.

2.8 Untersuchungen der radikalfangenden Eigenschaften von Kynurensäure und ihrer Analoga

2.8.1 Reaktionen mit Hydroxylradikalen und Reduktion des ABTS-Kationradikals

Kynurensäure und ihre Analoga wurden auf ihre Eigenschaften als Hydroxylradikalfänger in einem Test untersucht, der auf der Competition mit ABTS [2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonat)] um diese reaktive Sauerstoffspezies beruht und sich anhand der Bildung von ABTS-Kationradikalen photometrisch verfolgen läßt. Ferner wurde die Fähigkeit dieser Metaboliten ABTS-Kationradikale zu reduzieren studiert. Für die Bestimmung wurde eine Modifikation der Methode von Poeggeler *et al.* (1996) angewandt.

Hydroxylradikale abstrahieren Elektronen aus ABTS, welches hierdurch in das stabile, intensiv grünfarbene ABTS-Kationradikal ($\text{ABTS}^{\cdot+}$) übergeht. Da die Färbung des ABTS-Kationradikals pH-abhängig ist und sensitiv nur im sauren Milieu nachzuweisen ist, wurde bei einem pH von 4,5 gearbeitet; da alle einschlägigen Puffersubstanzen, gerade auch bei den hohen für Pufferung einzusetzenden Konzentrationen Hydroxylradikale fangen, wurden ungepufferte Systeme unter Verwendung von pH-adjustiertem Wasser bzw. Lösungen eingesetzt (Hardeland *et al.*, 1999b).

Die für die Reaktion wichtigen Hydroxyl- und Hydroperoxyradikale wurden mit Hilfe eines Fenton-Reagenz im Sauren erzeugt (Christen & Vögtle, 1989).

Die Zunahme bzw. Abnahme des gebildeten, grügefärbten $\text{ABTS}^{\cdot+}$ wurde über einen Zeitraum von 20 min mit Hilfe eines Spektralphotometers (Zeiss, PM 7) bei einer Wellenlänge von 420 nm verfolgt.

Reaktionsansatz für Konkurrenzmessung:

0,9 ml	aqua dest. (pH 4,5)
0,15 ml	ABTS (1 mM)
0,15 ml	FeSO_4 (0,5 mM)
0,15 ml	der zu testenden Substanz (1 mM; pH 4,5)
0,15 ml	H_2O_2 (10 mM)

Reaktionsansatz für Reduktionsmessung:

0,9 ml	aqua dest. (pH 4,5)
0,15 ml	ABTS (1 mM)
0,15 ml	FeSO_4 (0,5 mM)
0,15 ml	H_2O_2 (10 mM)

Start der Reaktion, nach 5 min Zugabe:

0,15 ml	der zu testenden Substanz (1 mM; pH 4,5)
---------	--

Indol-3-pyruvat, Kynurensäure, 4-Hydroxychinolin, Chinaldinsäure und Xanthurensäure wurde in beiden Reaktionen in einer Konzentration von 1 mM eingesetzt. Die Substanzen wurden in einer Konzentration von 50 mM in Ethanol vorgelöst und mit Wasser weiterverdünnt, wobei der pH-Wert der Lösungen mit verdünnter NaOH (außer bei 4-Hydroxychinolin) auf 4,5 eingestellt wurde. Die lichtempfindliche ABTS-Lösung wurde unter Rotlicht angesetzt und im Dunkeln bei 20 °C im Wasserbad aufbewahrt. Der Reaktionsansatz der Kontrolle enthielt das jeweilige Ethanol/Wasser-Gemisch anstelle der zu untersuchenden Substanz. Analysen und Kontrollen wurden in jeweils zwei Parallelen angesetzt.

2.8.2 Reaktionen mit Superoxidationradikalen

Die Fähigkeit der Kynurensäure und ihrer Analoga Superoxidationradikale ($O_2^{\cdot-}$) zu fangen, wurde anhand der Autoxidation von Hämatoxylin untersucht. Dieser Test beruht auf dem Umsatz von Hämatoxylin mit Superoxidationen zu Hämatein (Martin *et al.*, 1987). Eine Variante der von diesen Autoren beschriebenen Methode zur Messung der Superoxiddismutase (Antolín *et al.*, 1997) wurde weiter abgewandelt, um das Fangen von Superoxidationen zu studieren (Burkhardt *et al.*, 1999). Die Bildung des stabilen, rotviolettgefärbten Hämateins kann photometrisch bei 560 nm verfolgt werden. Bei dem Einsatz von Kynurensäure und ihren Analoga können diese in Konkurrenz um $O_2^{\cdot-}$ treten, wodurch die Bildung des Hämateins gehemmt wird.

Da die Bildung von Superoxidationen vom Sauerstoffpartialdruck abhängt, wurde der Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 7,5 mit 0,1 mM EDTA) mit Hilfe einer Aquariumpumpe zunächst 30 min bei 4 °C zur Sauerstoffsättigung begast und nachfolgend 30 min vor Versuchsbeginn bei 25 °C im Wasserbad equilibriert. Die lichtempfindliche Hämatoxylin-Lösung (5 mM, in 50 mM KH_2PO_4) wurde unter Rotlicht angesetzt und bis zum Reaktionsstart im Dunkeln auf Eis aufbewahrt.

Reaktionsansatz:

2,825 ml	Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 7,5 mit 0,1 M EDTA)
0,1 ml	der zu testenden Substanz (Konz. s.u.)
0,075 ml	Hämatoxylin (5 mM in KH_2PO_4)

Der Ansatz zur Messung der Autoxidation von Hämatoxylin enthielt 2,925 ml Puffer und 0,075 ml Hämatoxylin (5 mM in KH_2PO_4). Kynurensäure, 4-Hydroxychinolin, Chinaldinsäure und Xanthurensäure wurde in einer Konzentration von 1 mM eingesetzt. Die Zugabe von Indol-3-pyruvat erfolgte in verschiedenen Konzentrationen (1 mM, 2 mM, 3 mM und 4 mM).

Das gebildete Hämatein wurde über 10 min bei 560 nm in einem temperierten Spektralphotometer (Zeiss, PM 7), bei 25 °C jeweils in zwei Parallelansätzen gemessen.

Die Hemmung der Hämatein-Bildung durch Indol-3-pyruvat wurde zu Vergleichszwecken in fiktive SOD-Einheiten umgerechnet: Eine SOD-Einheit ist definiert als 50 %ige Hemmung der Reduktion von Cytochrom c in einem gekoppelten Xanthin/Xanthinoxidase-System bei pH 7,8 und 25 °C in 3 ml Reaktionsvolumen; dies entspricht im Hämatoxylin-Autoxidationssystem unter den gewählten Bedingungen einer Extinktionsdifferenz von 0,039 nach 10 min bei 560 nm (Burkhardt *et al.*, 1997).

2.9 Untersuchungen zum Abbau von 2-Desoxyribose in Gegenwart von Hydroxylradikalfängern

2-Desoxyribose kann durch die Interaktion mit den hochreaktiven Hydroxylradikalen oxidativ gespalten werden. Die interagierenden Hydroxylradikale können außer mit klassischen Methoden, wie ionisierender Strahlung (Bucknall *et al.*, 1978) oder einem Fenton-System (Gutteridge, 1981), auch durch Belichtung von N-Hydroxy-2-pyridinthion (Hess & Dix, 1992) oder von δ -Aminolävulinsäure generiert werden; die genannten photokatalytischen Methoden vermeiden die starke zeitliche Dynamik der Radikalbildung, wie sie für Übergangsmetallhaltige Systeme typisch sind.

Der oxidative Abbau von 2-Desoxyribose mittels Hydroxylradikalen resultiert in der Bildung von Malondialdehyd (MDA), welches durch die Interaktion mit Thiobarbitursäure (TBA) zu einem pinkfarbenen Addukt umgesetzt wird (Gutteridge, 1981; Gutteridge, 1987). Die Zunahme des gebildeten Farbstoffs kann bei einer Wellenlänge von 532 nm photometrisch verfolgt werden.

2.9.1 Einsatz von N-Hydroxy-2-pyridinthion zur Generierung von Hydroxylradikalen

Die Bestrahlung von N-Hydroxy-2-pyridinthion (HPT), einer etablierten Quelle von Hydroxylradikalen (Boivin *et al.*, 1990), mit sichtbarem Licht führt zum Zerfall in Hydroxyl- und Thiylradikale.

Im Gegensatz zu der klassischen Fenton-Reaktion, bei der die Hydroxylradikalbildung eine kurze, "burst"-artige Charakteristik aufweist, erfolgt die Generierung durch HPT kontinuierlich während der gesamten Belichtung. Die unter Belichtung von HPT erzeugten Hydroxylradikale wurden in Anlehnung an Hess & Dix (1992) zur Oxidation von 2-Desoxyribose eingesetzt. Basierend auf diesem Verfahren wurden Kynurensäure, Xanthurensäure sowie Melatonin auf ihre Eigenschaften als Hydroxylradikalfänger untersucht, also auf ihre Fähigkeit, mit 2-Desoxyribose um die Hydroxylradikale effizient zu konkurrieren.

Reaktionsansatz I :

8 ml	Borat-Puffer (50 mM, pH 8,0)
1 ml	2-Desoxyribose (100 mM)
1 ml	N-Hydroxy-2-pyridinthion (50 mM)

Reaktionsansatz II :

7 ml	Borat-Puffer (50 mM, pH 8,0)
1 ml	2-Desoxyribose (100 mM)
1 ml	der zu testenden Substanz (10 mM)
1 ml	N-Hydroxy-2-pyridinthion (50 mM)

Parallel zum Reaktionsgemisch I wurden zwei Kontrollen angesetzt, wobei die eine 9 ml Borat-Puffer und 1 ml HPT und die andere 9 ml Borat-Puffer und 1 ml 2-Desoxyribose enthielt. Die Kontrolle für den Reaktionsansatz II enthielt 8 ml Borat-Puffer, 1 ml 2-Desoxyribose und 1 ml der zu testenden Substanz. Die Belichtung der Reaktionsansätze und der jeweiligen Kontrollen erfolgte unter ständigem Schütteln mit Hilfe eines Projektors bei einer Lichtstärke von 75.000 Lux. Vor Reaktionsstart sowie über einen Zeitraum von 4 h wurde im Abstand von 30 min jeweils eine Probe mit einem Volumen von 1 ml entnommen. Da die Bildung des Farbstoffs die Gegenwart von Thiobarbitursäure im sauren Milieu erfordert, wurden die Proben mit 740 µl Trichloressigsäure (2,8 %) und 740 µl Thiobarbitursäure (1 %) versetzt.

Nach gründlichem Durchmischen wurden die Ansätze 15 min bei 100 °C in einem Wasserbad inkubiert. Nach 15-minütigem Stehenlassen der Proben bei Raumtemperatur erfolgte die photometrische Messung des gebildeten Farbstoffs bei 532 nm.

2.9.2 Einsatz von δ -Aminolävulinsäure zur Generierung reaktiver Sauerstoffspezies

Basierend auf der Photooxidation von δ -Aminolävulinsäure (ALA) als Quelle reaktiver Sauerstoffspezies wurde die Oxidation der Kynurensäure nach dem bereits unter 2.9.1 beschriebenen Verfahren weiterführend untersucht. ALA wurde analog zu HPT in einer Konzentration von 50 mM eingesetzt. Parallel zur Photooxidation wurde die radikalische Destruktion von 2-Desoxyribose unter dem Einfluß von ALA und Kynurensäure im Dunkeln entsprechend gemessen. Der Versuch wurde in Zusammenarbeit mit A. Coto-Montes durchgeführt.

2.10 Chemilumineszenzmessung

Die Verläufe der Radikalreaktionen von Indol-3-pyruvat, Kynurensäure und einigen strukturverwandten Chinolinen wie Xanthurensäure, Chinaldinsäure und 4-Hydroxychinolin wurden anhand der Messung der Chemilumineszenz mit Hilfe eines auf 20 °C temperierten Szintillationszählers (Packard, Modell 3330) verfolgt.

Einstellung des Szintillationszählers:

Preset time :	1 min
Preset counts:	900.000
Gain :	70 %
Window :	40-140
Coincidence :	off

Die Messungen erfolgten im Betriebsmodus „repeat“. Über einen an den Szintillationszähler gekoppelten Prozeßrechner wurden die Daten des entsprechend eingestellten Kanals aufgenommen und über einen PC abgerufen. Aus den Daten wurden die Mediane über jeweils 10 min ermittelt.

Indol-3-pyruvat, Kynurensäure und ihre Analoga wurden in einem alkalischen H₂O₂-System oxidiert, das freie Radikale, insbesondere Superoxidanionradikale, generiert. Die Oxidationsverläufe wurden in diesem System unter Verwendung von Hämin als Katalysator untersucht, z.T. auch in dessen Abwesenheit. Radikalreaktionen mancher Indole und Substanzen vergleichbarer Reaktivität werden durch komplexiertes Eisen katalysiert (Fuhrberg & Hardeland, 1994a,b; Hardeland & Fuhrberg, 1996); Hämin vermag sowohl die Interaktion mit Superoxidanionen zu vermitteln als auch über die Fenton-Reaktion Hydroxylradikale zu generieren. Im Verlauf der Oxidation der oben genannten Verbindungen mit freien Radikalen wird ein kurzlebige Zwischenprodukt gebildet, bei dessen Zerfall ein Photon emittiert wird.

Reaktionsansatz I:

0,7 ml	Glycylglycin-NaOH-Puffer (0,1 M, pH 8,0)
0,1 ml	Häminchlorid ($5 \cdot 10^{-5}$ M)
0,1 ml	der zu testenden Substanz ($4 \cdot 10^{-3}$ M)
0,1 ml	H ₂ O ₂ 10 %

Reaktionsansatz II:

0,8 ml	der zu testenden Substanz in aqua dest. ($5 \cdot 10^{-4}$ M, mit verd. NaOH auf pH 9,0 eingestellt)
0,1 ml	aqua dest. oder DMSO (1 M) oder Tiron ($2 \cdot 10^{-2}$ M)
0,1 ml	H ₂ O ₂ 10 %

2.10.1 Einsatz konkurrierender Radikalfänger

Im weiteren wurde die Wirkung von Dimethylsulfoxid (DMSO), einem Hydroxylradikalfänger, und di-Natrium-4,5-dihydroxybenzol-1,3-sulfonat (Tiron), einem Superoxidanionradikalfänger, auf die Oxidation der unter 2.10 genannten Verbindungen untersucht.

Bei der Oxidation der Kynurensäure und Indol-3-pyruvat in dem unter 2.10 beschriebenen System (Reaktionsansatz I) mit Hämin als Katalysator erfolgte die Zugabe von DMSO bzw. Tiron erst nach einiger Reaktionszeit, da die dynamischen Reaktionsverläufe ein Erreichen hoher Emissionsraten erforderten. DMSO wurde dem jeweiligen Ansatz mehrfach in einer Menge von 50 µl zugesetzt, wobei die erstmalige Zugabe von DMSO eine Endkonzentration von $4,76 \cdot 10^{-2}$ M ergab. 100 µl Tiron wurden einmalig in einer Konzentration von $2,2 \cdot 10^{-2}$ M (Endkonzentration: $2 \cdot 10^{-3}$ M) verabreicht.

Aufgrund der andersartigen Kinetik, mit oft vom Start an abfallenden Verlauf, in Abwesenheit von Hämin (s. 2.10, Reaktionsansatz II) wurden DMSO oder Tiron dem Oxidationsgemischen vor Reaktionsbeginn zugesetzt. Die Endkonzentration von DMSO betrug 0,1 M, die von Tiron $2 \cdot 10^{-3}$ M.

2.11 Fluorometrische Untersuchungen zur Oxidation von Indol-3-pyruvat, Kynurensäure und deren Analoga

Nach Ablauf der oxidativen Reaktionen (1 Tag Inkubation) wurden die Fluoreszenz-emissionsspektren von Edukten und Produkten gemessen (Amico-Bowmann, Nr.:JA-8965-E). Indol-3-pyruvat wurde in dem unter 2.10 beschriebenen Reaktionsansatz I mit Hämin als Katalysator oxidiert, die anderen Substanzen im Reaktionsansatz II. Da das im alkalischen Milieu enolisierte Indol-3-pyruvat keine Fluoreszenz zeigte, wurden nur die Emissionsspektren des entstandenen Produkts bei unterschiedlichen Anregungswellenlängen aufgezeichnet. Auch die Fluoreszenz der Chinaldinsäure war nach einem Tag Oxidationszeit nicht meßbar, so daß nur das Emissionsspektrum ihres Produktes aufgezeichnet wurde.

2.12 Biolumineszenzmessung an *Lingulodinium polyedrum*

In einem auf 20 °C temperierten Szintillationszähler (Packard, Modell 3330) wurde die Auswirkung von 3-Hydroxykynurenin auf die Lichtemission des biolumineszierenden Dinoflagellaten *Lingulodinium polyedrum* untersucht. In den *Lingulodinium*-Kulturen lassen sich bei den Biolumineszenzmessungen zwei circadiane Rhythmen unterscheiden: Spontanes, diskontinuierliches Blitzen mit höchster Rate in der ersten Hälfte oder gegen Mitte der Dunkelzeit und spontanes, kontinuierliches Glimmen mit einem Maximum gegen Ende der Scotophase (Krasnow *et al.*, 1981). Schwacher und starker oxidativer Stress führen zu unterschiedlichen Veränderungen der Biolumineszenzmuster (Antolín & Hardeland, 1997; Antolín *et al.*, 1997; Burkhardt *et al.*, 1998; Hardeland *et al.*, 1999a).

Die Einstellungen am Szintillationszähler und die Auswertung der Daten waren wie unter 2.10 beschrieben. Die Messansätze enthielten 1 ml Zellkultur in einem Gesamtvolumen von 10 ml. Die Zellen wurden um ZT 12 in DD überführt; 3-Hydroxykynurenin wurde zum selben Zeitpunkt in Endkonzentrationen von 10^{-4} M, $2 \cdot 10^{-4}$ M und $5 \cdot 10^{-4}$ M zugegeben. Der Versuch wurde in Zusammenarbeit mit R. Hardeland durchgeführt.

2.13 Bestimmung der Xanthurensäure durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) mit elektrochemischer Detektion (ECD)

Diese hochsensitive Meßmethode ermöglicht sowohl die Detektion von sehr geringen Substanzmengen mit großer Genauigkeit als auch die Bestimmung mehrerer Metabolite aus derselben Probe.

2.13.1 Behandlung von *Lingulodinium polyedrum* mit 3-Hydroxykynurenin

Ausgehend davon, daß 3-Hydroxykynurenin direkter Vorläufer der Xanthurensäure ist, wurden Zellen mit 3-Hydroxykynurenin inkubiert und dieser Metabolit ebenso wie sein Produkt intrazellulär und extrazellulär durch HPLC mit ECD erfaßt.

Die Zellen wurden mit 10^{-5} M 3-Hydroxykynurenin im LD 12:12 und im DD inkubiert, wobei die Überführung in DD zugleich mit der Zugabe von 3-Hydroxykynurenin erfolgte. Die Bestimmung der gebildeten Xanthurensäure wurde nach unterschiedlichen Inkubationszeiten der Zellen durchgeführt.

2.13.2 Probenaufbereitung

Alle Schritte der Probenaufbereitung wurden im Dunkeln oder unter schwachem Rotlicht durchgeführt. Für die extrazelluläre Xanthurensäure-Bestimmung wurden jeweils 10 ml einer 7-10 Tage alten, dichtgewachsenen *Lingulodinium*-Kultur wie unter 2.2.1 beschrieben filtriert, wobei die Zellen auf ein Volumen von 1 ml eingengt und für die Proteinbestimmung bei -75 °C eingefroren wurden. Das abfiltrierte Medium konnte nach entsprechender Verdünnung mit Eluent direkt in die HPLC-Anlage injiziert werden. Aufgrund der hohen extrazellulären Konzentration von 3-Hydroxykynurenin in den ersten 6 h der Inkubation erfolgte die Probenaufbereitung zur Messung der jeweiligen Mediumproben erst nach 8, 10, 12, 16, 20 und 24 h Inkubationszeit.

Die Probenaufbereitung für die intrazelluläre Xanthurensäure-Bestimmung erfolgte nach 2, 4, 8 und 24 h Inkubationszeit. Hierfür wurde jeweils eine ebenfalls 7-10 Tage alte, dichtgewachsene *Lingulodinium*-Kultur mit einem Volumen von 300 ml verwendet. Die Kultur wurde wie unter 2.2.1 beschrieben filtriert und dabei auf ein Volumen von ca. 2 ml eingengt. Nachdem die Zellen mit 2,9 % NaCl durch Filtration gewaschen wurden, erfolgte ein weiterer Filtrationsschritt mit Tris-HCl-Puffer (0,6 M, pH 8,4), wonach die Zellen auf ein Volumen von 1 ml konzentriert wurden. Die eingengte Zellsuspension wurde sofort in einem mit flüssigem Stickstoff gefüllten Mörser schockgefroren und zu einem feinem Pulver zerrieben. Das Pulver wurde in Eppendorfgefäße gefüllt und bis zur weiteren Verarbeitung bei -75 °C gelagert.

Zur Extraktion der Metaboliten wurden 300 mg des Pulvers mit 300 μ l 0,4 N Perchlorsäure versetzt, vermischt und zur vollständigen Proteinfällung 15 min bei 4 °C stehengelassen. Anschließend wurde zweimalig 10 min bei $12000 \times g$ zentrifugiert (Eppendorf, Modell 5417 C), wobei jeweils der Überstand weiterverarbeitet wurde.

Das Sediment aus dem ersten Zentrifugationsschritt wurde bei $-75\text{ }^{\circ}\text{C}$ für die Proteinbestimmung aufbewahrt. Der Überstand aus der zweiten Zentrifugation wurde mit Eluent 1:100 verdünnt und in die HPLC-Anlage injiziert.

2.13.3 Aufbau der HPLC-ECD-Apparatur

Mittels Ion-Pair-Reserved-Phase-HPLC konnten 3-Hydroxykynurenin und Xanthurensäure aufgetrennt werden. Die HPLC-Anlage der Firma Gynkotec (Gynkotec GmbH; Germering) war mit folgenden Komponenten ausgestattet:

- einer HPLC-Pumpe mit integriertem Pulsationsdämpfer (HPLC High Precision Pump, Modell M480 der Firma Gynkotec; Germering)
- einer manuellen 200 μl umfassenden Probenschleife gekoppelt mit einem manuellen Probenaufnahmesystem (Syringe Loading Sample Injektor; Modell 9125 der Firma Rheodyne; Cotati; California; U.S.A.),
- einer 8,5 cm langen Vorsäule (Außendurchmesser: 1 cm), gefüllt mit Säulenmaterial Spherisorb RP 18; Korngröße 30 μm (Merck; Darmstadt),
- einer Trennsäule (Länge: 25 cm, Innendurchmesser 0,46 cm), gefüllt mit Spherisorb ODS 1, Korngröße 5 μm (CS-Chromatographie Service GmbH; Langerwehe),
- und einem Säulenofen, der für die Aufrechterhaltung der vorgegebenen Temperatur von $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ verantwortlich war (Peltier-Kolonnenhermostat STH-585 der Firma Gynkotec; Germering).

Der elektrochemische Detektor (EP 30; Biometra, Göttingen) wurde mit einem Oxidationspotential von 900 mV, bei einer Sensitivität von 8 nA und einer Filterfrequenz von 10 s betrieben. Die Flußrate des Eluenten betrug 0,5 ml/min, der an der Säule anliegende Druck 42-43 bar. Gegen äußere Temperatureinflüsse abgeschirmt befand sich der elektrochemische Detektor in zwei ineinandergestellten Styropor-Kästen. Der innere Styropor-Kasten, das Probenaufnahme-System sowie sämtliche Probenschläuche waren durch ein Kupfernetz elektrisch abgeschirmt. Alle Komponenten der HPLC-Anlage waren geerdet.

Über einen PC, der mit der Software Gynkosoft Chromatographie-Datensystem (Version 4.22) ausgestattet war, erfolgte die Aufnahme und Auswertung der Meßdaten.

2.13.4 Zusammensetzung und Begasung des Eluenten

Es wurde ein modifizierter Eluent nach Poeggeler *et al.* (1991) eingesetzt: 8 % Methanol, 3,75 g/l Natriumdihydrogenphosphat, 11,25 g/l Citrat, 320 mg/l Octansulfonsäure und 32 mg/l EDTA; hierfür wurde ausschließlich doppelt destilliertes Wasser verwendet. Die anderen Chemikalien besaßen HPLC-Reinheitsgrad. Der Eluent wurde vor dem Gebrauch 15 min mit Helium begast, um gelösten Sauerstoff auszutreiben.

2.13.5 HPLC-Kalibrierung durch externe Standards

Die Meßapparatur wurde durch Injektion definierter Mengen Standardsubstanz kalibriert, um über die Integration ihrer Peakflächen zunächst eine Eichgerade zu erstellen und darüber die Mengen an Xanthurensäure zu berechnen.

2.14 Bestimmung der Kynurensäure und ihres Produktes durch HPLC mit UV-Detektion

Die Kynurensäure wurde in dem unter 2.10 beschriebenen Reaktionsansatz II ca. 20 h oxidiert. Für die Messung wurden 200 µl des Oxidationsansatzes direkt, ohne Verdünnung in die HPLC-Anlage injiziert.

Die bei diesen Experimenten verwendete HPLC-Anlage der Firma Jasco war mit folgenden Komponenten ausgestattet: Pumpe: Jasco, PU-1580; Detektor: Jasco, CD-995; UV-Detektor: Jasco, UV-1570 M; Mischkammer: Jasco, LG-1580-02; Trennsäule: Knauer 3 x 250 mm, Nukleosil 100 C 18. Das Laufmittelsystem bestand aus 9 Teilen 0,1 % Phosphorsäure und 1 Teil Acetonitril. Die Trennung erfolgte isokratisch mit einer Flußrate von 0,6 ml/min. Die Detektion wurde bei Wellenlängen von 260 und 370 nm durchgeführt. Die Aufnahme und Auswertung der Meßdaten erfolgte über einen PC, der mit der Software Jasco-Borwin Chromatographie-Datensystem (Version 1.50) ausgestattet war. Die Bestimmung wurde in Zusammenarbeit mit M. Arnold durchgeführt.

2.15 Proteinbestimmung

Die Messung des Proteingehalts erfolgte nach der Methode von Lowry *et al.* (1951).

3. Ergebnisse

3.1 Tagesgänge der Tryptophan- und der Kynurenin-Aminotransferase von *Lingulodinium polyedrum* im LD 12:12

Der Tagesverlauf der Tryptophan-Aminotransferase weist im LD 12:12 ein ausgeprägtes Maximum kurz nach Beginn der Scotophase (ZT 15) auf, mit einer ca. zweifach höheren Aktivität als zu den übrigen Tageszeiten (Abb. 2). Nach dem Absinken der Aktivität in der zweiten Hälfte der Dunkelphase erfolgt ein langsamer Anstieg, der in einem zweiten, schwach ausgeprägten Maximum in der Mitte der Photophase (ZT 6) endet. Bis zum Beginn der Scotophase nimmt die Aktivität kontinuierlich ab. Die niedrigsten Enzymaktivitäten wurden bei ZT 12 und ZT 21 gemessen. Der statistische Vergleich der Maxima und Minima ergab im t-Test signifikante Unterschiede mit folgenden p-Werten:

ZT 6 mit ZT 12	:	$p < 0,025$
ZT 6 mit ZT 21	:	$p < 0,05$
ZT 15 mit ZT 12	:	$p < 0,01$
ZT 15 mit ZT 21	:	$p < 0,01$

Somit ist für die Aktivität der Tryptophan-Aminotransferase ein Tagesrhythmus mit bimodalem Verlauf nachweisbar.

Abb. 3 zeigt den Tagesgang der Kynurenin-Aminotransferase im LD 12:12. Die ermittelten Daten zeigen eine sehr hohe Variabilität, die auch anhand der Bandbreite der Standardfehler zu erkennen ist. Das Hauptmaximum befindet sich zu Beginn der Photophase (ZT 3), worauf ein steiler Abfall der Aktivität in der zweiten Hälfte der Lichtzeit folgt. Der Anstieg zu Beginn der Dunkelphase führt zu einem zweiten Maximum in der Mitte der Scotophase (ZT 18). Die niedrigsten Enzymaktivitäten wurden um ZT 12 und ZT 21 gemessen.

Der statistische Vergleich der Maxima und Minima mittels t-Test führte zu nachfolgenden p-Werten:

ZT 3 mit ZT 12	:	$p < 0,05$
ZT 3 mit ZT 21	:	$p < 0,05$
ZT 18 mit ZT 12	:	$p < 0,125$
ZT 18 mit ZT 21	:	$p < 0,125$

Somit konnten zwischen einigen Datenpunkten schwach signifikante Unterschiede festgestellt werden. Folglich ist nach den Kriterien von t-Test und Standardfehler eine Tagesrhythmik wahrscheinlich, mit vermutlich bimodalem Verlauf.

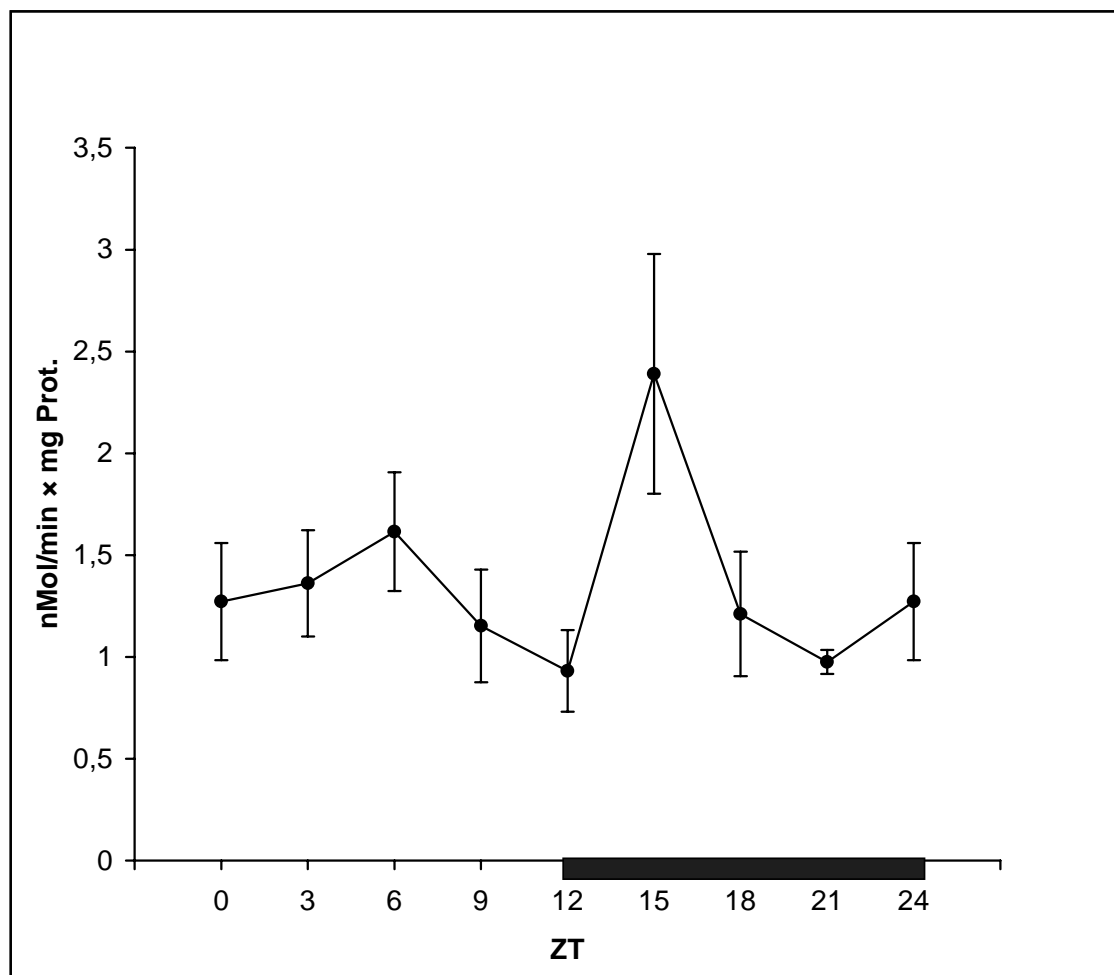


Abb. 2: Tagesrhythmus der Tryptophan-Aminotransferase im LD 12:12.

Ordinate: nMol Indol-3-pyruvat/min \times mg Protein; Abzisse: Zeitgeber-Zeit = ZT [h];

schwarzer Balken: Scotophase; vertikale Linien: Standardfehler.

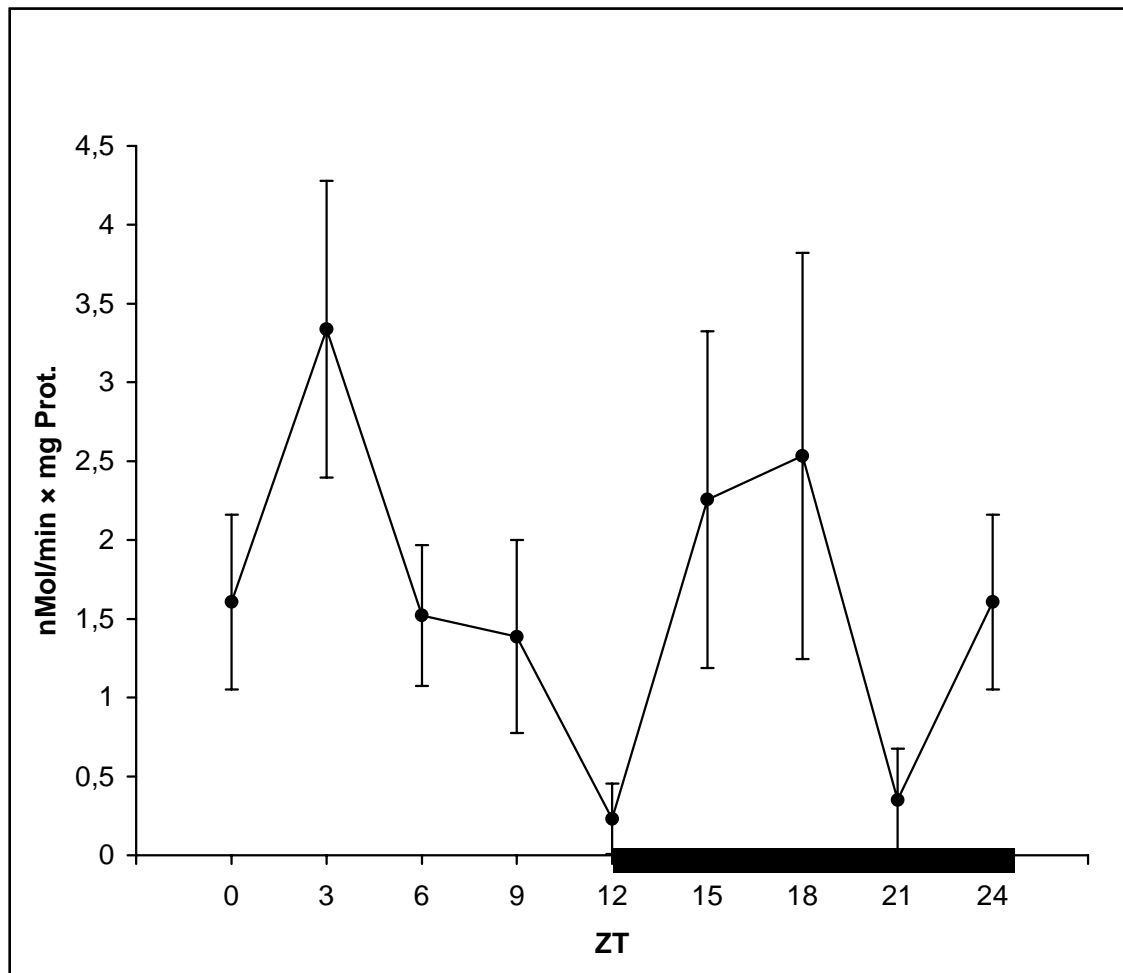


Abb. 3: Tagesrhythmus der Kynurenin-Aminotransferase im LD 12:12.

Ordinate: nMol Kynurensäure/min \times mg Protein; weitere Details wie in Abb. 2.

3.2 Effekte von Tryptophan, Melatonin und LL auf die Tryptophan-Aminotransferase zu verschiedenen Tageszeiten

Die Einflüsse von Dauerlicht sowie zwei regulatorisch relevanten Indolmetaboliten, Tryptophan und Melatonin sind in Abb. 4 dargestellt. Das zu ZT 15 bzw. CT 15 erscheinende Hauptmaximum war im LL im Vergleich zu LD 12:12 leicht, aber nicht signifikant erniedrigt. Die ermittelten Enzymaktivitäten am Ende der subjektiven Nacht (CT 21) lagen dagegen deutlich höher als die im LD gemessenen. Die niedrigsten Aktivitäten traten, analog zu denen im LD, in der zweiten Hälfte des subjektiven Tages auf (ZT 9/CT 9).

Die Inkubation mit 10^{-4} M L-Tryptophan, einer noch gut verträglichen Dosis der Aminosäure (Burkhardt *et al.*, 1995; Burkhardt & Hardeland, 1996), führte zu Änderungen im zeitlichen Muster der Tryptophan-Aminotransferase. In der zweiten Hälfte der Photophase bewirkte ein Überangebot des Substrats eine deutliche Erniedrigung, insbesondere zu ZT 9 (Abb. 4), in geringerem Umfang auch zu ZT 6 und ZT 12 (nicht dargestellt). Zur Zeit des Hauptmaximums blieb die Herunterregulierung gering. In der Mitte der Scotophase dagegen, also einer Zeit höchster Stickstoffaufnahme (Roenneberg & Rehman, 1996), Proteinsynthese (Schröder-Lorenz & Rensing, 1987) und vermutlich auch Aminosäurebildung, führte Tryptophan zu Erhöhungen der Aminotransferase-Aktivität, die nahezu denen des normalen Maximums entsprachen. Es sei an dieser Stelle erwähnt, daß die Aktivität der Kynurenin-Aminotransferase durch L-Tryptophan nur geringfügig gesteigert wurde (nicht dargestellt), bei Annahme einer Fluxlimitierung durch Tryptophan also keine Substratinduktion dieses letzteren Enzyms von Bedeutung sein sollte.

Die erhöhten Nachtwerte der Tryptophan-Aminotransferase führten zu der Vermutung, daß Melatonin, welches ca. 1,5 h vorher seinen Gipfel erreicht (Poeggeler *et al.*, 1991), eventuell dieses phasenkorrelierte Enzym induzieren könnte. Die Zugabe von 10^{-4} M Melatonin, einer Dosis, die innerhalb von 3 Stunden ein anderes Enzym des Indolstoffwechsels induziert (Hardeland *et al.*, 1997a), erbrachte jedoch weder eine Änderung des Hauptmaximums noch nennenswerte Steigerungen zu ZT 9 oder ZT 21 (Abb. 4).

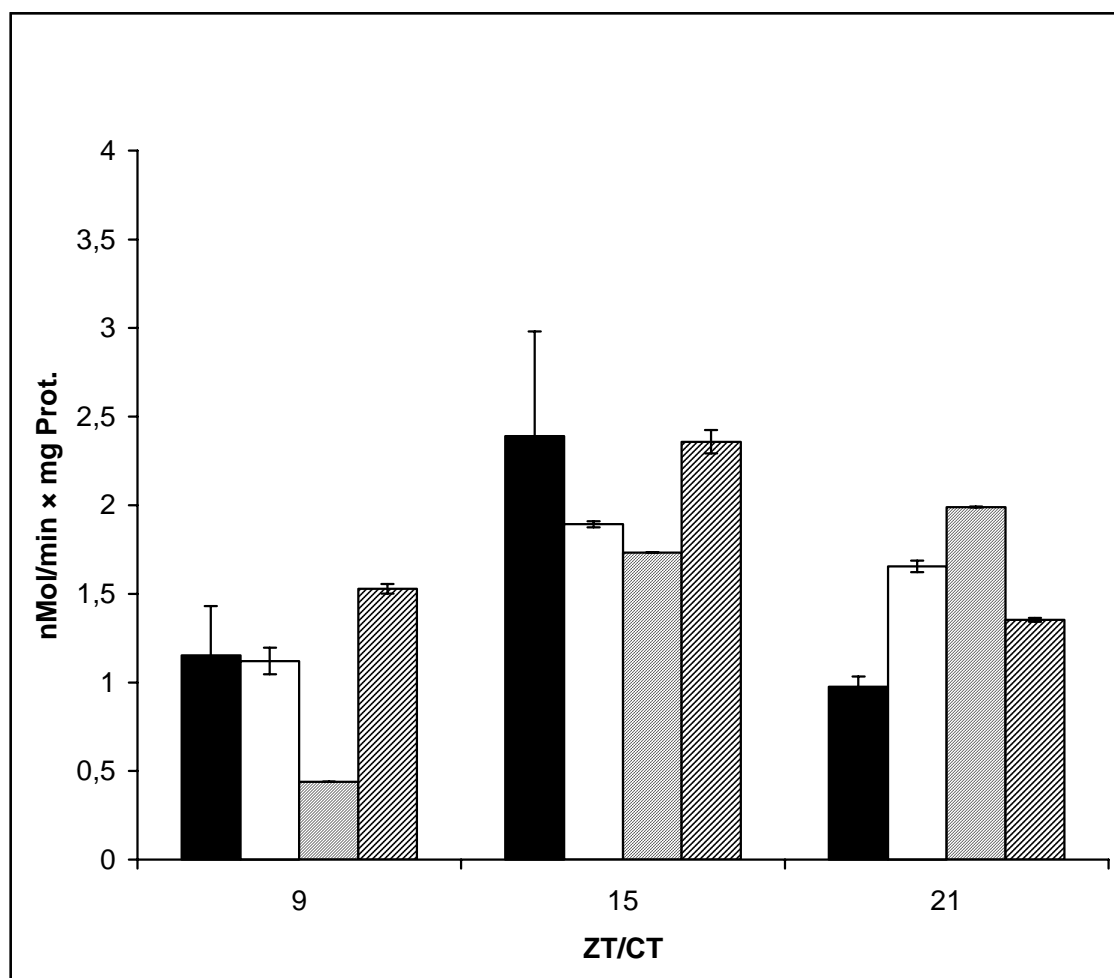


Abb. 4: Die Aktivität der Tryptophan-Aminotransferase in drei ausgewählten circadianen Phasen unter dem Einfluß von Dauerlicht, Tryptophan und Melatonin.

Ordinate: nMol Indol-3-pyruvat/min \times mg Protein; Abzisse: ZT bzw. circadiane Zeit = CT [h]; schwarze Balken: unbehandelte Zellen im LD 12:12; weiße Balken: entsprechende Zellen im LL; hellgraue Balken: 6-stündige Behandlung mit 10^{-4} M Tryptophan; dunkelgraue Balken: 3-stündige Behandlung mit 10^{-4} M Melatonin; vertikale Linien: Standardfehler.

3.3 Umsatz von L-Kynurenin zu Kynurensäure bei *Lingulodinium polyedrum*

Da andere aromatische Aminosäuren wie Tryptophan, 5-Hydroxytryptophan (Burkhardt *et al.*, 1995; Burkhardt & Hardeland, 1996) sowie Tyrosin-Analoga (Hardeland, pers. Mitt.) von *L. polyedrum* gut aufgenommen werden, bestand die Chance, daß auch L-Kynurenin über einen unspezifischen aromatischen Aminosäuretransporter in die Zellen gelangen könnte. Bevor eine Verstoffwechslung von L-Kynurenin in den Zellen studiert werden konnte, mußte zunächst geprüft werden, ob sich diese Substanz bereits im Kulturmedium in Abwesenheit der Organismen zu Kynurensäure chemisch umsetzt. Daher wurde in einem Kontrollversuch L-Kynurenin in einer Konzentration von 10^{-4} M über 18 h im Medium inkubiert.

Abb. 5 zeigt, daß eine solche lange Inkubation keine wesentliche Änderung der L-Kynurenin-Konzentration (0,106 mM) im Vergleich zu einem Kontrollansatz (Kontr. I) ohne Inkubation (0,100 mM) ergab. Die in dem o.g. Inkubationsansatz gemessene Kynurensäure-Konzentration (0,69 μ M) erwies sich im Vergleich zu einem Kontrollansatz (Kontr. II) von 100 μ M Kynurensäure als verschwindend gering (Abb. 5). L-Kynurenin wird demnach im Medium fast nicht zu Kynurensäure umgesetzt.

Nach 18-stündiger Inkubation der Zellen mit 10^{-4} M L-Kynurenin waren nur noch 49,25 μ M hiervon im Medium verblieben. Extrazellulär waren hingegen 0,194 μ M Kynurensäure nachweisbar. In einem Zellextrakt, der ca. 10 % Zellmaterial enthielt, wurde 0,195 μ M Kynurensäure gemessen, d.h. die intrazelluläre Kynurensäure-Konzentration war ca. 10-mal größer als im Medium. Der relative Anteil gebildeter Kynurensäure war nach 18-stündiger Inkubation der Zellen mit 10^{-5} M L-Kynurenin höher (0,11 μ M Kynurensäure im Medium; 0,124 μ M Kynurensäure im Extrakt).

Die ermittelten Daten zeigen, daß L-Kynurenin offenbar von den Zellen gut aufgenommen wird (das Gesamzellvolumen der Kultur beträgt weniger als ein Zweitausendstel des Mediumvolumens), aber nur ein Teil des eingesetzten L-Kynurenins nach Verstoffwechslung als Kynurensäure nachweisbar ist.

Selbst wenn die Kynurensäure-Spiegel nicht nur aufgrund weiterer Metabolisierung so niedrig wie gemessen liegen, sondern der Hauptteil des aufgenommenen Kynurenins in andere Wege seines verzweigten Stoffwechsels fließt, erweisen sich die Raten der Kynurensäure-Freisetzung ins Medium noch als deutlich höher als jene, die man aufgrund der Messungen der bekannten enzymatischen Bildungsraten erwarten dürfte.

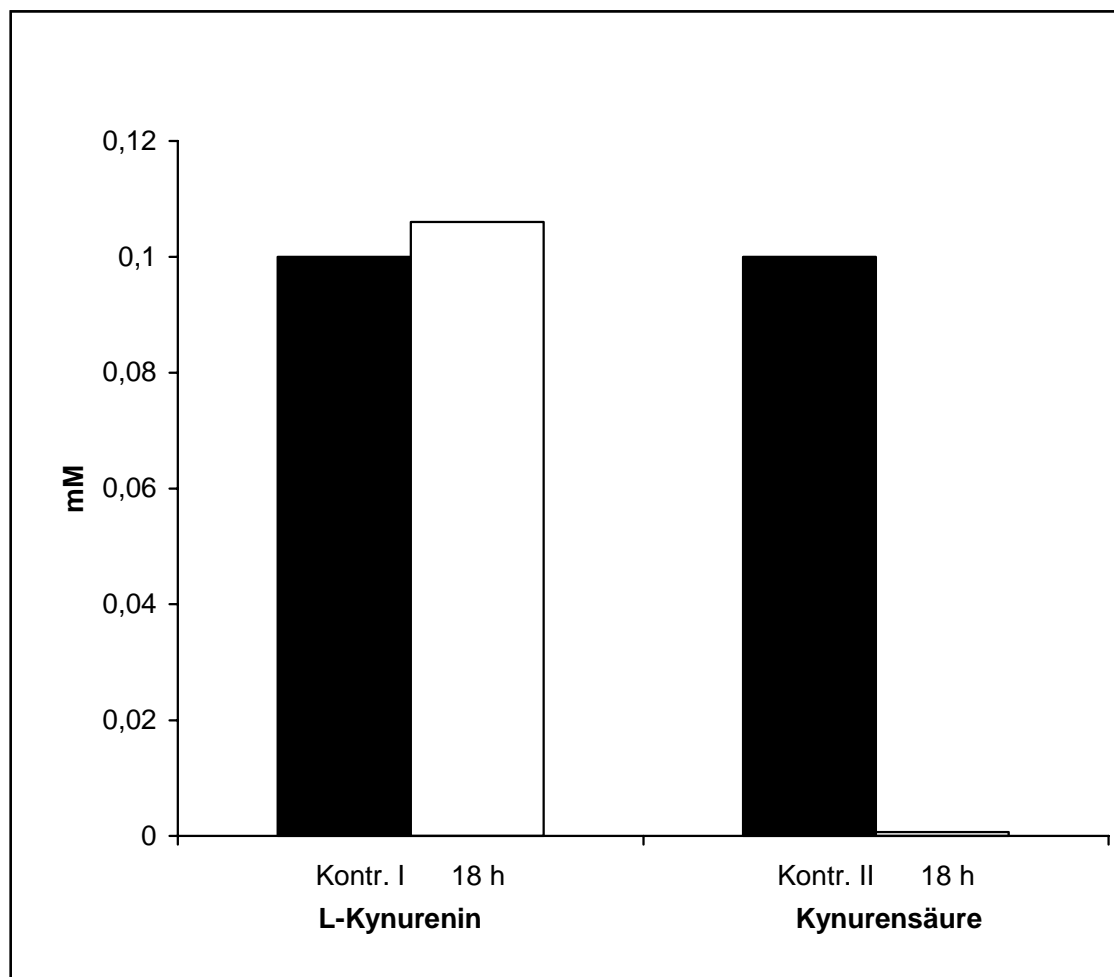


Abb. 5: Im zellfreien Medium wird L-Kynurenin kaum zu Kynurensäure umgesetzt.

L-Kynurenin (Kontr. I) und Kynurensäure (Kontr. II) wurden vor einer Inkubation dem Medium zugesetzt (schwarze Balken); nach 18-stündiger Inkubation mit L-Kynurenin wurden die Konzentrationen beider Metaboliten bestimmt (weiße Balken).

3.4 Freisetzung von Kynurensäure durch *Lingulodinium polyedrum* ins Medium: Tagesgänge im LD 12:12, LL und DD

Abb. 6 zeigt im LD 12:12 den diurnalen Rhythmus der Freisetzungsrates von Kynurensäure ins Medium nach 6-stündiger Inkubation der Zellen mit 10^{-4} M L-Kynurenin. Mit Beginn der Photophase stieg die Konzentration der ins Medium freigesetzten Kynurensäure steil an. Ein Maximum wurde um ZT 9 erreicht ($1,72 \mu\text{Mol}/\text{h} \times \text{mg Protein}$), ein Niveau, das bis ZT 12 ($1,69 \mu\text{Mol}/\text{h} \times \text{mg Protein}$) erhalten blieb. Nach Übergang in die Scotophase fiel die Freisetzungsrates der Kynurensäure steil ab und veränderte sich im Zeitraum von ZT 18 bis ZT 24 nicht weiter (Werte zwischen $0,37\text{-}0,4 \mu\text{Mol}/\text{h} \times \text{mg Protein}$). Die Rhythmik des hier gemessenen Parameters besaß mit einem Minimum/Maximum-Verhältnis von $1:>4$ somit eine beachtliche Schwingungsweite.

Der statistische Vergleich zwischen in Scoto- und Photophase ermittelten Daten ergab im t-Test jeweils signifikante Unterschiede mit einem Signifikanzniveau von mindestens $p < 0,01$. Somit ist im LD 12:12 für die Freisetzungsrates der Kynurensäure ins Medium ein Tagesrhythmus mit unimodalem Verlauf nachgewiesen.

Abb. 7 zeigt das tageszeitliche Muster der Freisetzungsrates von Kynurensäure im LL, wobei die Zellen vor dem Start der Versuchsreihe bereits 24 h dem Dauerlicht ausgesetzt waren. Unter diesen Bedingungen waren sehr wohl zeitliche Fluktuationen festzustellen, nicht aber ein rhythmisches Muster, das jenem im LD entsprochen hätte. Der niedrigste Wert wurde um CT 6 ($1,41 \mu\text{Mol}/\text{h} \times \text{mg Protein}$) gemessen, im übrigen wurde ein kontinuierlicher Anstieg der Kynurensäure-Freisetzung beobachtet, welche am Ende der subjektiven Nacht nach über 40 h im LL Werte von $3,5 \mu\text{Mol}/\text{h} \times \text{mg Protein}$ um CT 18 bzw. $3,94 \mu\text{Mol}/\text{h} \times \text{mg Protein}$ um CT 21 erreichte. Im Durchschnitt lagen die Daten aus dem LL deutlich höher als jene aus der Photophase des LD.

In Abb. 8 ist das diurnale Muster der Freisetzungsrates von Kynurensäure im DD dargestellt. Diese blieben über den gesamten Tagesverlauf weitgehend konstant in einem Bereich von $0,4\text{-}0,53 \mu\text{Mol}/\text{h} \times \text{mg Protein}$ und entsprachen in der Größenordnung denen aus der Scotophase im LD 12:12.

Eine klare unimodale Tagesrhythmik der Freisetzungsrates von Kynurensäure wie im LD war unter konstanten Bedingungen von LL oder DD nicht gegeben. Außerdem hing das Durchschnittsniveau klar von der Belichtung und ihrer Dauer ab. Diese Resultate deuten auf einen diurnalen Rhythmus exogenen Ursprungs hin, wobei die Existenz einer minder bedeutenden endogenen Komponente nicht ausgeschlossen werden kann. Die Lichtabhängigkeit der Bildung und Freisetzung von Kynurensäure sind ein Hinweis auf die Involvierung der Photosynthese.

Die gemessenen Freisetzungsrates verdienen einen Vergleich mit den Aktivitäten der bekannten Kynurensäure-liefernden Enzyme, die bei optimalem pH und unter Substratsättigung gemessen wurden und daher trotz des artifiziellen Milieus nicht wesentlich den maximalen physiologischen Umsatz unterschreiten sollten. Die Aktivitäten von Kynurenin-Aminotransferase und Tryptophan-Aminotransferase betragen im Mittel jeweils ca. 1,5 nMol/ min \times mg Protein, zusammen etwa 180 nMol/ h \times mg Protein. Selbst wenn man die unrealistische Annahme einer vollständigen Umsetzung von Indol-3-pyruvat zu Kynurensäure zugrunde legt, und außerdem die vollständige Freisetzung der gesamten gebildeten Kynurensäure, sind die ermittelten Freisetzungsrates im LD 12:12 mit Werten zwischen 0,3-1,7 μ Mol/ h \times mg Protein noch um eine Größenordnung höher als die der bekannten enzymatischen Kapazität. Diese Befunde deuten auf die Existenz weiterer Stoffwechselwege der Kynurensäure-Bildung hin.

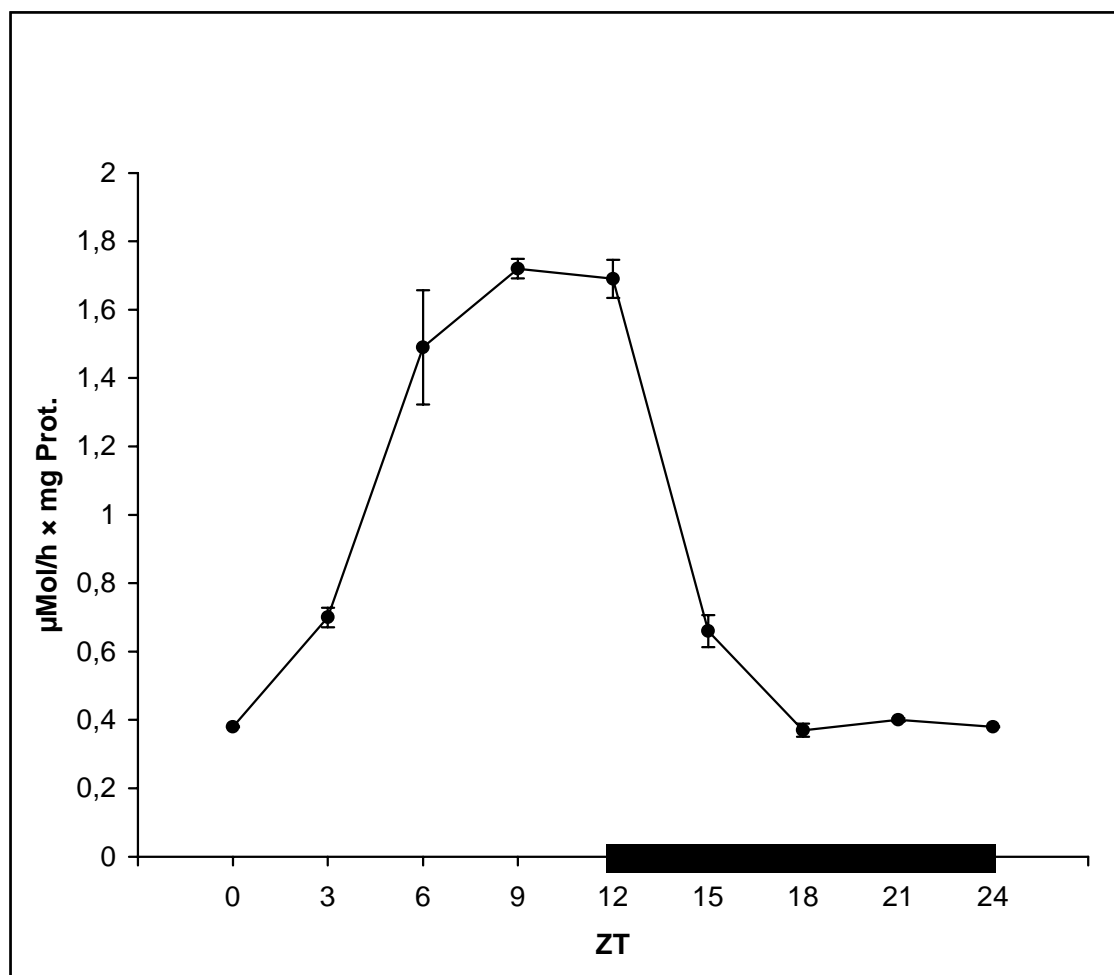


Abb. 6: Diurnales Muster der Freisetzungsraten von Kynurensäure ins Medium, nach Inkubation von *Lingulodinium polyedrum* mit L-Kynurenin im LD 12:12.

Details wie in Abb. 2.

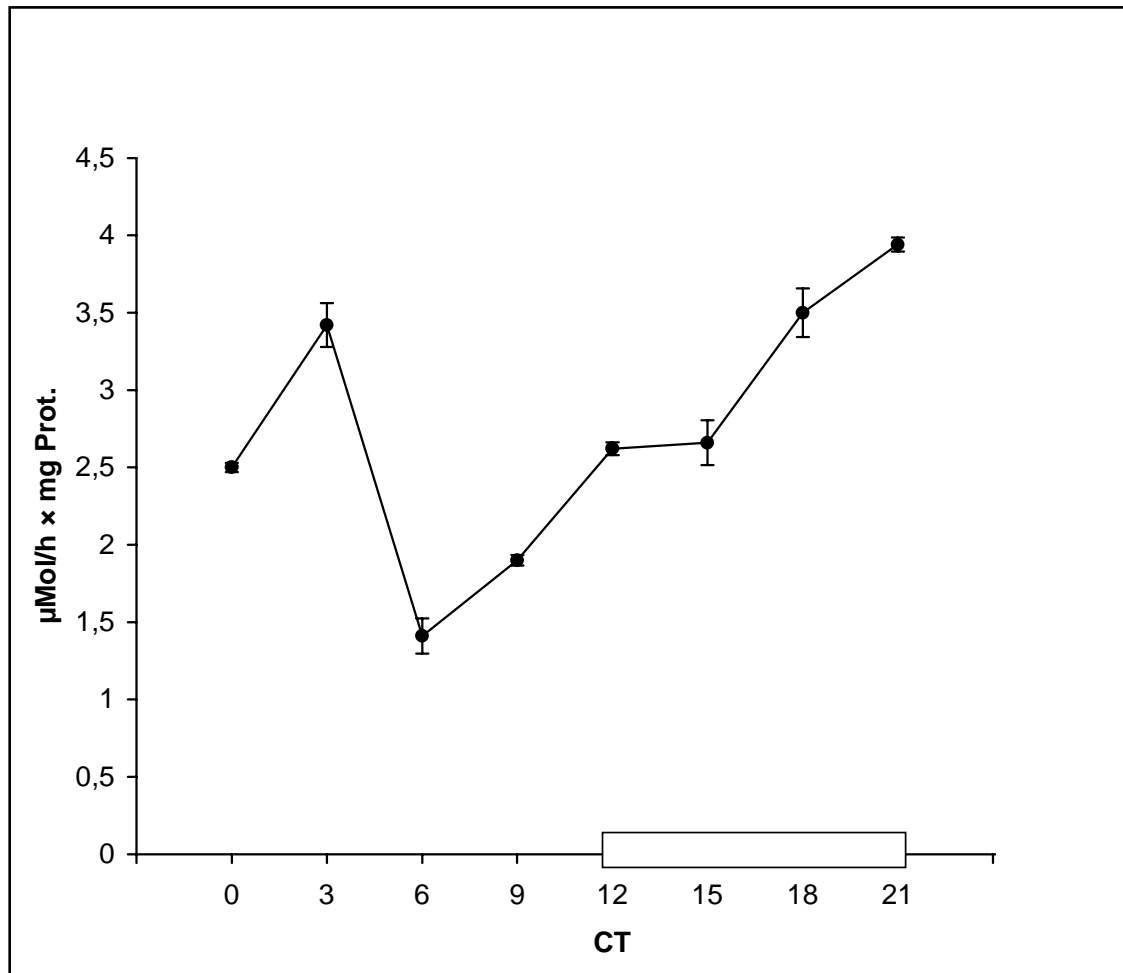


Abb. 7: Zeitliches Muster der Freisetzungsraten von Kynurensäure ins Medium, nach Inkubation von *Lingulodinium polyedrum* mit L-Kynurenin im LL.

Weißer Balken: subjektive Nacht; weitere Details wie in Abb. 2.

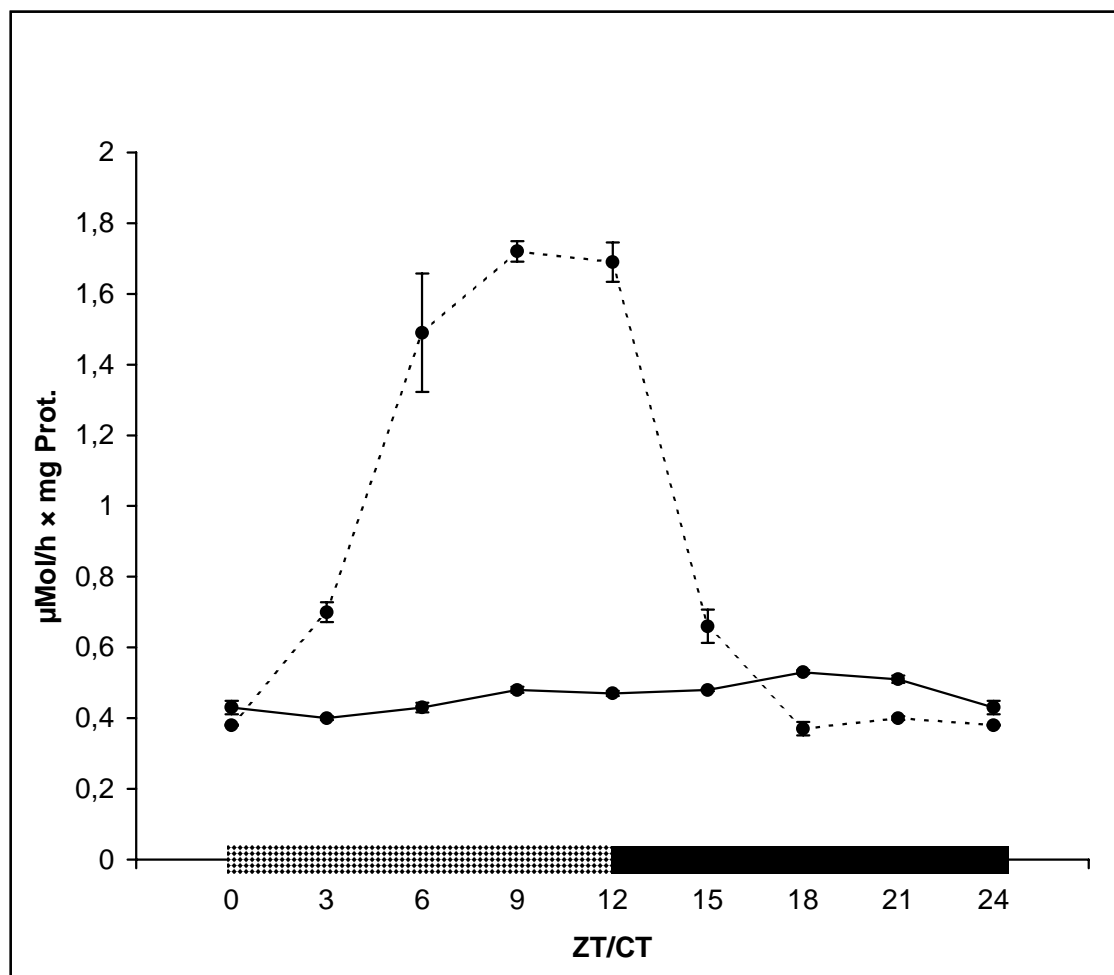


Abb. 8: Freisetzungsraten von Kynurensäure im DD, verglichen mit denen im LD.
Grauer Balken: Subjektiver Tag (DD) bzw. Photophase (LD); schwarzer Balken: Subjektive Nacht (DD) bzw. Scotophase (LD); weitere Details wie in Abb. 2 und 4.

3.5 Ein neuer Stoffwechselweg der Kynurensäure-Bildung durch Wasserstoffperoxid in Gegenwart und Abwesenheit von Peroxidase

Da der Hauptanteil der Kynurensäure-Bildung nicht durch Transaminierungswege von Kynurenin und Tryptophan erklärt werden konnte, dieser aber offenkundig lichtabhängig war, lag eine Beziehung zur Photosynthese nahe. Eine Möglichkeit, die aus Kynurenin zur Bildung der zyklisierenden Oxosäure führen könnte, wäre eine desaminierende Oxidation. Derartiges könnte sich mit der Photosynthese insoweit in Verbindung bringen lassen, als die Elektronentransportketten der Photosysteme bei photoautotrophen Organismen die Hauptquelle der Wasserstoffperoxid-Bildung darstellen. Wasserstoffperoxid jedoch kann als Reaktionspartner diverser Verbindungen auftreten, wenn Peroxidasen mit geringer Substratspezifität für Wasserstoffdonatoren vorhanden sind. *L. polyedrum* verfügt über derart unspezifische Peroxidasen aus der Gruppe der Hämoperoxidasen (Antolín *et al.*, 1997). Der Gesamtumsatz von H_2O_2 ist bei diesem Organismus enorm (Pape & Hardeland, 1999). Auch Aminosäuren vermögen als Substrate von Hämoperoxidasen zu fungieren (Change & Maehly, 1968), und da L-Kynurenin dieser Substanzklasse zugehört, war zu prüfen, ob es einem solchen Enzym als Wasserstoffdonor dienen kann. In diesem Fall müßte die hierdurch entstehende Iminosäure nach Hydrolyse in eine Oxosäure übergehen, welche zur Kynurensäure zyklisiert. Um dies zu prüfen, wurde als eine für Wasserstoffdonatoren unspezifische Hämoperoxidase Meerrettich-Peroxidase eingesetzt. Hierfür wurde L-Kynurenin mit H_2O_2 in Gegenwart von Peroxidase bei unterschiedlichen pH-Werten über einen Zeitraum von 2-2,5 h inkubiert und die Entstehung von Kynurensäure fluorometrisch (s. 2.5.1) verfolgt. Bei einem pH-Wert von 7,4 wurde auch die Möglichkeit getestet, ob L-Kynurenin in Abwesenheit von Peroxidase bereits durch H_2O_2 zu Kynurensäure oxidiert werden kann.

In Abb. 9 ist der Umsatz von L-Kynurenin zu Kynurensäure in Gegenwart und in Abwesenheit von Peroxidase bei einem pH-Wert von 7,4 dargestellt. Bereits in Abwesenheit des Enzyms ließ sich eine moderate Kynurensäure-Bildung feststellen: Bei einem linearen Umsatz wurde nach 2 h Reaktionszeit 0,43 μ M Kynurensäure nachgewiesen.

In Gegenwart von Peroxidase war die Bildungsrate von Kynurensäure etwa verdoppelt: Nach 2 h Reaktionszeit wurde eine Kynurensäure-Konzentration von 0,9 μM gemessen. Abb. 10 stellt die pH-Abhängigkeit der Kynurensäure-Bildung aus L-Kynurenin in Gegenwart von H_2O_2 und Meerrettich-Peroxidase dar. Die Bildungsrate der Kynurensäure erwies sich unter diesen Bedingungen als in hohem Maße mit dem pH positiv korreliert. Mit zunehmendem pH-Wert erhöhte sich der Umsatz von L-Kynurenin um ein Mehrfaches. Von pH 5,5 auf 7,4 war der Umsatz auf etwa das 35-fache gesteigert, von pH 7,4 auf 8,0 ca. um das 11-fache, von pH 8,0 auf 8,6 um das 1,6-fache.

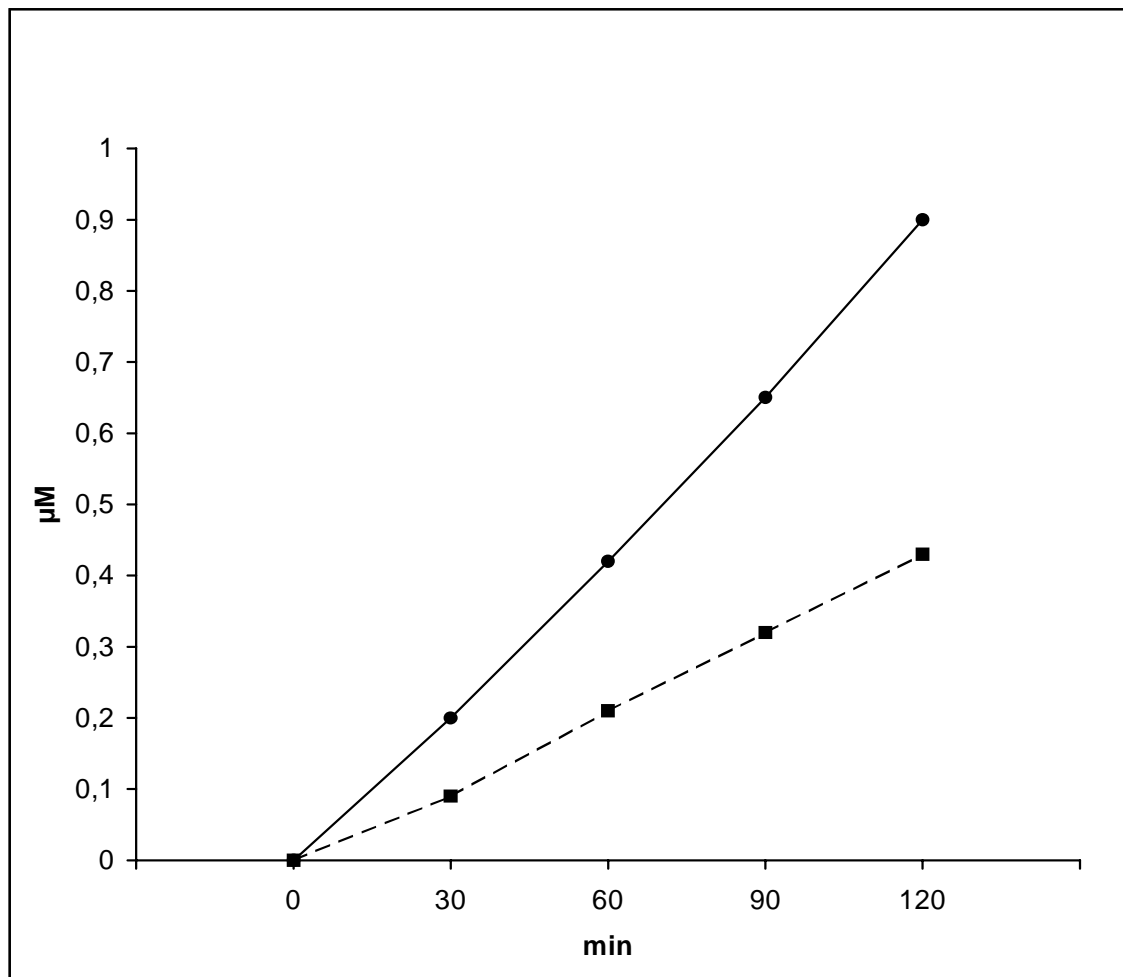


Abb. 9: Umsatz von L-Kynurenin zu Kynurensäure durch H_2O_2 in Gegenwart und in Abwesenheit von Peroxidase.

Ordinate: Kynurensäure; Abzisse: Reaktionszeit; durchgezogene Linie: in Gegenwart von Peroxidase; gestrichelte Linie: in Abwesenheit von Peroxidase.

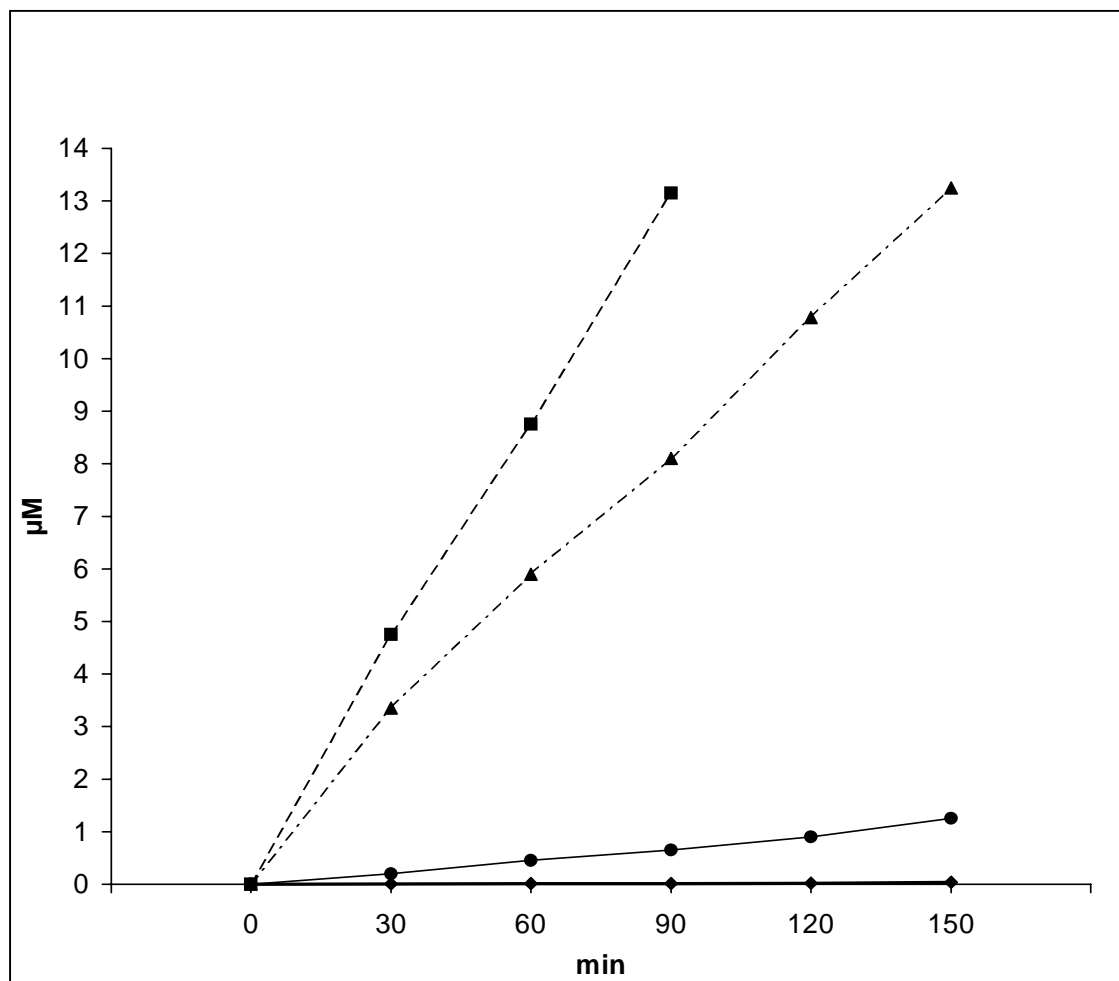


Abb. 10: Bildungsrate von Kynurensäure in Gegenwart von Peroxidase: pH-Abhängigkeit.

Koordinaten wie in Abb. 9; durchgezogene Linie (fett): pH 5,5; durchgezogene Linie (dünn): pH 7,4; Strich-Punkt-Linie: pH 8,0; gestrichelte Linie: pH 8,6.

3.6 Einfluß von CCCP, Paraquat und DCMU auf die Kynurensäurebildung im Homogenat von *Lingulodinium polyedrum*

Da Wasserstoffperoxid insbesondere ein Produkt der photosynthetischen Elektronentransportketten und L-Kynurenin durch die Interaktion mit H_2O_2 zu Kynurensäure oxidierbar ist, wurden die Effekte von CCCP, Paraquat und DCMU auf die H_2O_2 -Produktion und somit auch auf die Kynurensäure-Bildung in belichteten Homogenaten von *L. polyedrum* untersucht. Die Verwendung der Homogenate anstatt lebender Zellen hatte sich aufgrund von Problemen der Aufnahme der Agentien als notwendig erwiesen. Wegen der hochgradig verästelten Struktur der Plastiden von *L. polyedrum* bleiben diese bei der Homogenisierung jedoch nicht intakt, sondern zerfallen in Vesikel.

Carbonylcyanid-m-chlorphenylhydrazon (CCCP) als Entkoppler der Photophosphorylierung und Paraquat ein Elektronenakzeptor der Elektronentransportkette führen zur vermehrten H_2O_2 -Bildung (Elstner, 1990). CCCP führt im verwendeten System, trotz der Funktionsverluste, die mit dem Zerfall der Plastiden verbunden sind, zu einer moderaten aber signifikanten Steigerung der Kynurensäure-Bildung (t-Test nach 1 h bzw. 4 h Inkubationszeit: $p < 0,025$, nach 2 h bzw. 3 h Inkubationszeit $p < 0,05$).

Paraquat erhöhte die Kynurensäure-Bildung etwas stärker, was mit fortschreitender Inkubationszeit immer deutlicher wurde (Abb. 12). Mit Ausnahme der nach 1 h Inkubation gemessenen Werte ergab der statistische Vergleich hochsignifikante Unterschiede (t-Test: $p < 0,01$ nach 2 h und $p < 0,001$ nach 3h bzw. 4 h).

Im Gegensatz zu CCCP und Paraquat blockiert Dichlorphenyldimethylharnstoff (DCMU) den Elektronentransport in Photosystem II und hemmt somit die H_2O_2 -Generierung (Elstner, 1990). Abb 13 zeigt eine Verminderung der Kynurensäure-Bildung unter der Einwirkung von DCMU im Homogenat von *Lingulodinium polyedrum*. Der statistische Vergleich ergab auch hier signifikante Unterschiede (t-Test: nach 1 h bzw. nach 3 h $p < 0,05$, nach 2 h bzw. 4 h $p < 0,01$).

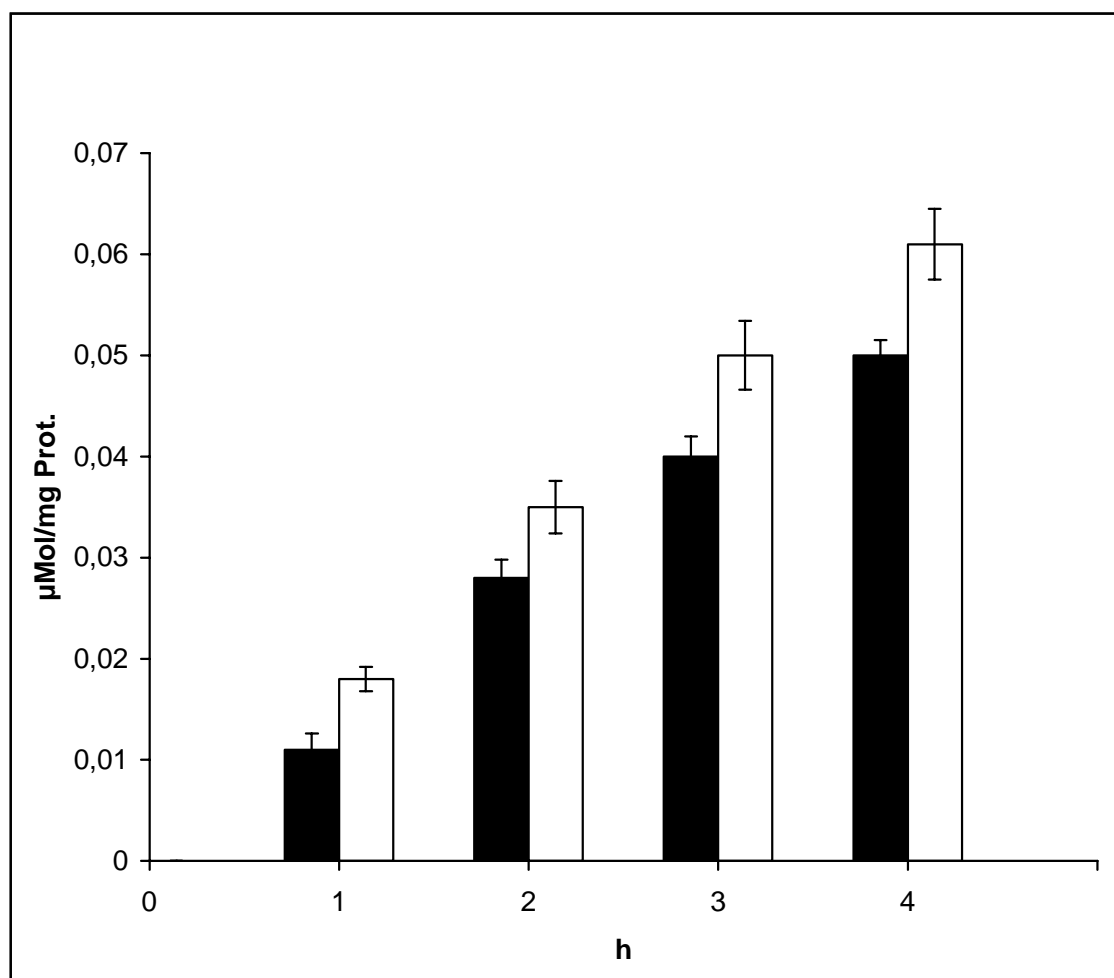


Abb. 11: Effekt von CCCP auf die Kynurensäure-Bildung im belichteten Homogenat von *Lingulodinium polyedrum*.

Ordinate: Kynurensäure; Abzisse: Inkubationszeit; schwarze Balken: Kontrolle; weiße Balken: Gegenwart von CCCP; vertikale Linien: Standardfehler.

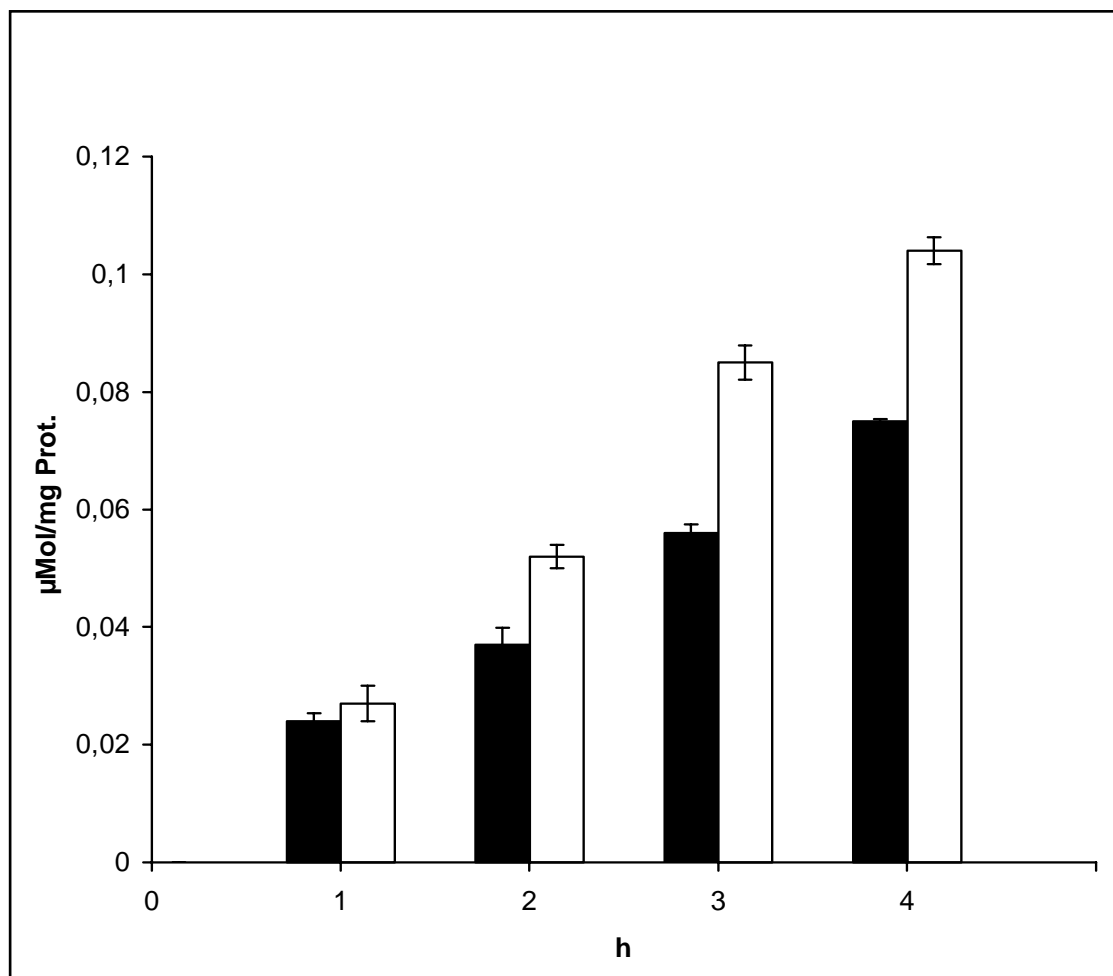


Abb. 12: Effekt von Paraquat auf die Kynurensäure-Bildung im belichteten Homogenat von *Lingulodinium polyedrum*.

Koordinaten wie in Abb. 11; schwarze Balken: Kontrolle; weiße Balken: Gegenwart von Paraquat; vertikale Linien: Standardfehler.

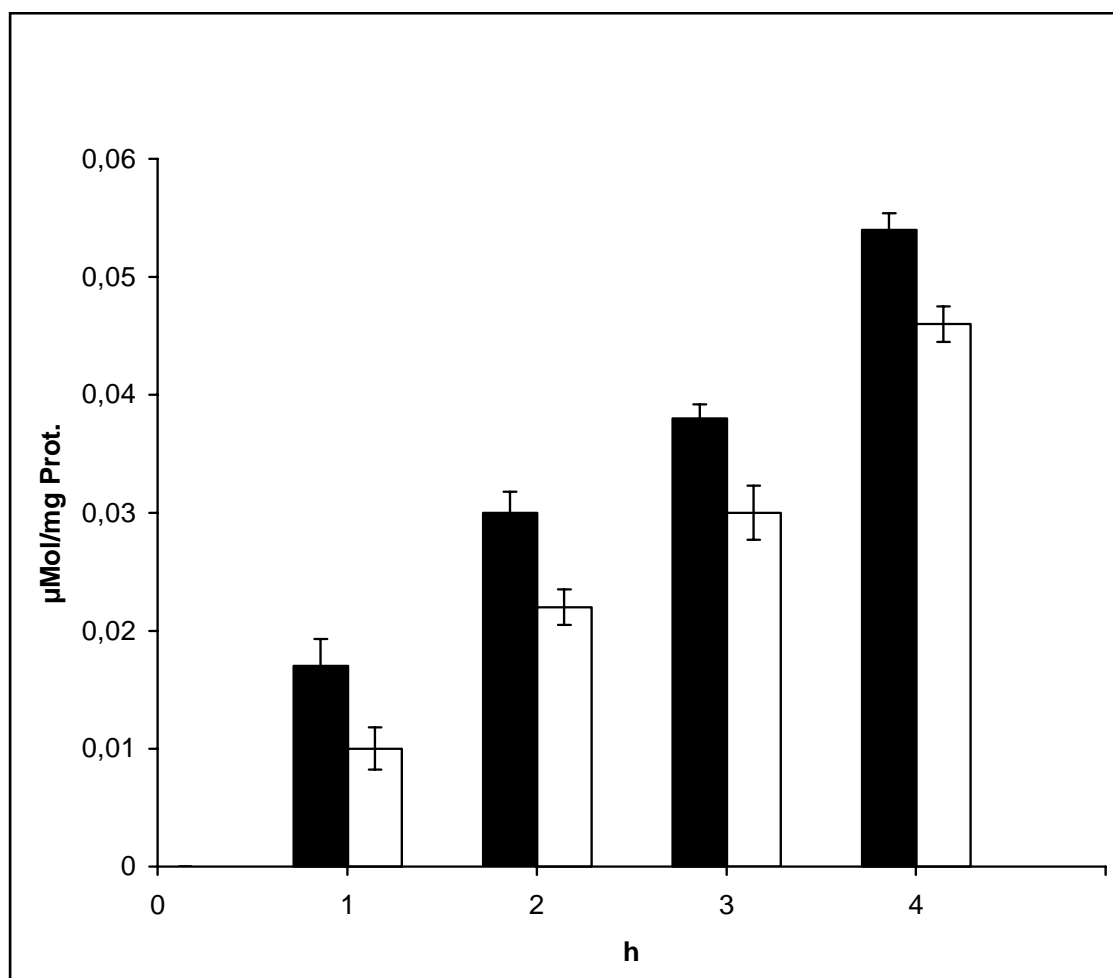


Abb. 13: Effekt von DCMU auf die Kynurensäure-Bildung im belichteten Homogenat von *Lingulodinium polyedrum*.

Koordinaten wie in Abb. 11; schwarze Balken: Kontrolle; weiße Balken: Gegenwart von DCMU; vertikale Linien: Standardfehler.

3.7 Entstehung der Kynurensäure aus Indol-3-pyruvat in einem radikal-generierenden System

Neben dem klassischen Syntheseweg von Kynurensäure, der Transaminierung von L-Kynurenin mit nachfolgender Zyklisierung, kann auch die radikalische Oxidation von Indol-3-pyruvat, insbesondere dessen Enolform, zur Bildung von Kynurensäure führen (Politi *et al.*, 1991). Kynurensäure ist jedoch nicht das einzige radikalische Oxidationsprodukt dieses Indols; vor allem wären hier rotgefärbte Polymerisationsprodukte zu nennen (Atsumi & Hayashi, 1979). Aufgrund der hohen Reaktivität von Indol-3-pyruvat, welches sich bereits im Kulturmedium von *L. polyedrum* umsetzte und u.a. zur Bildung der gefärbten Polymere führte, war die Verfolgung der Kynurensäure-Synthese aus exogenem Indolpyruvat bei den Zellen nicht möglich. Trotz der im Grundsatz bekannten oxidativen Umwandlung von Indol-3-pyruvat zu Kynurensäure war es gleichwohl lohnend, diese Reaktion näher zu studieren, da diverse Details derselben und auch die Randbedingungen für die Kynurensäure-Bildung unbekannt waren. Verwendet wurde ein schwach alkalisches (pH 8,0), Hämin-katalysiertes Oxidationssystem mit H_2O_2 , das freie Radikale, insbesondere Superoxidationradikale, generiert. Die gleichzeitige Anwesenheit von H_2O_2 und Hämin führt ferner über eine Fenton-Typ-Reaktion zur Bildung von Hydroxylradikalen.

Die oxidativen Reaktionsverläufe von Indol-3-pyruvat in dem oben beschriebenen System wurden zunächst fluorometrisch verfolgt. Da das enolisierte Indol-3-pyruvat keine Fluoreszenz zeigte, wurden nur die Spektren seines Produktes fluorometrisch aufgezeichnet. Eine Verstärkung der Fluoreszenz durch Zink war hier nicht erforderlich, so daß die unveränderten Fluoreszenzeigenschaften der Kynurensäure erfaßt werden konnten. Abb. 14 zeigt die Emissionsspektren des fluoreszierenden Oxidationsproduktes von Indol-3-pyruvat bei unterschiedlichen Anregungswellenlängen. Die maximale Emission lag bei 390-400 nm, während die maximale Anregung im Bereich von 310-320 nm erhalten wurde. Diese Daten zeigen deutlich die spektralen Eigenschaften der Kynurensäure, welche offensichtlich in diesem System als fluoreszierendes Hauptprodukt entsteht.

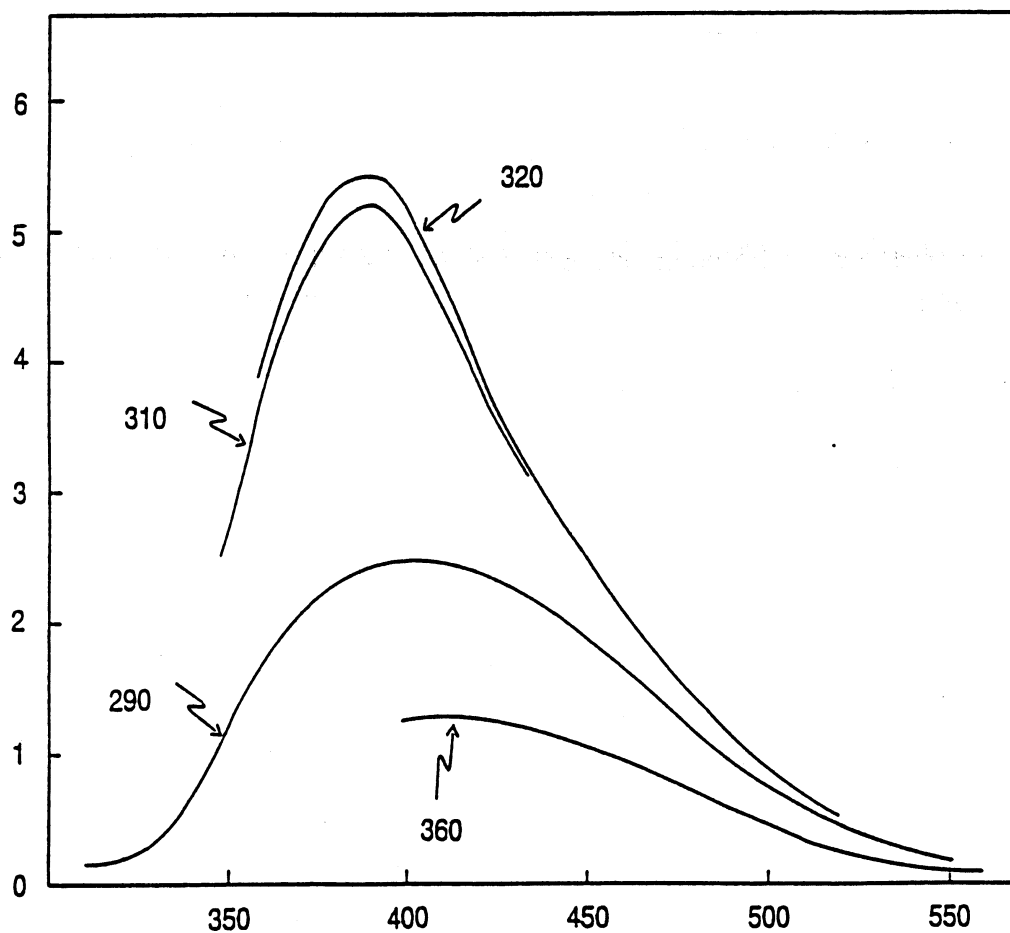


Abb. 14: Emissionsspektren von Kynurensäure als Hauptoxidationsprodukt von Indol-3-pyruvat im alkalischen, Hämin-katalysierten H_2O_2 -System.

Ordinate: RFU = relative Fluoreszenzeinheiten; Abzisse: Emissionswellenlänge [nm];
zu den Pfeilen gehörige Zahlen: Anregungswellenlängen [nm].

3.8 Eigenschaften von Indol-3-pyruvat als Radikalfänger

3.8.1 Reaktionen mit Hydroxylradikalen und Reduktion des ABTS-Kationradikals

Die Untersuchung von Indol-3-pyruvat auf ihre Eigenschaften als Hydroxyl- bzw. ABTS-Kationradikalfänger erfolgte in dem unter 2.8.1 beschriebenen ABTS-System. Bei Anwesenheit von Indol-3-pyruvat zu Beginn der Reaktion zeigte sich eine sehr effiziente Hemmung der ABTS-Kationradikalbildung (Abb. 15). Die Inhibition war bereits in dem initialen Abschnitt der Reaktion zu beobachten, in welchem die Generierung von Hydroxylradikalen überwiegt, und ist somit Ausdruck der Fähigkeit dieses Indols, mit ABTS um Hydroxylradikale zu kompetieren. Die Bildung von ABTS-Kationradikalen wurde durch Indol-3-pyruvat, das mit dem Chromogen in äquimolarer Konzentration eingesetzt war, um 57 % vermindert.

Indol-3-pyruvat vermochte ferner ABTS-Kationradikale sehr effizient zu reduzieren, die eine viel niedrigere Reaktivität als Hydroxylradikale besitzen (Abb. 16), und erwies sich somit als potenter Elektronendonator in einer Eielektronentransferreaktion mit einem organischen Akzeptorradikal. Die Zugabe von Indol-3-pyruvat nach 5 min Reaktionszeit, d.h. nach Erreichen einer annähernd stabilen $\text{ABTS}^{\cdot+}$ -Konzentration, verursachte einen starken Abfall der Extinktion auf Werte, die niedriger waren als jene bei der Konkurrenzreaktion. Diese Erniedrigung der Extinktion um etwa 86 % durch die Zugabe von Indol-3-pyruvat ging über den Verdünnungseffekt, der ca. 10 % ausgemachte (siehe Kontrolle), weit hinaus. Der langsame Anstieg der Extinktion von 0,22 auf 0,4 O.D.-Einheiten nach 10 min deutete eine geringfügige Nachbildung von ABTS-Kationradikalen an, wobei die Hemmung nach 20 min jedoch immer noch 74 % betrug.

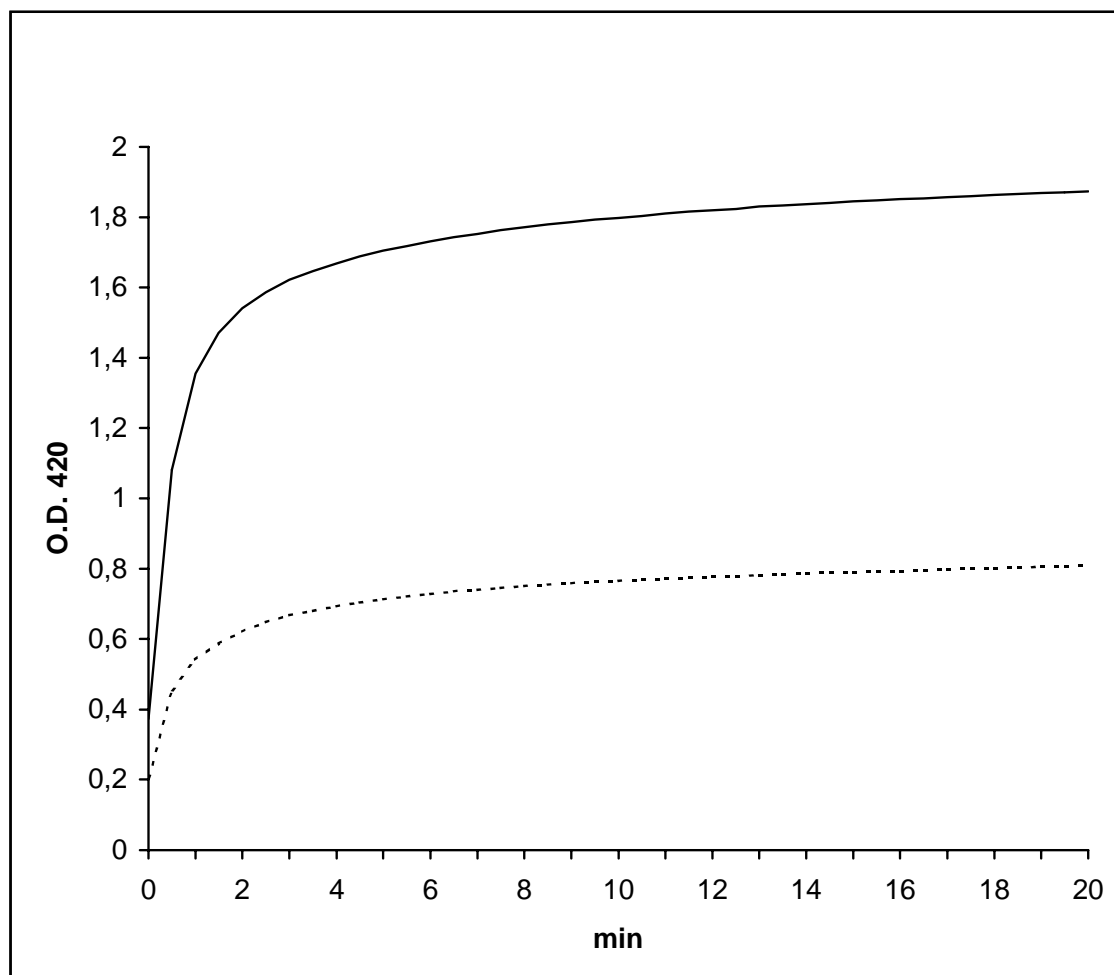


Abb. 15: Effekt von Indol-3-pyruvat auf die ABTS⁺-Bildung durch Hydroxylradikale.

Ordinate: Absorption des ABTS-Kationradikals; Abzisse: Inkubationszeit; durchgezogene Linie: Kontrolle; gestrichelte Linie: Inkubation mit Indol-3-pyruvat.

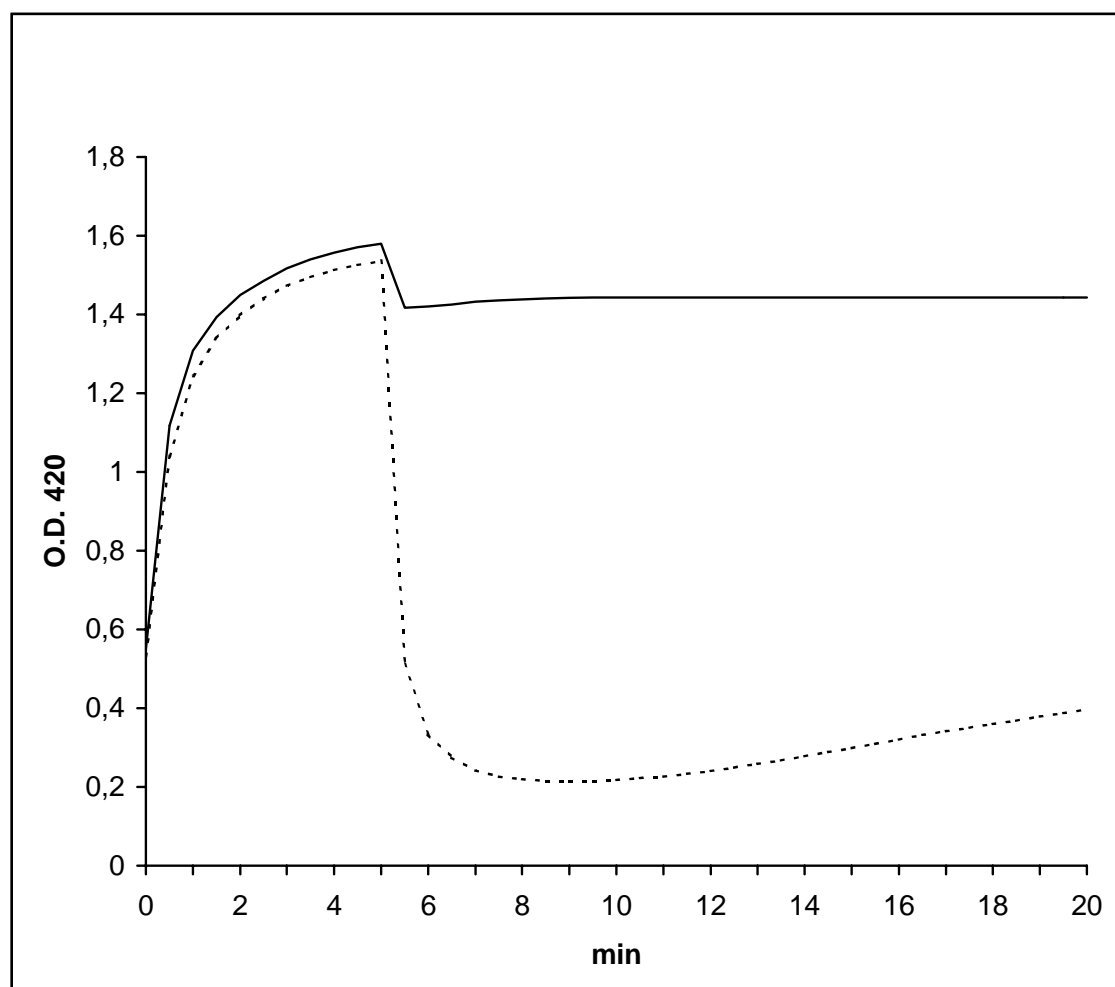


Abb. 16: Reduktion von ABTS-Kationradikalen durch Indol-3-pyruvat.

Zugabe von Indol-3-pyruvat (gestrichelte Linie) oder Ethanol/Wasser-Gemisch nach 5 min. Weitere Details wie in Abb. 15.

3.8.2 Reaktionen mit Superoxidanionradikalen

Anhand der Autoxidation von Hämatoxylin wurde Indol-3-pyruvat in dem unter 2.8.2 beschriebenen System auf seine Eigenschaften als Superoxidanionradikalfänger getestet. In Abb. 17 ist die konzentrationsabhängige Hemmung der Hämatein-Bildung durch Indol-3-pyruvat dargestellt. Indol-3-pyruvat zeigt die Fähigkeit, mit Hämatoxylin um Superoxidanionradikale zu kompetieren, die vergleichsweise niederreaktive Radikale darstellen und auch nicht nur oxidierend, sondern, je nach Redox-Partner, reduzierend wirken können. Die Konzentrationsabhängigkeit des Effekts wird in Abb. 17 deutlich, in einer Konzentration von 1 mM bewirkte Indol-3-pyruvat eine Hemmung von 38 %; bei 2 mM 50 %; bei 3 mM 64 % und bei 4 mM 75 %.

Die Inhibition der Hämatein-Bildung durch Indol-3-pyruvat wurde mit der Eliminierung von Superoxidanionen durch SOD verglichen und auf der Basis von 10 min-Differenzen in fiktive SOD-Einheiten umgerechnet (Abb. 18). Je nach Konzentration wurden Hemmungen im Bereich von ca. 2 bis 5 SOD-Einheiten erhalten.

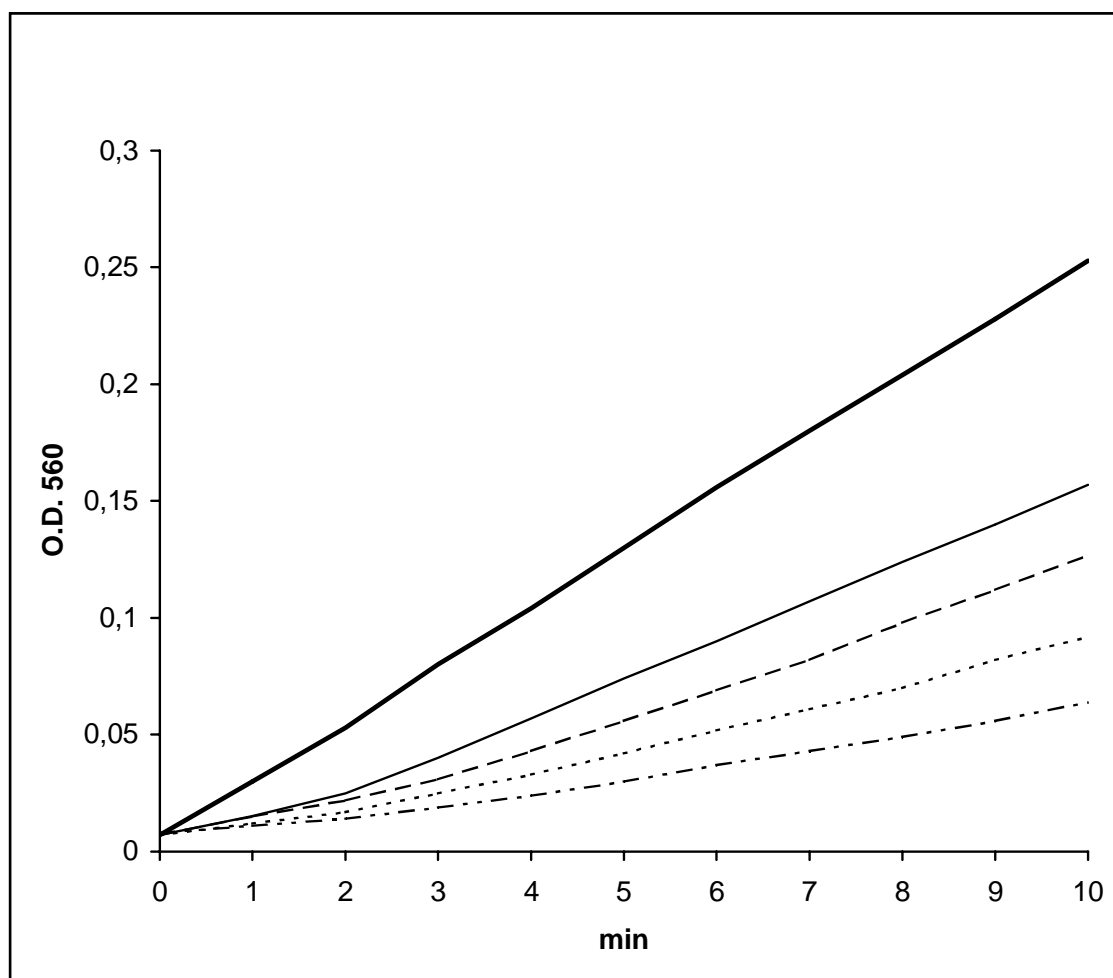


Abb. 17: Indol-3-pyruvat als Fänger von Superoxidanionen: Konzentrationsabhängige Hemmung der Autoxidation von Hämatoxylin.

Ordinate: Absorption von Hämatein; Abzisse: Inkubationszeit; durchgezogene Linie (fett): Kontrolle; Indol-3-pyruvat: durchgezogene Linie (dünn) 1 mM; gestrichelte Linie 2 mM; gepunktete Linie 3 mM; Strich-Punkt-Linie 4 mM.

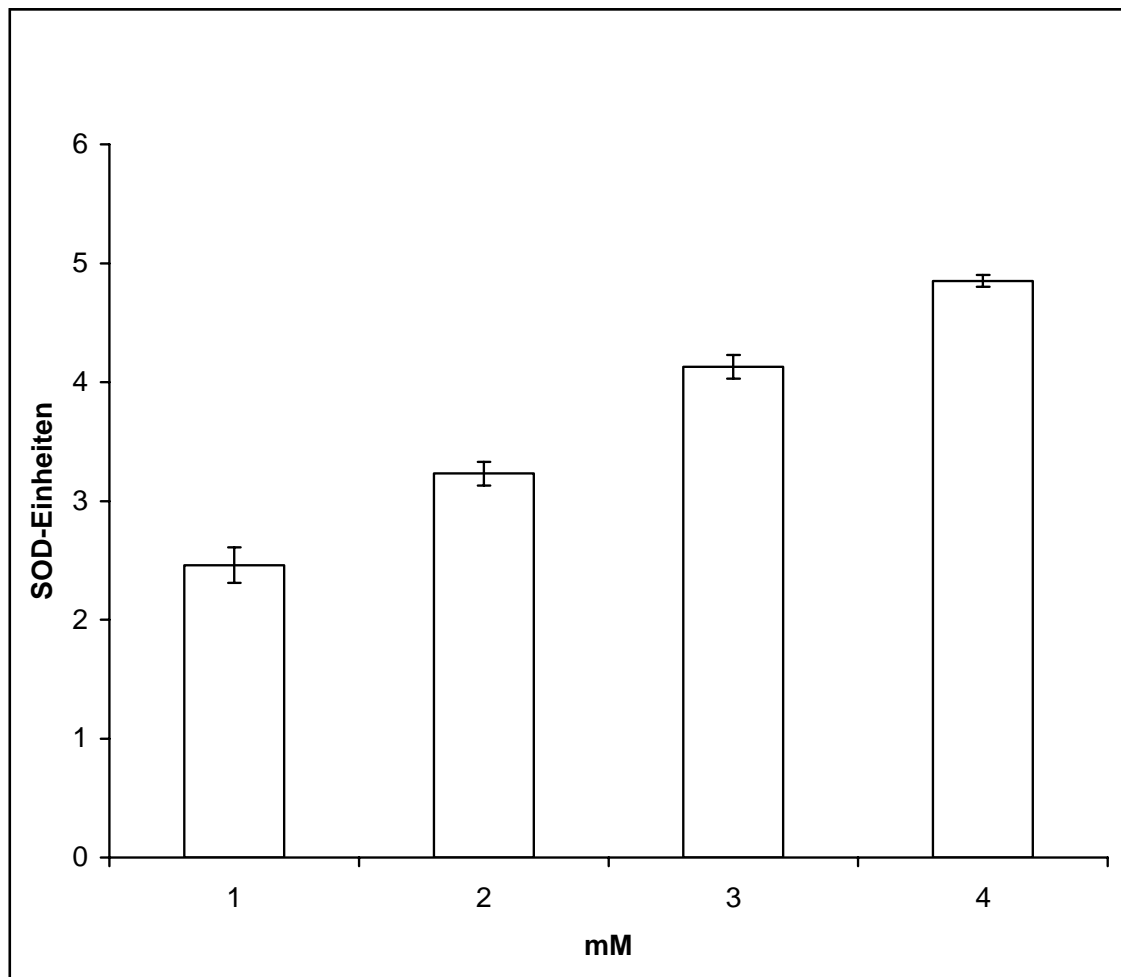


Abb. 18: Fangen von Superoxidanionen durch verschiedene Konzentrationen von Indol-3-pyruvat, ausgedrückt in SOD-Einheiten.

Vertikale Linien: Standardfehler.

3.8.3 Chemilumineszenz bei der radikalischen Oxidation von Indol-3-pyruvat

Da bei dem radikalischen Oxidationstyp von Indol-3-pyruvat, der zur Kynurensäure führt, zunächst der Pyrrolring oxidativ gespalten wird, so daß eine enolisierte kynurische Säure entsteht, bestand die Möglichkeit, daß wie bei der Pyrrolringsspaltung des Melatonins (Fuhrberg & Hardeland, 1994b; Hardeland *et al.*, 1997b) aktive Carbonyle aus der Sauerstoffaddition als chemilumineszente Emitter wirken. Lichtemission bei der Oxidation von Indol-3-pyruvat war bereits früher festgestellt worden (Zinner *et al.*, 1974), doch die Eignung dieses Phänomens für weiterführende Untersuchungen war bisher nicht berücksichtigt worden. In der Tat läßt sich der Verlauf der diesbezüglichen radikalischen Oxidation von Indol-3-pyruvat in dem unter 2.10 beschriebenen, Hämin-katalysierten H_2O_2 -System (Reaktionsansatz I) anhand der Chemilumineszenz über den Zeitraum von mehr als einer Stunde verfolgen und durch konkurrierende Radikalfänger weiter analysieren. Abb. 19 zeigt die Photonenemission im Verlauf der Oxidation von Indol-3-pyruvat in Abwesenheit weiterer Radikalfänger. Nach einer kurzen Periode höherer Chemilumineszenzraten (971.000-992.000 cpm) zu Beginn der Reaktion nahm die Lichtemission nach 30 min ab. Eine erste Phase der Abnahme war durch einen steilen Abfall der Chemilumineszenz von 992.000 cpm auf 130.000 cpm im Zeitraum von 30 bis 80 min charakterisiert, worauf in einer zweiten Phase ein langsames, kontinuierliches Absinken folgte, welches sich über den in der Abbildung dargestellten Zeitraum hinweg fortsetzte.

Zur Überprüfung, welche Spezies freier Radikale an der Oxidation von Indol-3-pyruvat beteiligt sind, wurden Konkurrenzexperimente mit einem Hydroxylradikalfänger, DMSO, und einem Superoxidanion-Radikalfänger, Tiron durchgeführt, welche jeweils im Überschuß gegeben wurden. Die Zugabe erfolgte nicht zu Beginn der Reaktion, sondern erst nach Erreichen der maximalen Emissionsrate.

Die Zugabe von DMSO 20 min nach Reaktionsstart hatte nur mäßige Auswirkungen auf die Lichtemission, welche von 788.000 cpm auf 538.000 cpm abnahm (Abb. 20). Auch das wiederholte Zufügen von DMSO, 30 bzw. 50 min nach Beginn der Messung, verminderte die Chemilumineszenz nicht mehr wesentlich. Die Ergebnisse belegen deutlich, daß eine zur Photonenemission führende Oxidation des Indol-3-pyruvats in Abwesenheit von Hydroxylradikalen sehr wohl möglich ist.

Abb. 21 zeigt die Wirkung von Tiron auf die Lichtemission bei der Oxidation von Indol-3-pyruvat. Die Zugabe 20 min nach Reaktionsstart bewirkte einen sofortigen Abfall der Lichtemission auf basale Werte (von 728.00 cpm auf 6.000 cpm) für die gesamte Meßdauer.

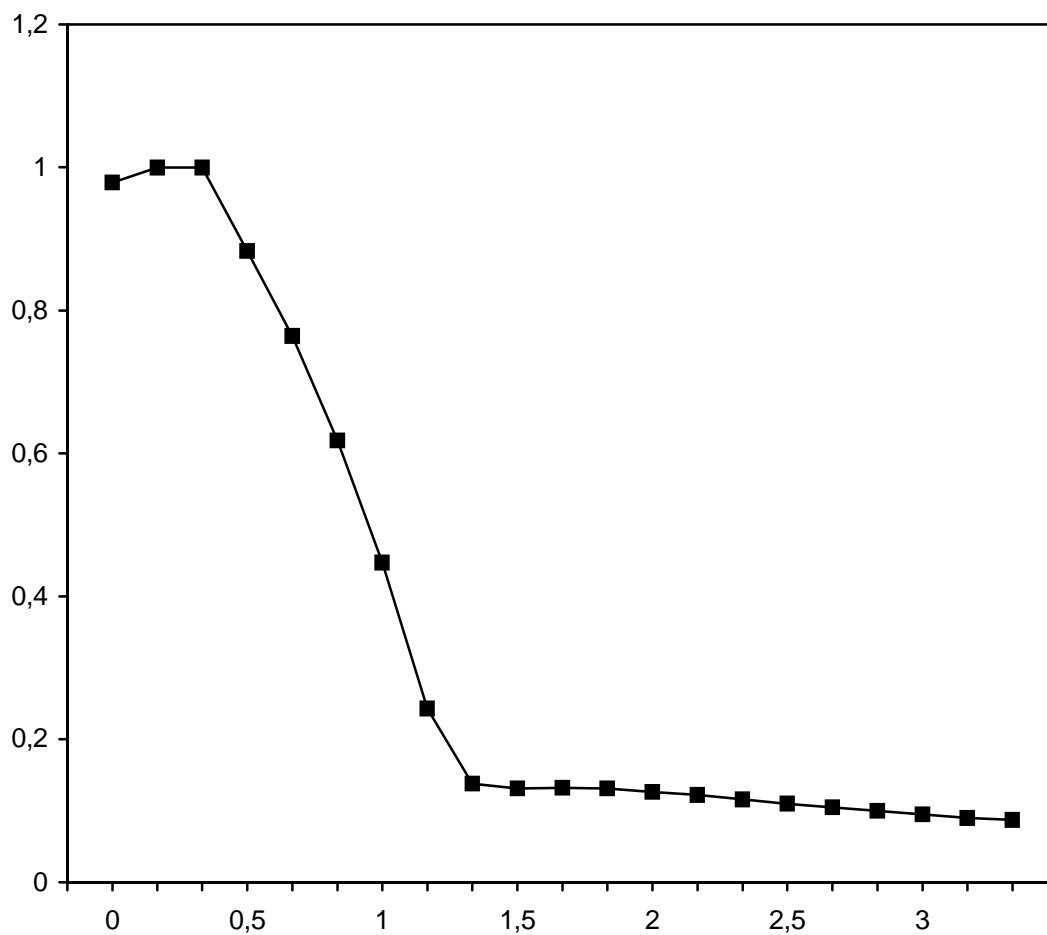


Abb. 19: Chemilumineszenz bei der Oxidation von Indol-3-pyruvat im alkalischen, Hämin-katalysierten H_2O_2 -System. Ordinate: Lichtemission [Mio. cpm]; Abzisse: Reaktionszeit [h].

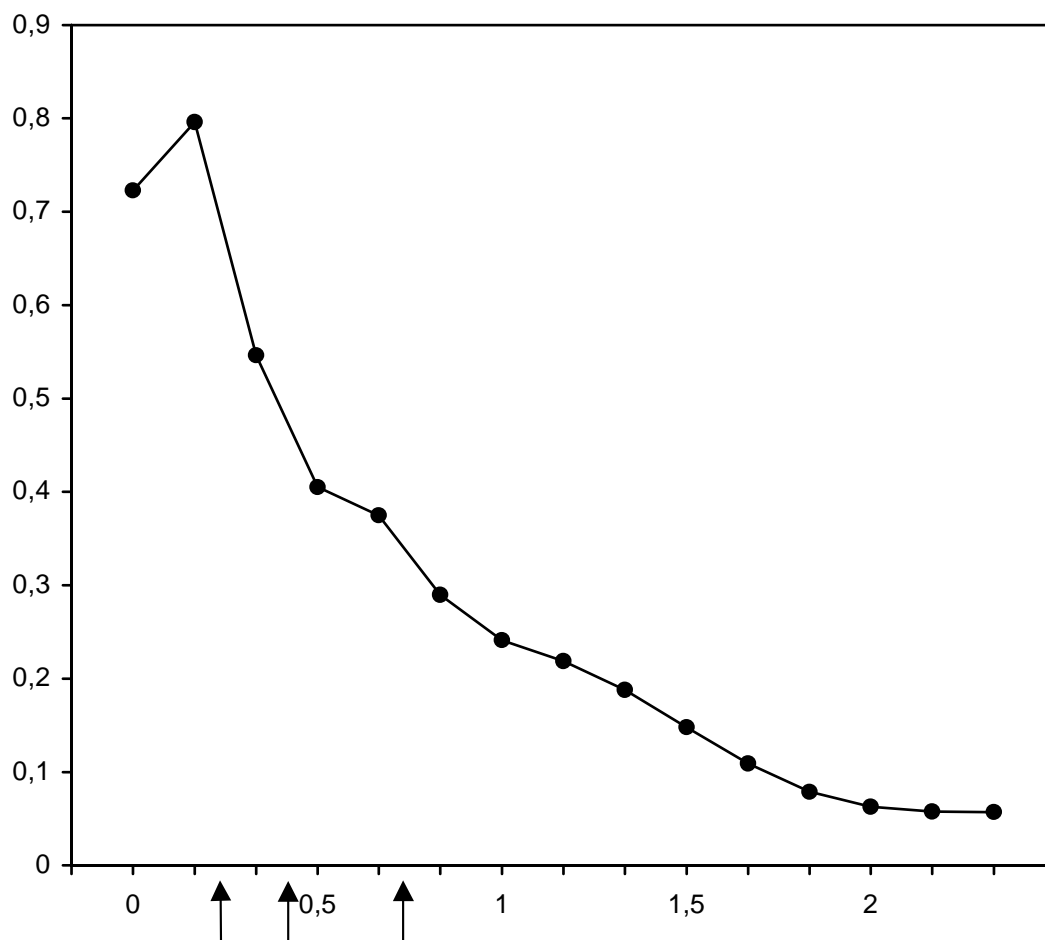


Abb. 20: Der Hydroxylradikalfänger DMSO hemmt die Chemilumineszenz bei der Oxidation von Indol-3-pyruvat nur partiell.
Pfeile: Zugabe von jeweils 50 µl DMSO; weitere Details wie in Abb. 19.

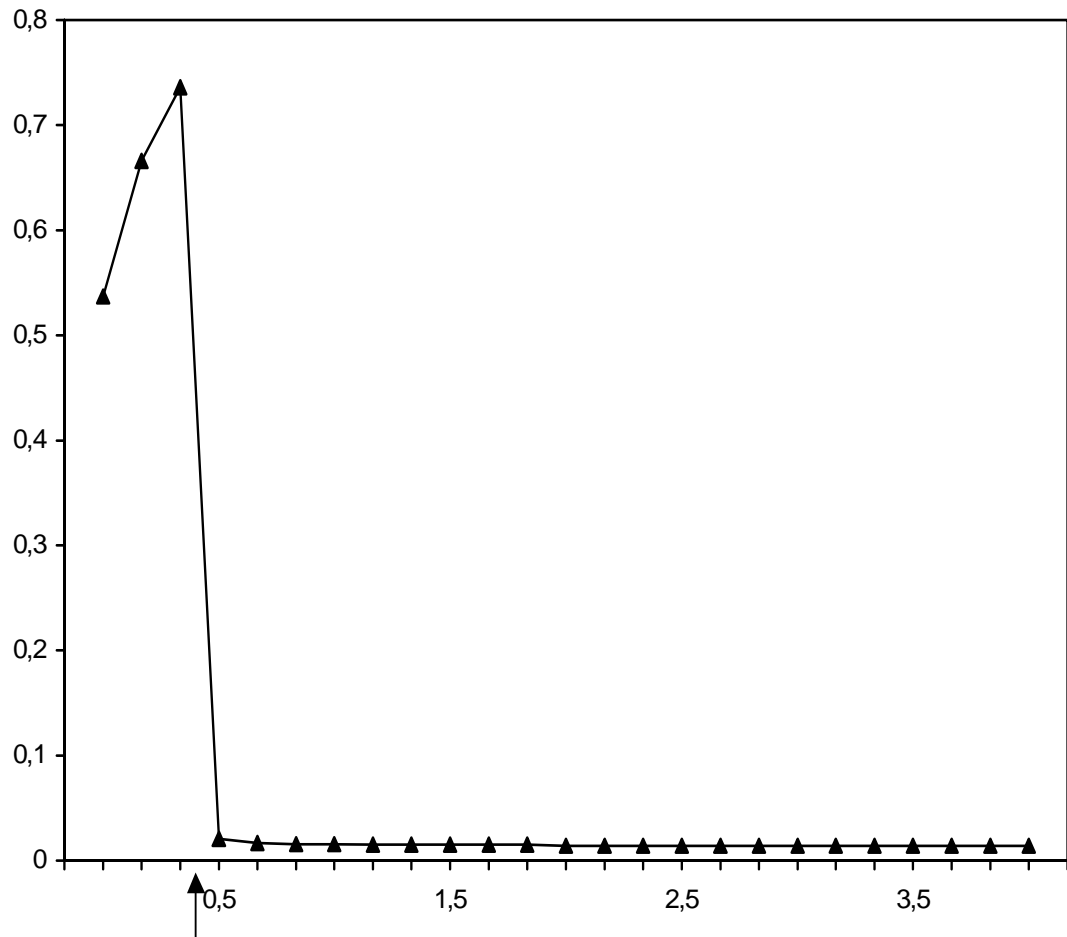


Abb. 21: Vollständige Hemmung der Chemilumineszenz bei der Oxidation von Indol-3-pyruvat durch den Superoxidation-Radikalfänger Tiron. Pfeil: Zugabe von Tiron (Endkonzentration: $2 \cdot 10^{-3}$ M); weitere Details wie in Abb. 19.

3.9 Eigenschaften der Kynurensäure als Radikalfänger

3.9.1 Reaktionen mit Hydroxylradikalen und Reduktion des ABTS-Kationradikals

Kynurensäure wurde in dem unter 2.8.1 beschriebenen ABTS-System auf ihre Eigenschaften als Hydroxyl- bzw. $\text{ABTS}^{\cdot+}$ -Fänger untersucht. Abb. 22 zeigt den Effekt der Kynurensäure auf die $\text{ABTS}^{\cdot+}$ -Bildung. Die erhaltenen Daten demonstrieren die Fähigkeit der Kynurensäure, mit ABTS um Hydroxylradikale zu konkurrieren. Die Hemmung der $\text{ABTS}^{\cdot+}$ -Bildung wurde bereits im Initialabschnitt der Reaktion beobachtet, in dem die Hydroxylradikalbildung dominiert. Die Entstehung von ABTS-Kationradikalen wurde mit ca. 19 % deutlich weniger gehemmt als jene durch Indol-3-pyruvat.

Zugabe von Kynurensäure nach 5 min Reaktionszeit, also nach annäherndem Erreichen einer stabilen $\text{ABTS}^{\cdot+}$ -Konzentration, erfolgte zur Prüfung auf die Fähigkeit, ABTS-Kationradikale zu reduzieren. Hierbei stellte sich Kynurensäure als ein schwaches Reduktans von ABTS-Kationradikalen heraus (Abb. 23). Die Abnahme der Extinktion nach Zugabe von Kynurensäure ging über den Verdünnungseffekt (siehe Kontrolle) kaum hinaus. Diese Unterschiede im Fangen von Hydroxyl- und ABTS-Kationradikalen reflektieren die unterschiedliche Reaktivität dieser Radikale, was bei einem nur mittelreaktiven Radikalfänger besonders deutlich zu Tage tritt.

3.9.2 Reaktionen mit Superoxidationradikalen

Entsprechend der geringeren Reaktivität der Kynurensäure zeigte diese im Hämatoxylin-Autoxidationssystem nur eine geringe Fähigkeit zum Fangen von Superoxidationen (Hemmung ca. 3 %; Abb. 24). Im Vergleich zum Hämatoxylin ist Kynurensäure demnach ein schwacher Superoxidationfänger, zumindest soweit direkte Interaktionen ohne zusätzliche Katalysemechanismen betroffen sind.

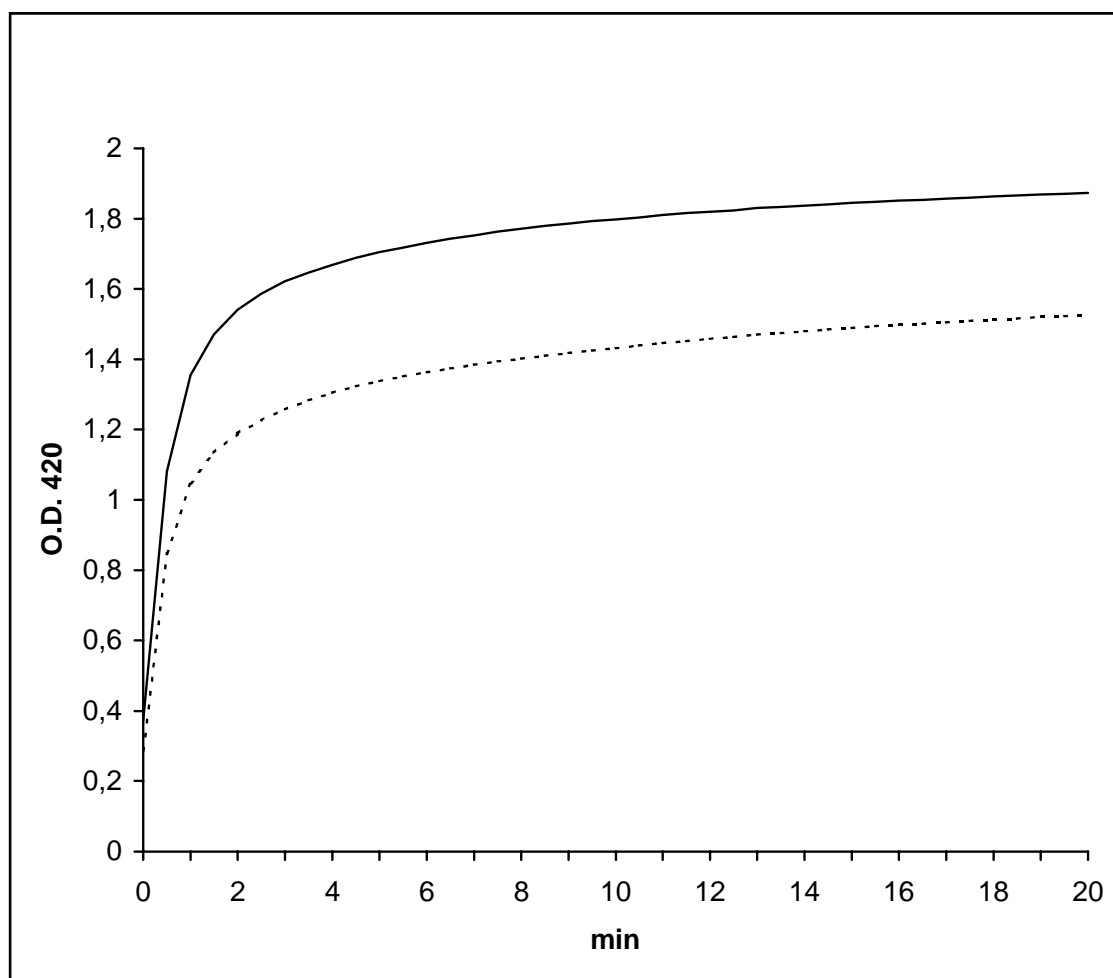


Abb. 22: Effekt von Kynurensäure auf die $\text{ABTS}^{\cdot+}$ -Bildung durch Hydroxylradikale.

Durchgezogene Linie: Kontrolle; gestrichelte Linie: Inkubation mit Kynurensäure; weitere Details wie in Abb. 15.

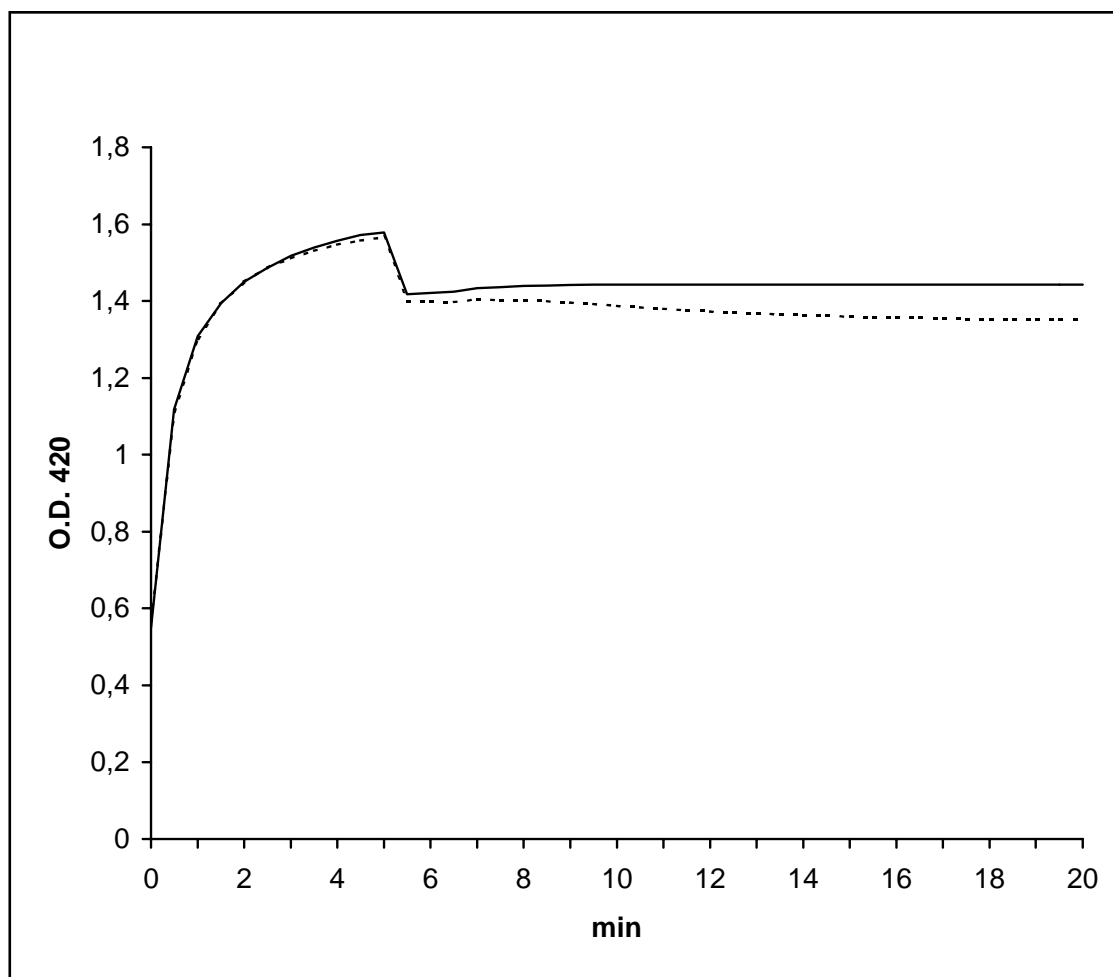


Abb. 23: Reduktion von ABTS-Kationradikalen durch Kynurensäure.

Details wie in Abb. 15 und 22.

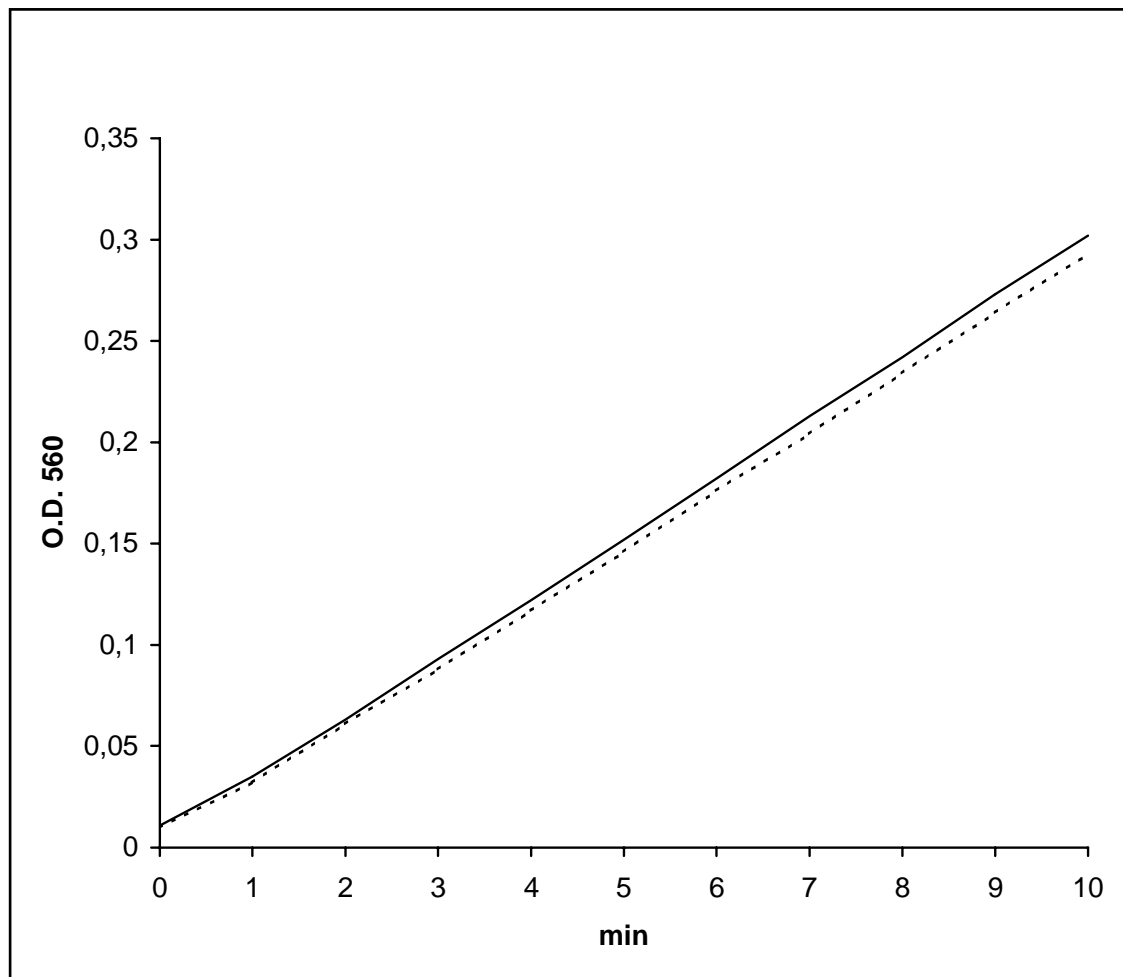


Abb. 24: Effekt von Kynurensäure auf die Autoxidation von Hämatoxylin.

Durchgezogene Linie: Kontrolle; gestrichelte Linie: Inkubation mit Kynurensäure; weitere Details wie in Abb. 17.

3.9.3 Chemilumineszenz bei der Oxidation von Kynurensäure

Die Lichtemission bei der Oxidation von Kynurensäure wurde zunächst in dem unter 2.10 beschriebenen alkalischen H_2O_2 -System ohne Hämin als Katalysator (Reaktionsansatz II) verfolgt (Abb. 25). Der Verlauf der Chemilumineszenz ist in diesem Reaktionsgemisch durch hohe Initialwerte (891.000 cpm) und ein rasches Abklingen (innerhalb von 30 min auf 227.000 cpm) gekennzeichnet. Konkurrierende Radikalfänger wurden aufgrund des schnellen Abfallens den Oxidationsgemischen vor Reaktionsbeginn zugesetzt. Durch DMSO wurde der initiale Gipfel der Lichtemission von 891.000 cpm auf 15.000 cpm nahezu vollständig unterdrückt (Abb. 25). Nach einer geringfügigen Zunahme der Chemilumineszenz auf 31.000 cpm während der ersten Reaktionstunde sank die Lichtemission bis zum Ende der Messung kontinuierlich auf 19.000 cpm. Ebenso bewirkte Tiron eine drastische Hemmung der initialen Chemilumineszenzrate auf 26.000 cpm (Abb. 25). In diesem Fall sank die Lichtemission kontinuierlich während der gesamten Reaktionszeit bis auf 5.000 cpm. Diese Ergebnisse zeigen, daß die zur Chemilumineszenz führende Oxidation in Gegenwart von H_2O_2 nicht von diesem selbst ausgeht, sondern von freien Radikalen, die bei basischem pH aus H_2O_2 entstehen. Darüber hinaus zeigen die Hemmungen durch beide konkurrierende Radikalfänger, daß sowohl Hydroxylradikale als auch Superoxidanionen für die Bildung eines chemilumineszenten Emitters erforderlich sind. Hinsichtlich der Superoxidanionen steht dieses Ergebnis nicht im Gegensatz zu dem Befund im Hämatoxylin-Autoxidationssystem, denn es handelt sich bei dem H_2O_2 enthaltenden Reaktionsgemisch um einen durch Hydroxylradikale katalysierten Vorgang.

Die Oxidation von Kynurensäure wurde auch in Gegenwart von Hämin als Katalysator (Reaktionsansatz I) untersucht. Abb. 26 zeigt den Zeitverlauf der Chemilumineszenz während der Oxidation der Kynurensäure. Die Kinetik weicht von jener ohne Hämin fundamental ab. Die Reaktion beginnt mit relativ niedrigen Werten, von denen aus die Lichtemission kontinuierlich zunimmt, um nach 5 h eine maximale Rate von 1.570.000 cpm zu erreichen. Die darauffolgende langsame Abnahme der Lumineszenz setzte sich über mehr als einen Tag fort (nach 24 h: 254.000 cpm).

Das ungewöhnlich lange Anhalten der Lichtemission ebenso wie der sich über Stunden hinziehende Anstieg stehen im Kontrast zu den üblichen bis dahin studierten Lumineszenzreaktionen. Die Unterschiede zwischen den Reaktionsansätzen I und II erstreckten sich nicht allein auf die Kinetik, sondern auch auf die maximal erreichbaren Lichtemissionsraten: Diese waren in Anwesenheit von Hämin erheblich höher.

Abb. 27 demonstriert die Wirkung von DMSO auf die Chemilumineszenz im Verlauf der Oxidation von Kynurensäure in Gegenwart von Hämin als Katalysator. Entsprechend dem langsamen Anstieg in diesem System wurde der konkurrierende Radikalfänger erst 3 h nach Reaktionsstart zugegeben. Dies führte zu einer schnellen und starken Abnahme der Lichtemission von 2.424.000 cpm auf 492.000 cpm. In den nächsten 3 h Reaktionsstunden zeigte sich ein weiteres, langsames Absinken der Lichtemission von 267.000 cpm auf 165.000 cpm. Das erneute Zufügen von DMSO 6 h nach Beginn der Messung resultierte in einer Abnahme der Chemilumineszenzrate von 165.000 cpm auf 118.000 cpm.

In Abb. 28 ist der Effekt von Tiron auf die Lichtemission im Verlauf der Hämin-katalysierten Oxidation von Kynurensäure dargestellt. Die Zugabe des Superoxidation-fängers 3 h nach Start der Reaktion verursachte einen instantanen Abfall der Chemilumineszenzrate auf basale Werte für die gesamte Dauer der Messung (von 1.294.000 cpm auf 16.000 cpm).

Soweit die Beteiligung der Radikalspezies betroffen ist, bestätigen, trotz der Unterschiede in Kinetik und maximaler Lichtemission, die Versuche in Gegenwart von Hämin jene, die in dessen Abwesenheit erhalten wurden. Auch im Hämin-katalysierten System ist die Erforderlichkeit von sowohl Hydroxylradikalen als auch Superoxid-anionen für die Emitterbildung eindeutig. Es besteht hinsichtlich der Hydroxylradikale somit ein klarer Unterschied zur Lumineszenz bei der Oxidation von Indol-3-pyruvat.

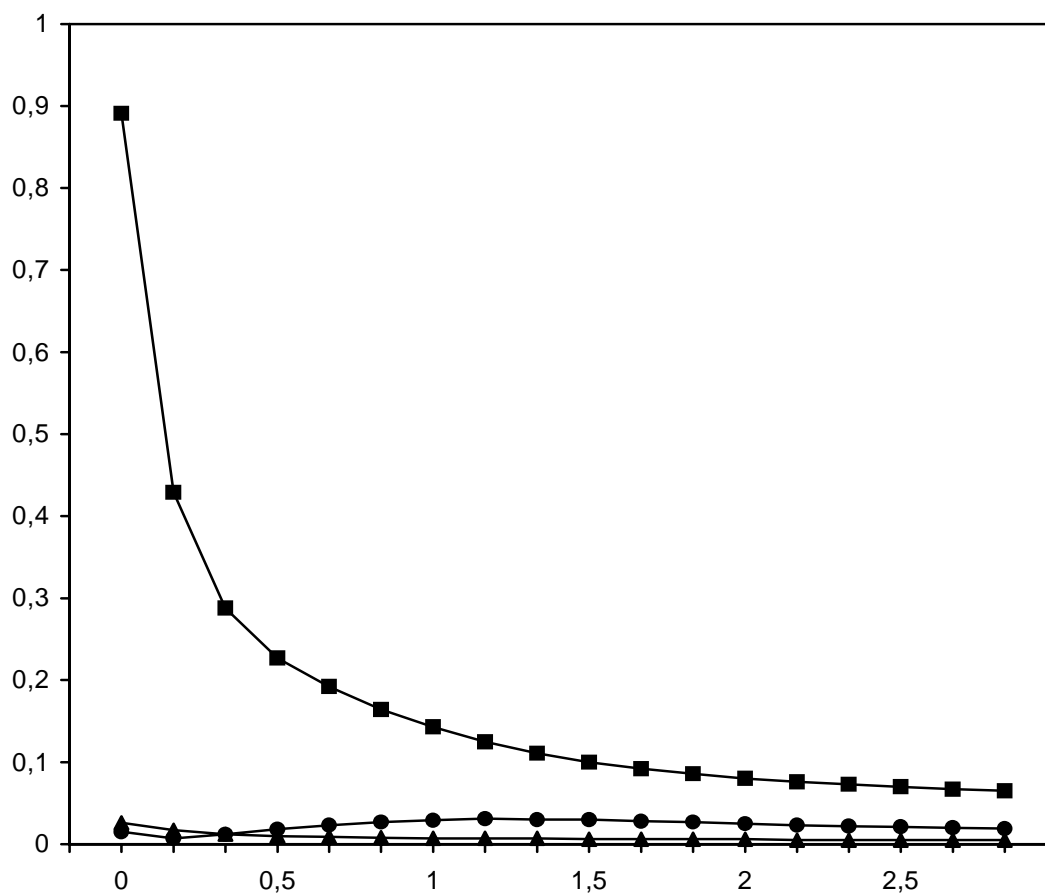


Abb. 25: Chemilumineszenz bei der Oxidation von Kynurensäure im alkalischen H_2O_2 -System ohne Hämin als Katalysator und Effekte von DMSO bzw. Tiron .

Ordinate: Lichtemission [Mio. cpm]; Abzisse: Reaktionszeit [h]; Lumineszenz ohne konkurrierende Radikalfänger (Rechtecke), in Gegenwart von DMSO (Kreise), und in Gegenwart von Tiron (Dreiecke).

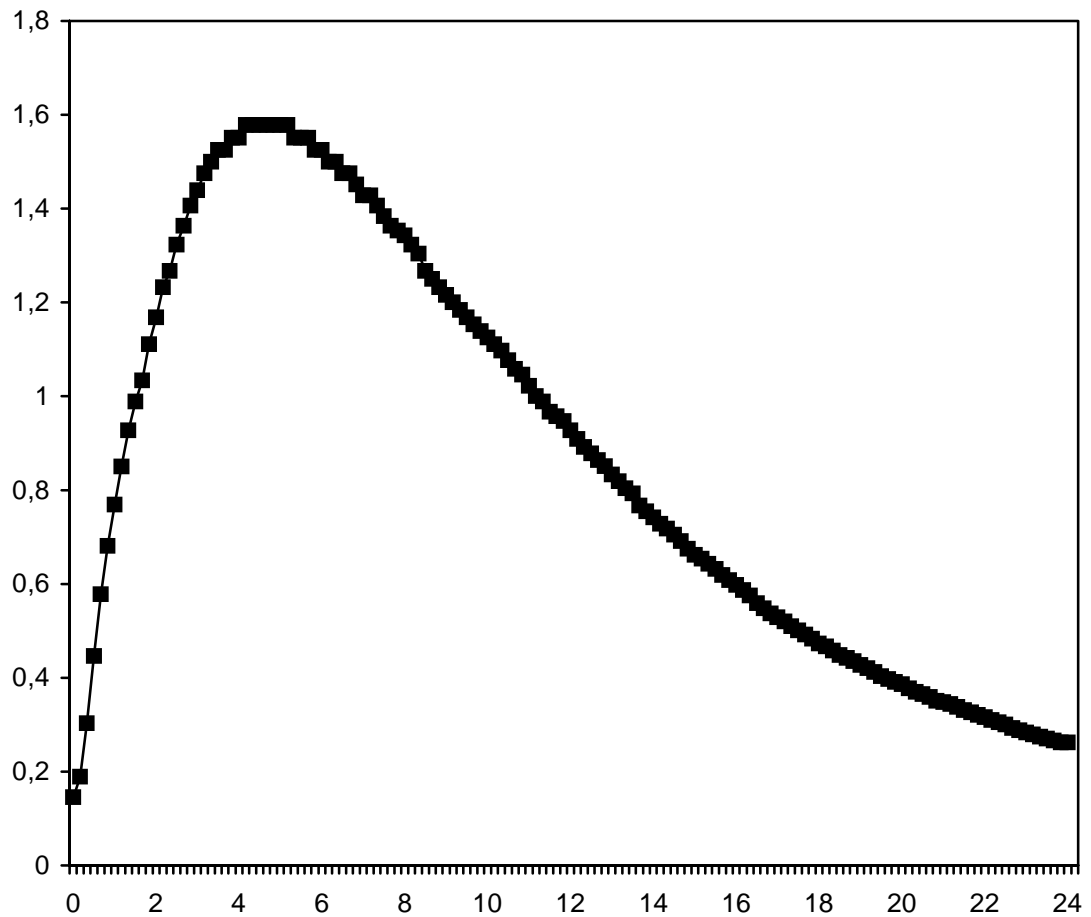


Abb. 26: Chemilumineszenz bei der Oxidation von Kynurensäure im alkalischen H_2O_2 -System mit Hämin als Katalysator.

Ordinate: Lichtemission [Mio. cpm]; Abzisse: Reaktionszeit [h].

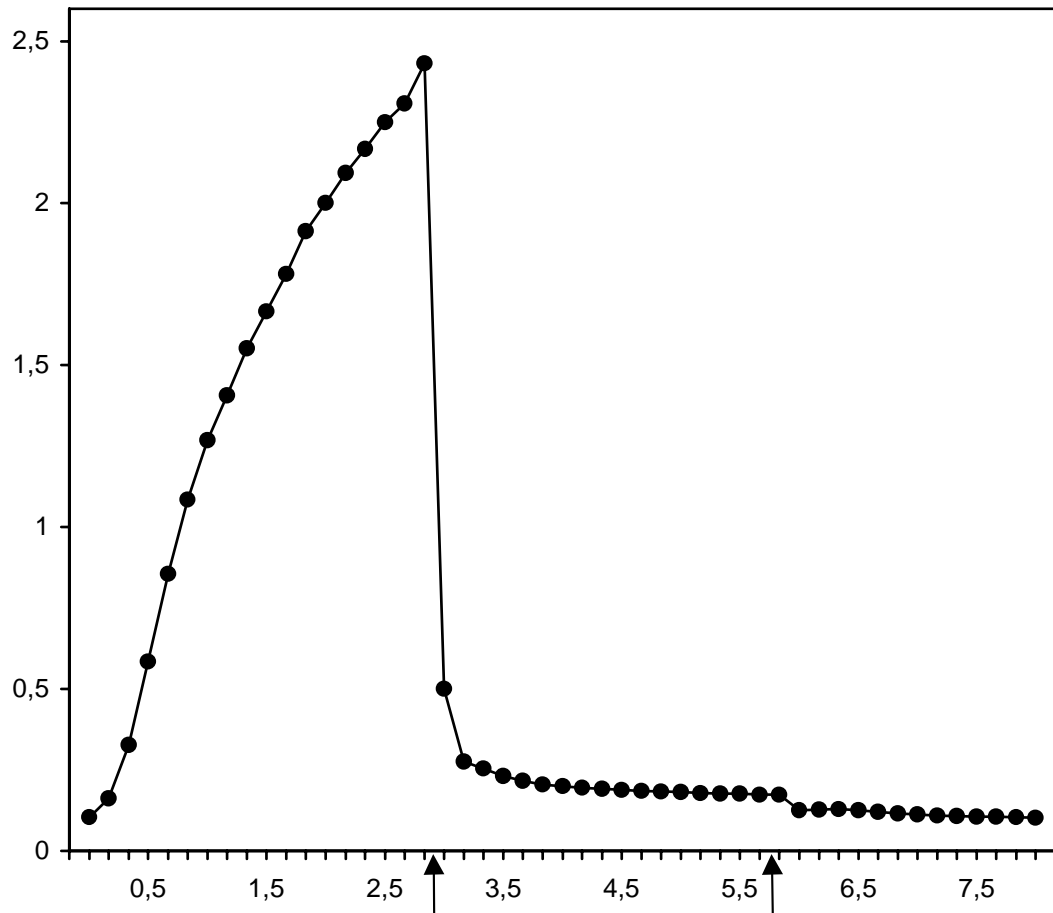


Abb. 27: Effekte von DMSO auf die Chemilumineszenz bei der Hämin-katalysierten Oxidation von Kynurensäure im alkalischen H_2O_2 -System.

Pfeile: Zugabe von jeweils 50 µl DMSO; weitere Details wie in Abb. 26.

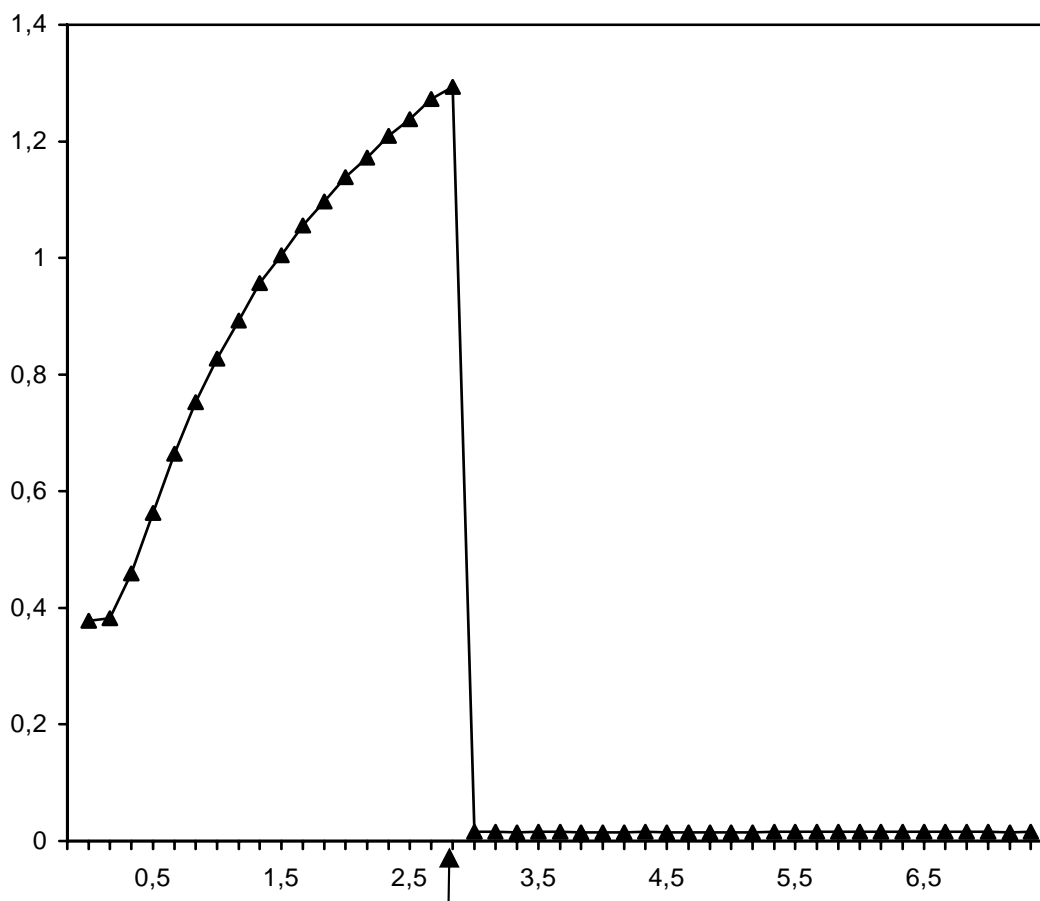


Abb. 28: Effekt von Tiron auf die Chemilumineszenz bei der Hämin-katalysierten Oxidation von Kynurensäure im alkalischen H_2O_2 -System.

Pfeil: Zugabe von Tiron ($100 \mu\text{l}$; Endkonzentration $2 \cdot 10^{-3} \text{ M}$); weitere Details wie in Abb. 26.

3.10 Eigenschaften von 4-Hydroxychinolin als Radikalfänger

Zur Überprüfung, welche Teile des Kynurensäure-Moleküls für seine Eigenschaften als Radikalfänger verantwortlich sein könnten, erfolgten vergleichende Untersuchungen mit einigen strukturverwandten Chinolinen, wie 4-Hydroxychinolin, Chinaldinsäure und Xanthurensäure. Anhand des ABTS-Systems wurden die o.g. Tryptophanmetabolite auf ihre Fähigkeit als Hydroxyl- bzw. ABTS-Kationradikalfänger untersucht. Auf ihre Interaktionen mit Superoxidanionradikalen wurden sie mittels Autoxidation von Hämatoxylin getestet. Die oxidativen Reaktionsverläufe mit freien Radikalen wurden außerdem anhand der Messung der Chemilumineszenz verfolgt.

3.10.1 Reaktionen mit Hydroxylradikalen und Reduktion des ABTS-Kationradikals

Die Anwesenheit von 4-Hydroxychinolin im ABTS-System bei Beginn der Reaktion führte nur zu einer geringfügigen Hemmung der $\text{ABTS}^{\cdot+}$ -Bildung und zeigte somit eine geringe Effizienz als Hydroxylradikalfänger (Abb. 29). Für die Fähigkeit, effizient mit Hydroxylradikalen zu interagieren, ist demnach die Carboxylgruppe der Kynurensäure erforderlich.

Die Zugabe von 4-Hydroxychinolin nach Erreichen einer stabilen $\text{ABTS}^{\cdot+}$ -Konzentration, 5 min nach Reaktionsstart, führte zu keiner nachweisbaren Reduktion der Kationradikale (Abb. 30). Angesichts der schon geringen Reduktionskapazität von Kynurensäure ist dieser Befund im Rahmen des Erwarteten.

3.10.2 Reaktionen mit Superoxidanionradikalen

Anhand der Autoxidation von Hämatoxylin wurde 4-Hydroxychinolin auf seine Eigenschaft als Superoxidanionfänger getestet. Die ermittelten Daten zeigten keine Hemmung der Hämateinbildung (Daten nicht gezeigt), ein Ausdruck seiner sehr geringen Fähigkeit, mit Superoxidanionradikalen zu interagieren.

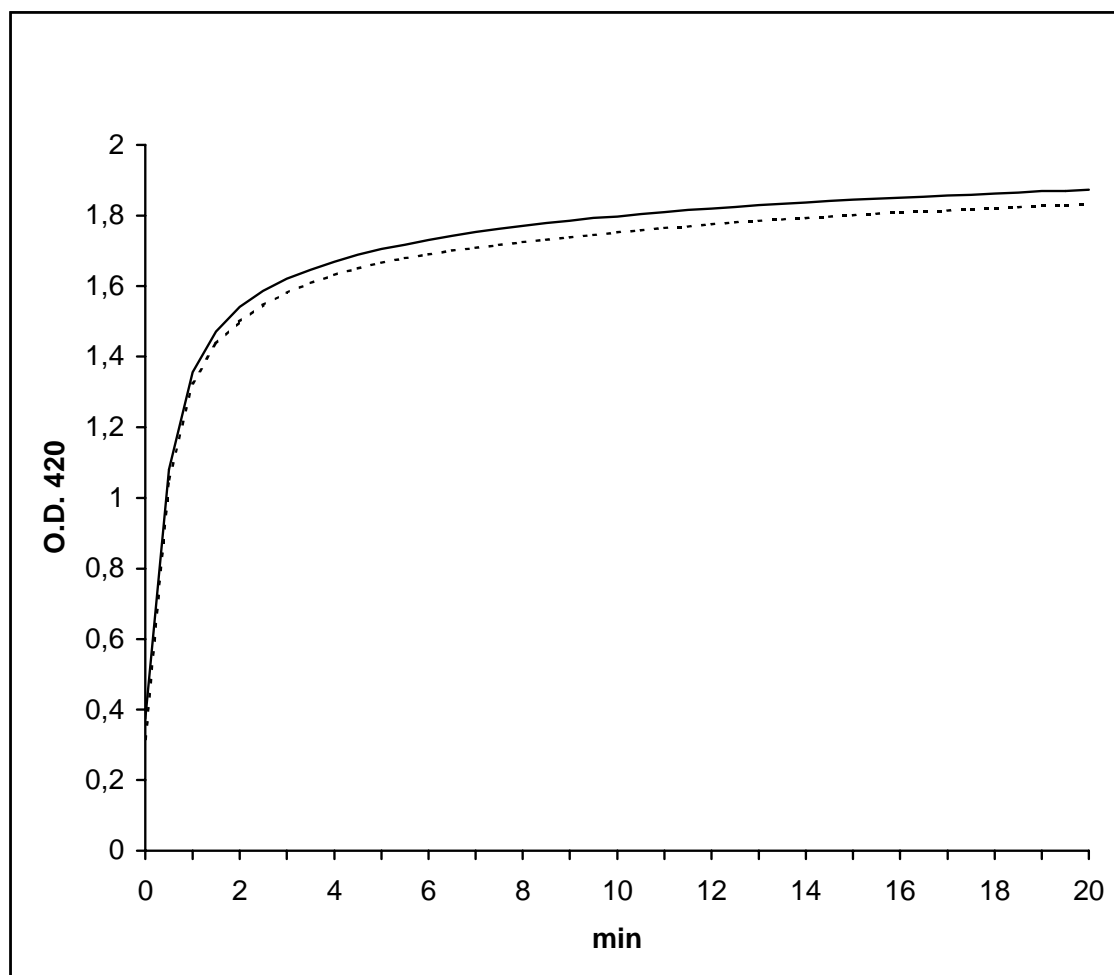


Abb. 29: 4-Hydroxychinolin hemmt die $\text{ABTS}^{\cdot+}$ -Bildung durch Hydroxylradikale nur wenig.

Durchgezogene Linie: Kontrolle; gestrichelte Linie: Inkubation mit 4-Hydroxychinolin; weitere Details wie in Abb. 15.

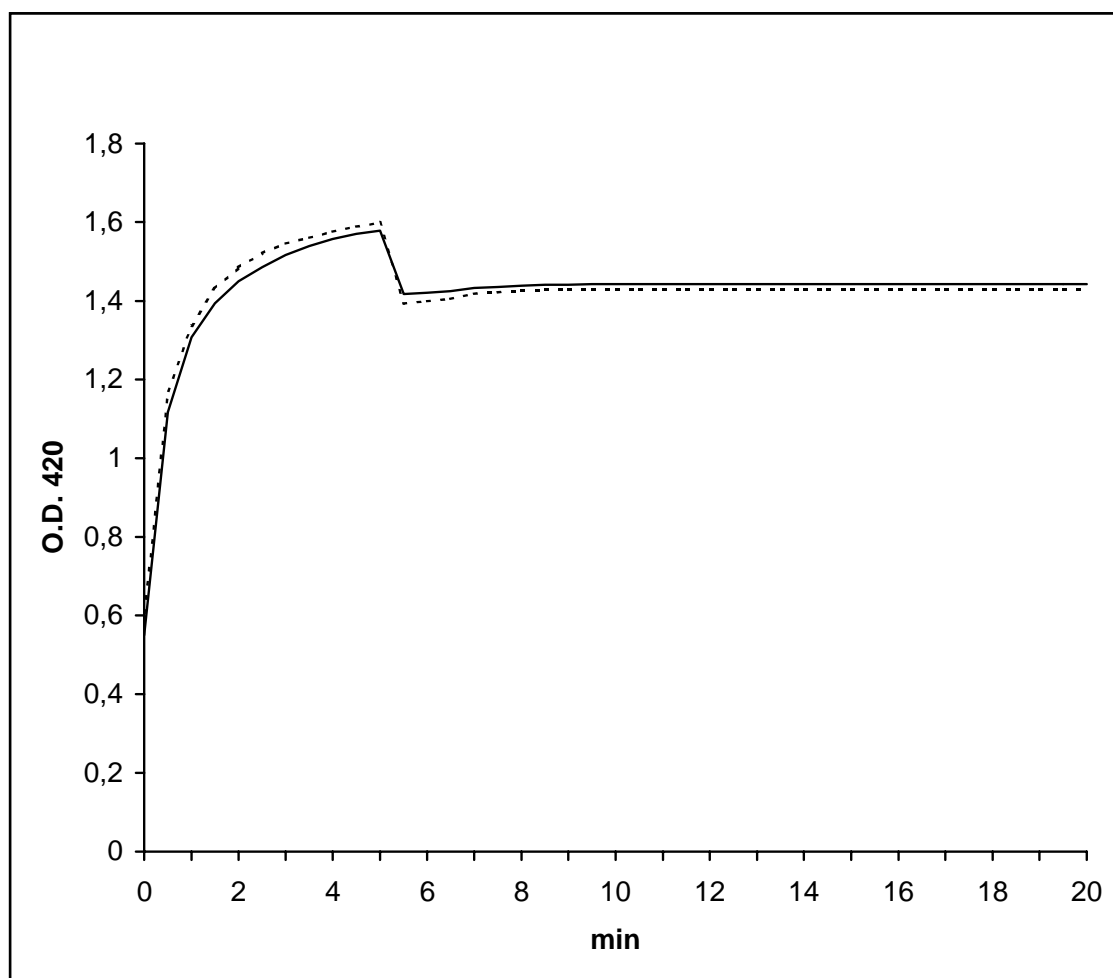


Abb. 30: ABTS-Kationradikale werden durch 4-Hydroxychinolin nicht reduziert.
Details wie in Abb. 15 und 29.

3.10.3 Chemilumineszenz bei der Oxidation von 4-Hydroxychinolin

Trotz der geringen Reaktivität des 4-Hydroxychinolins gegenüber freien Radikalen wurde seine Oxidierbarkeit auch im alkalischen H_2O_2 -System untersucht, sowohl in Abwesenheit (Reaktionsansatz II) als auch in Anwesenheit (Reaktionsansatz I) von Hämin als Katalysator, und hierbei die Lichtemission verfolgt.

In Abwesenheit von Hämin wurde trotz der erwähnten geringen Reaktivität immerhin doch Chemilumineszenz detektiert, wenn auch mit recht geringen Raten (Abb. 31). Dieses Ergebnis belegt zudem die hohe Sensitivität der Methode. Der Zeitverlauf ähnelt, wenn auch auf niedrigerem Niveau, dem aus dem entsprechenden Experiment mit Kynurensäure: die höchsten Werte werden am Reaktionsbeginn gemessen (197.000 cpm); innerhalb von 30 min war die Lichtemission auf 69.000 cpm abgefallen. DMSO unterdrückte die Chemilumineszenz nahezu vollständig (Abb. 31). Tiron führte im Vergleich zu den Experimenten mit Indol-3-pyruvat oder Kynurensäure zu einem etwas abweichenden Ergebnis. Die initiale Chemilumineszenzrate war nur geringfügig auf 160.000 cpm herabgesetzt, während die Abnahme der Lichtemission verlangsamt war und über die gesamte Dauer der Messung höhere Reaktionsraten als in Abwesenheit von Tiron gemessen wurden.

In Gegenwart von Hämin war die durchschnittliche Chemilumineszenz aus der Oxidation von 4-Hydroxychinolin höher (Abb. 32), besaß jedoch einen anderen Zeitverlauf. Ähnlich wie bei dem entsprechenden Experiment mit Kynurensäure führte die Präsenz des Katalysators zu einer sehr lang anhaltenden Lichtemission. Die ersten 6 Reaktionsstunden waren durch einen langsamen, kontinuierlichen Anstieg von 46.000 cpm auf 121.000 cpm gekennzeichnet. Hernach stellte sich ein Plateau von ca. 124.000 cpm ein, welches bis Ende der 12-stündigen Messung aufrechterhalten wurde.

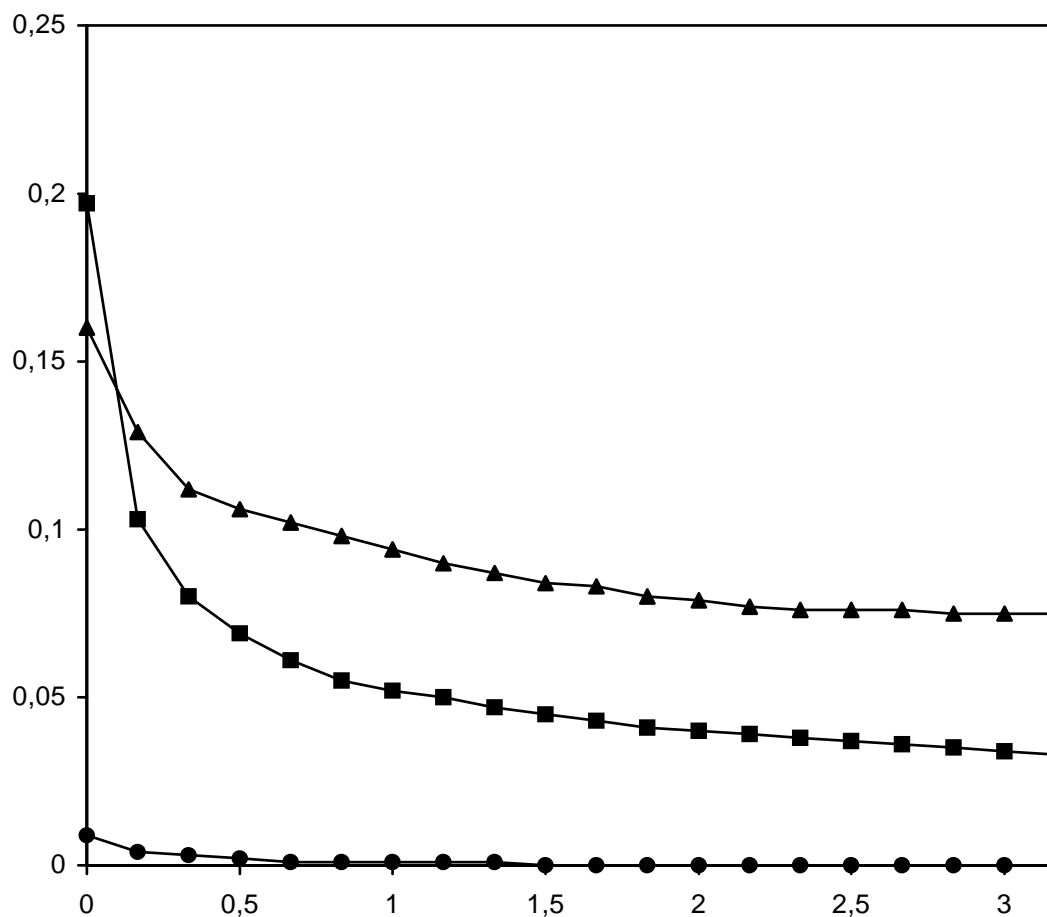


Abb. 31: Nachweis der Oxidierbarkeit von 4-Hydroxychinolin mit freien Radikalen durch Messung der Chemilumineszenz im alkalischen H_2O_2 -System ohne Hämin; Effekte von DMSO und Tiron.

Ordinate: Lichtemission [Mio. cpm]; Abzisse: Reaktionszeit [h]; Lumineszenz ohne konkurrierende Radikalfänger (Rechtecke), in Gegenwart von DMSO (Kreise), und in Gegenwart von Tiron (Dreiecke).

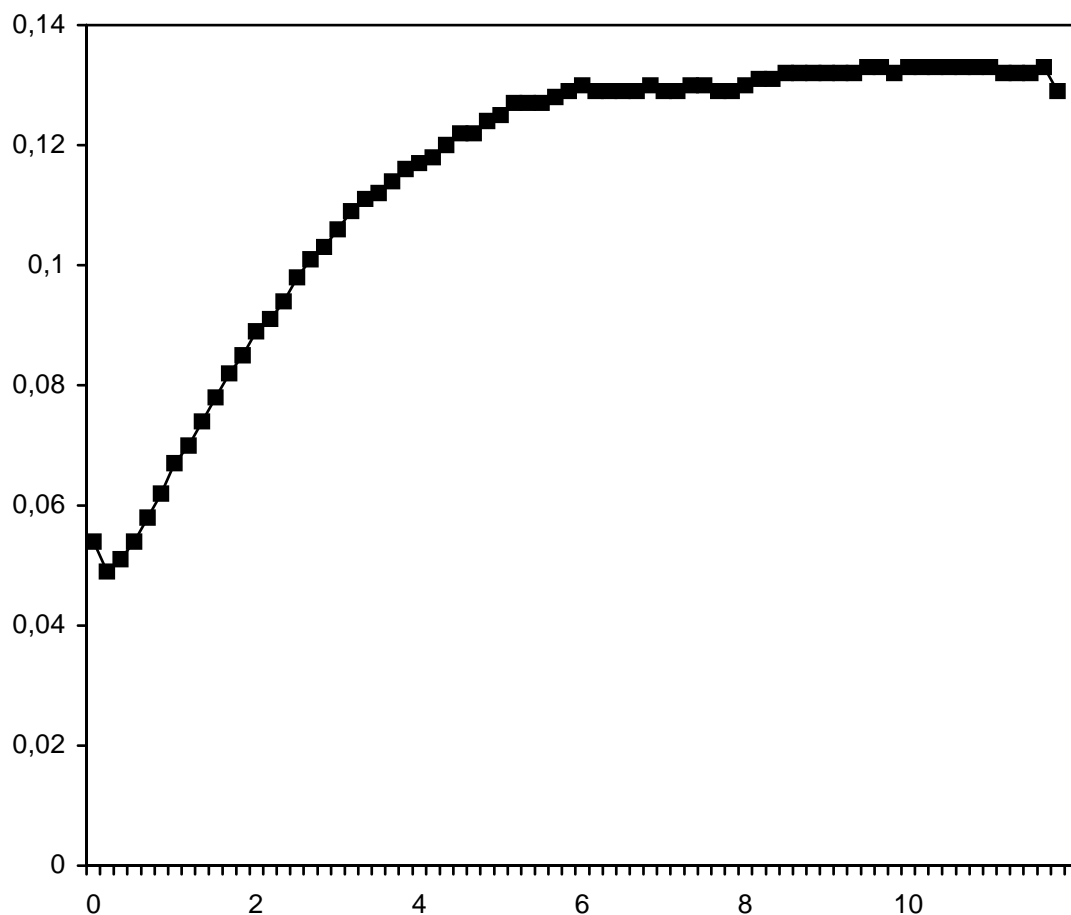


Abb. 32: Chemilumineszenz bei der Oxidation von 4-Hydroxychinolin im alkalischen H_2O_2 -System mit Hämin als Katalysator.

Ordinate: Lichtemission [Mio. cpm]; Abzisse: Reaktionszeit [h].

3.11 Eigenschaften von Chinaldinsäure als Radikalfänger

Um die Bedeutung der 4-Hydroxy-Gruppe für das Redox-Verhalten von Kynurensäure einschätzen zu können, wurden vergleichende Experimente zu den vorangegangenen mit Chinaldinsäure durchgeführt, welcher dieser Rest fehlt.

3.11.1 Reaktionen mit Hydroxylradikalen und Reduktion des ABTS-Kationradikals

Abb. 33 zeigt den Effekt von Chinaldinsäure im ABTS-Kompetitionssystem. Im aufsteigenden Abschnitt der Absorptionskurve, in welchem die Generierung von Hydroxylradikalen überwiegt, vermochte Chinaldinsäure keine substantielle Hemmung der $\text{ABTS}^{\cdot+}$ -Bildung zu bewirken. Etwa ab dem Erreichen der Plateau-Phase im Kontroll-Lauf führte Chinaldinsäure zu einer langsamen, aber stetigen Abnahme der ABTS-Kationradikale. Chinaldinsäure ist demnach trotz ihrer geringen Reaktivität gegenüber Hydroxylradikalen imstande, $\text{ABTS}^{\cdot+}$ zu reduzieren.

In Abb. 34 ist die Reduktion von ABTS-Kationradikalen bei Zugabe von Chinaldinsäure nach 5 min dargestellt. Im Einklang mit dem vorangegangenen Experiment verursachte Chinaldinsäure keine sofortige Abnahme der $\text{ABTS}^{\cdot+}$ -Konzentration über den Verdünnungseffekt hinaus, wohl aber eine langsame, aber progressive Reduktion von $\text{ABTS}^{\cdot+}$.

Die in Position 4 der Kynurensäure vorhandene Hydroxylgruppe ist demnach für deren Eigenschaft als Hydroxylradikalfänger von entscheidender Bedeutung, nicht jedoch grundsätzlich für die Fähigkeit, Eielektronentransferreaktionen einzugehen.

3.11.2 Prüfung auf Reaktion mit Superoxidanionradikalen

Im Hämatoxylin-Autoxidationssystem zeigte Chinaldinsäure nur eine unwesentliche, 3 %ige Hemmung der Hämatein-Bildung (Abb. 35), erwies sich somit als wenig befähigt, Superoxidanionradikale direkt ohne Katalyse zu fangen. In dieser Hinsicht unterscheidet sich Chinaldinsäure aber auch nicht grundsätzlich von Kynurensäure oder 4-Hydroxychinolin.

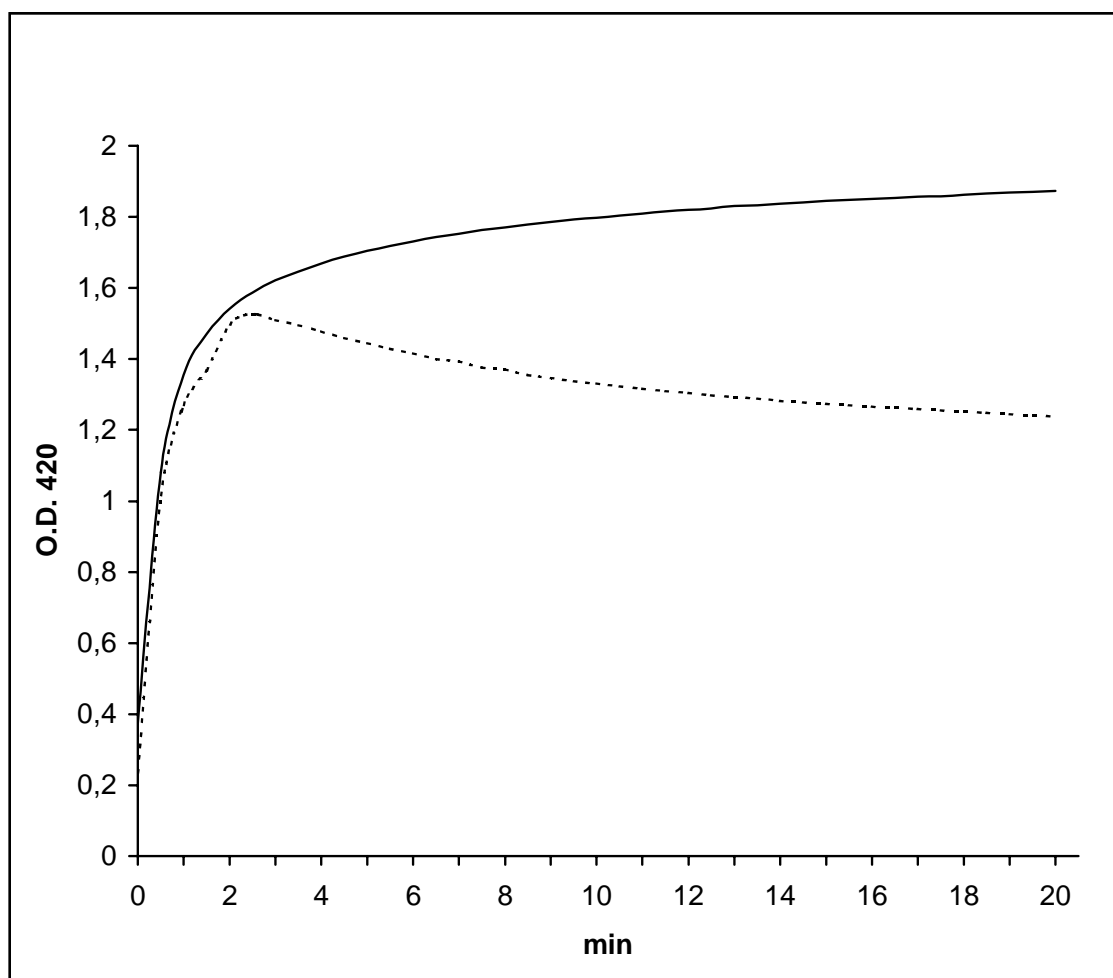


Abb. 33: Verlauf der $\text{ABTS}^{\cdot+}$ -Konzentration im ABTS -Kompetitionssystem in Gegenwart von Chinaldinsäure.

Durchgezogene Linie: Kontrolle; gestrichelte Linie: Inkubation mit Chinaldinsäure; weitere Details wie in Abb. 15.

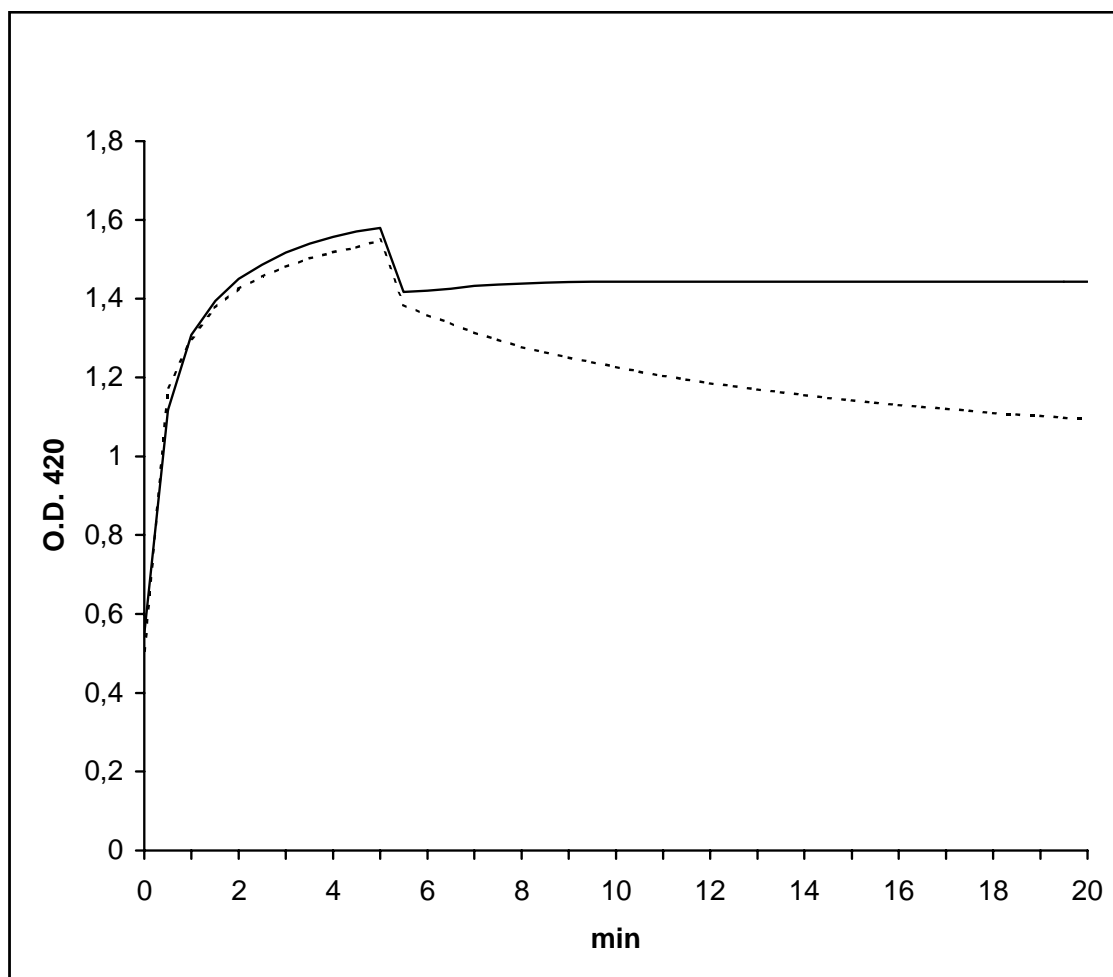


Abb. 34: Reduktion von ABTS-Kationradikalen durch Chinaldinsäure.

Details wie in Abb. 15 und 33.

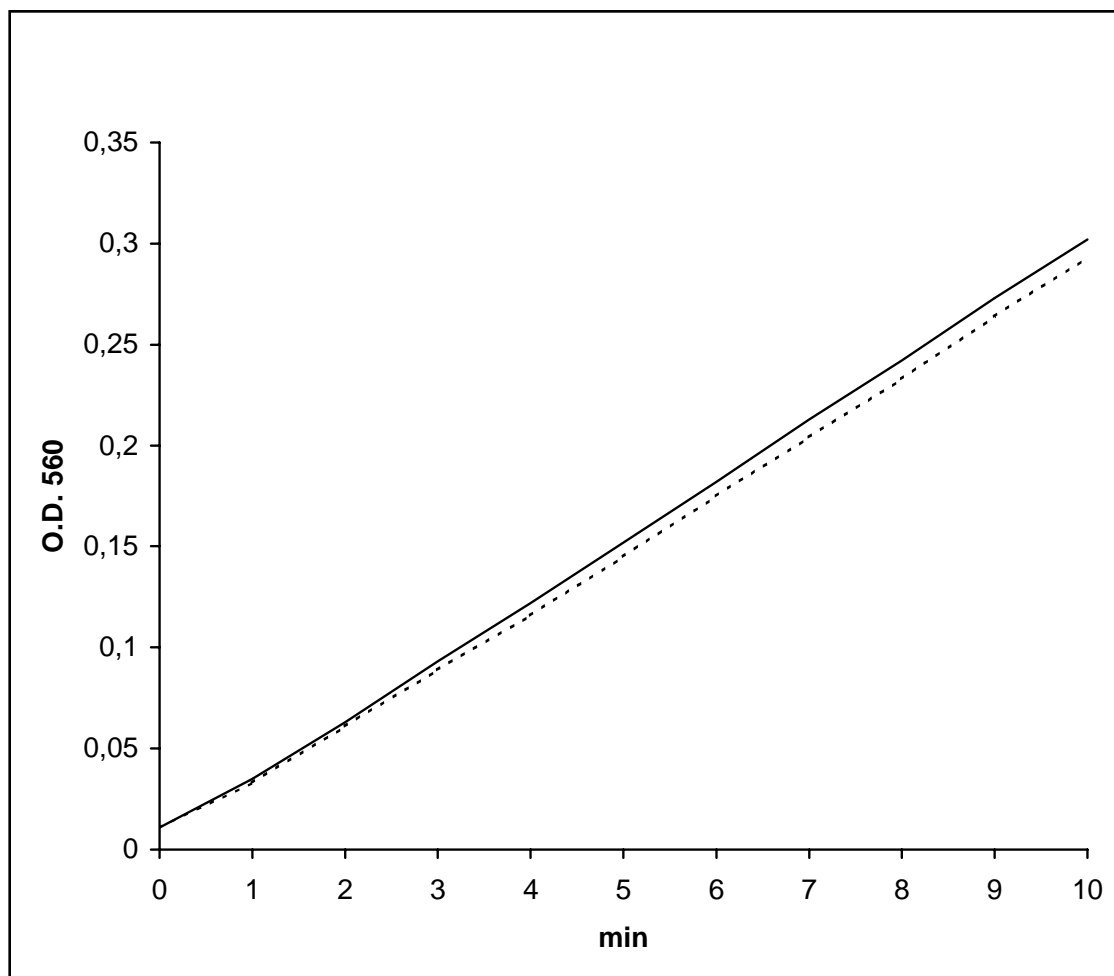


Abb. 35: Geringer Effekt von Chinaldinsäure auf die Autoxidation von Hämatoxylin.

Durchgezogene Linie: Kontrolle; gestrichelte Linie: Inkubation mit Chinaldinsäure; weitere Details wie in Abb. 17.

3.11.3 Chemilumineszenz bei der Oxidation von Chinaldinsäure

In Abwesenheit von Hämin ist im alkalischen H_2O_2 -System nur eine geringe Lichtemission bei der Oxidation von Chinaldinsäure zu detektieren (Abb. 36), ein Befund, der im Einklang mit der geringen Reaktivität gegenüber Hydroxylradikalen steht. Die Kinetik ähnelte jener von Kynurensäure und 4-Hydroxychinolin, jedoch war die initiale Rate nicht höher als 22.000 cpm. Die gemessenen Chemilumineszenzraten waren somit im Vergleich zu Kynurensäure und auch zu 4-Hydroxychinolin wesentlich geringer. Sowohl DMSO als auch Tiron führten zu einer baldigen und weitgehenden Unterdrückung der ohnehin niedrigen Lichtemissionraten.

Die in Gegenwart von Hämin erhaltenen Chemilumineszenzwerte waren etwas höher als in Abwesenheit des Katalysators, blieben jedoch im Vergleich zu Kynurensäure und 4-Hydroxychinolin relativ niedrig (Abb. 37). Die Kinetik erinnerte eher an die Verläufe ohne Hämin und es war auch über eine ausgedehnte Meßreihe von 20 h kein Anstieg festzustellen. Stattdessen fiel die Chemilumineszenzrate von 48.000 cpm am Beginn der Messung bereits in der ersten Reaktionsstunde auf 16.000 cpm ab. Die darauffolgende langsame Abnahme der Chemilumineszenz setzte sich während der gesamten Dauer der Messung fort.

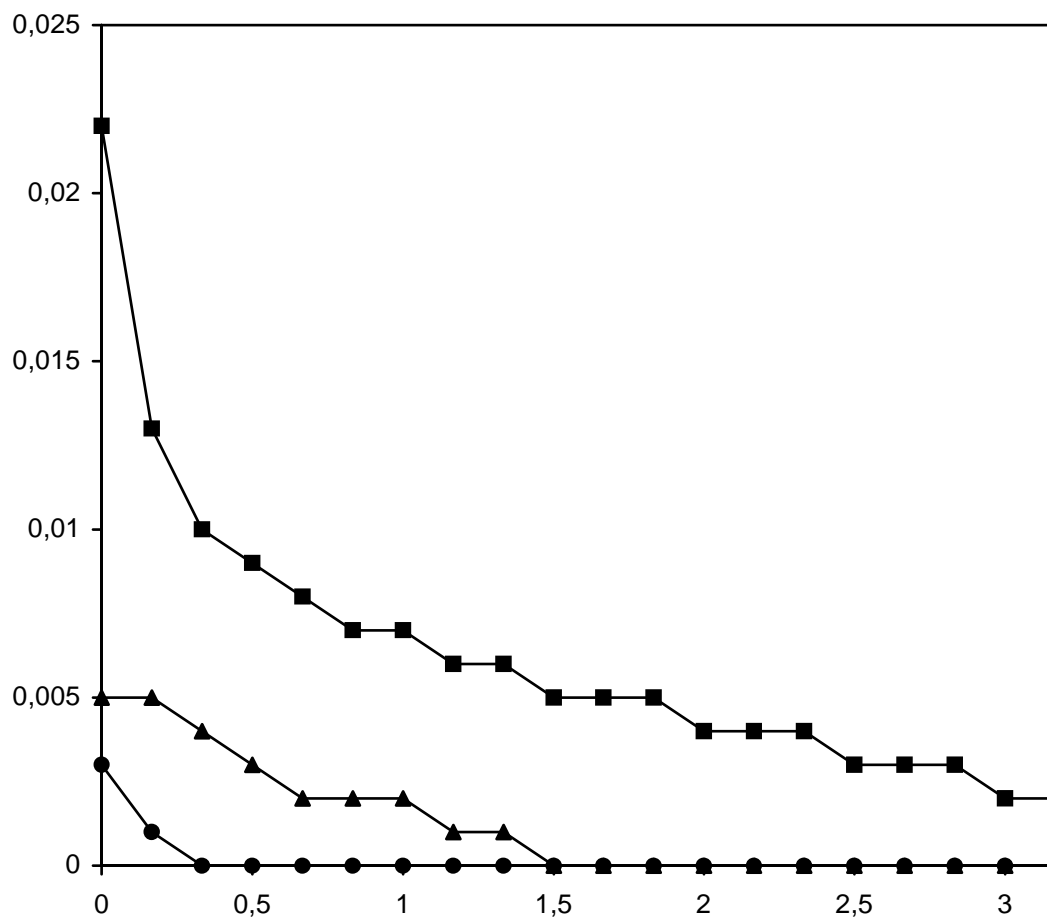


Abb. 36: Chemilumineszenz bei Inkubation von Chinaldinsäure im alkalischen H_2O_2 -System ohne Hämin als Katalysator und Effekte von DMSO bzw. Tiron.

Ordinate: Lichtemission [Mio. cpm]; Abzisse: Reaktionszeit [h]; Lumineszenz ohne konkurrierende Radikalfänger (Rechtecke), in Gegenwart von DMSO (Kreise), und in Gegenwart von Tiron (Dreiecke).

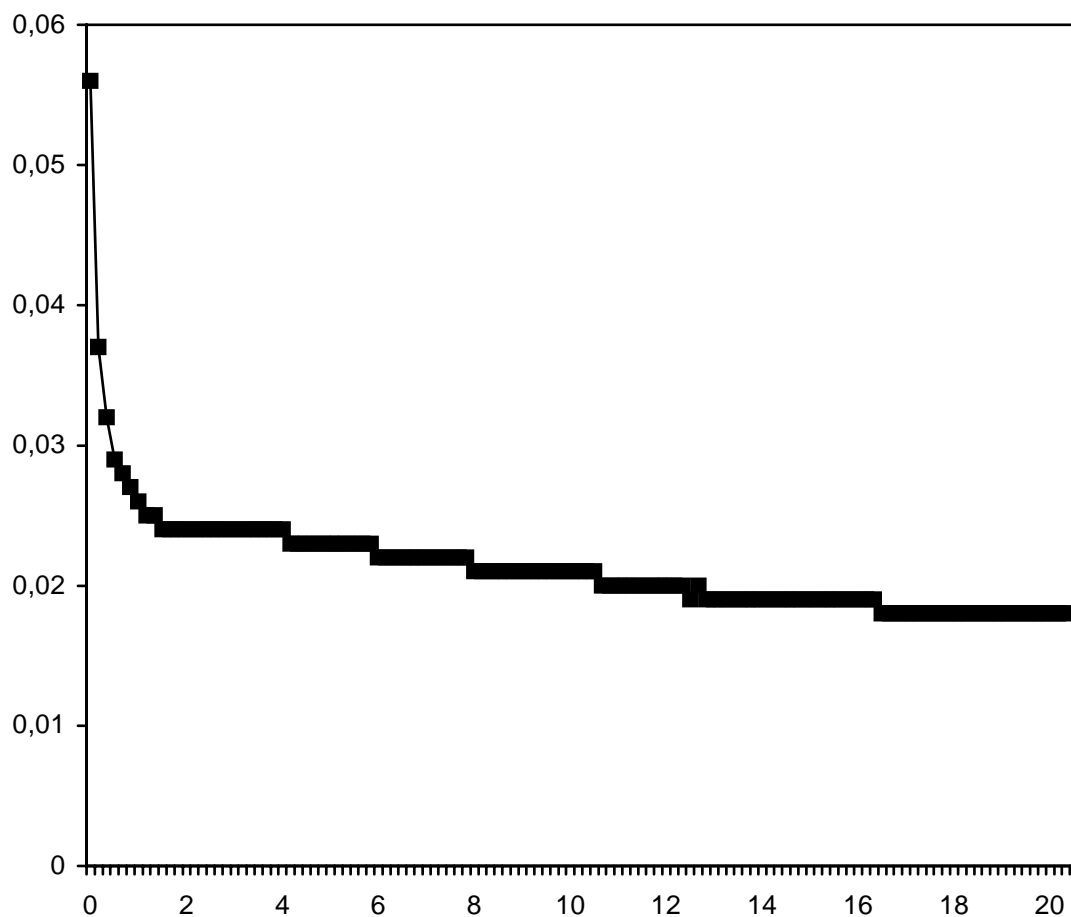


Abb. 37: Chemilumineszenz bei der Inkubation von Chinaldinsäure im alkalischen H_2O_2 -System mit Häm als Katalysator.

Ordinate: Lichtemission [Mio. cpm]; Abzisse: Reaktionszeit [h].

3.12 Eigenschaften der Xanthurensäure als Radikalfänger

Xanthurensäure ist das physiologisch wichtigste Analog der Kynurensäure und besitzt eine zusätzliche Hydroxylgruppe in Position 8. Diese könnte sowohl die Reaktivität erhöhen als auch, bei geeignetem pH, über eine intramolekulare Wasserstoffbrücke die Verfügbarkeit des Stickstoffs für Radikalreaktionen vermindern.

3.12.1 Reaktionen mit Hydroxylradikalen und Reduktion des ABTS-Kationradikals

Die Untersuchung von Xanthurensäure auf ihre Eigenschaften als Hydroxyl- bzw. ABTS-Kationradikalfänger erfolgte in dem unter 2.8.1 beschriebenen ABTS-System.

Die Gegenwart von Xanthurensäure von Beginn der Reaktion an führte zu einer sofortigen und sehr effizienten Hemmung der ABTS-Kationradikalbildung als Ausdruck seiner Fähigkeit, mit ABTS um Hydroxylradikale zu kompetieren (Abb. 38). Die Bildung von ABTS-Kationradikalen wurde, ähnlich wie beim Indol-3-pyruvat, durch Xanthurensäure um 57 % vermindert. Auch als Reduktans von ABTS-Kationradikalen erwies sich Xanthurensäure als sehr effizient (Abb. 39). Die Zugabe von Xanthurensäure nach 5 min Reaktionszeit, d.h. nach Erreichen einer annähernd stabilen $\text{ABTS}^{\cdot+}$ -Konzentration, verursachte einen Abfall der Extinktion um etwa 75 %, der über den Verdünnungseffekt von ca. 10 % weit hinausging.

3.12.2 Reaktionen mit Superoxidanionradikalen

Im Gegensatz zu Kynurensäure bzw. deren zuvor getesteten Analoga vermochte Xanthurensäure im Hämatoxilin-Autoxidationssystem die Hämatein-Bildung sehr effektiv um etwa 30 % zu hemmen und erwies sich somit als effektiver Kompetitor um Superoxidanionradikale (Abb. 40). Es sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, daß die Interaktion mit Superoxidanionradikalen in diesem System von einem Katalysator unabhängig war, die Xanthurensäure folglich Superoxidanionen direkt zu fangen vermag und sich in dieser Hinsicht von Kynurensäure und den anderen getesteten Analoga unterscheidet.

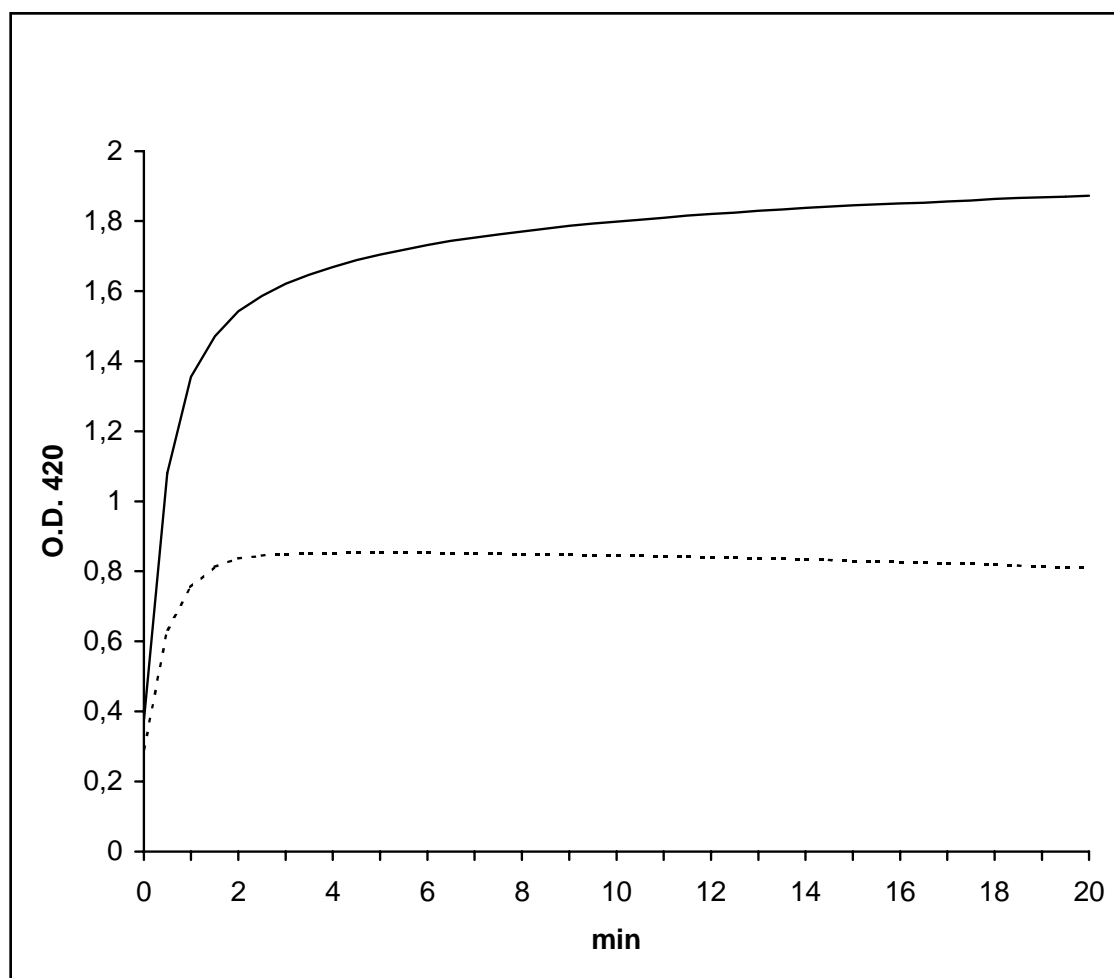


Abb. 38: Effekt von Xanthurensäure auf die $\text{ABTS}^{\cdot+}$ -Bildung durch Hydroxylradikale.

Durchgezogene Linie: Kontrolle; gestrichelte Linie: Inkubation mit Xanthurensäure; weitere Details wie in Abb. 15.

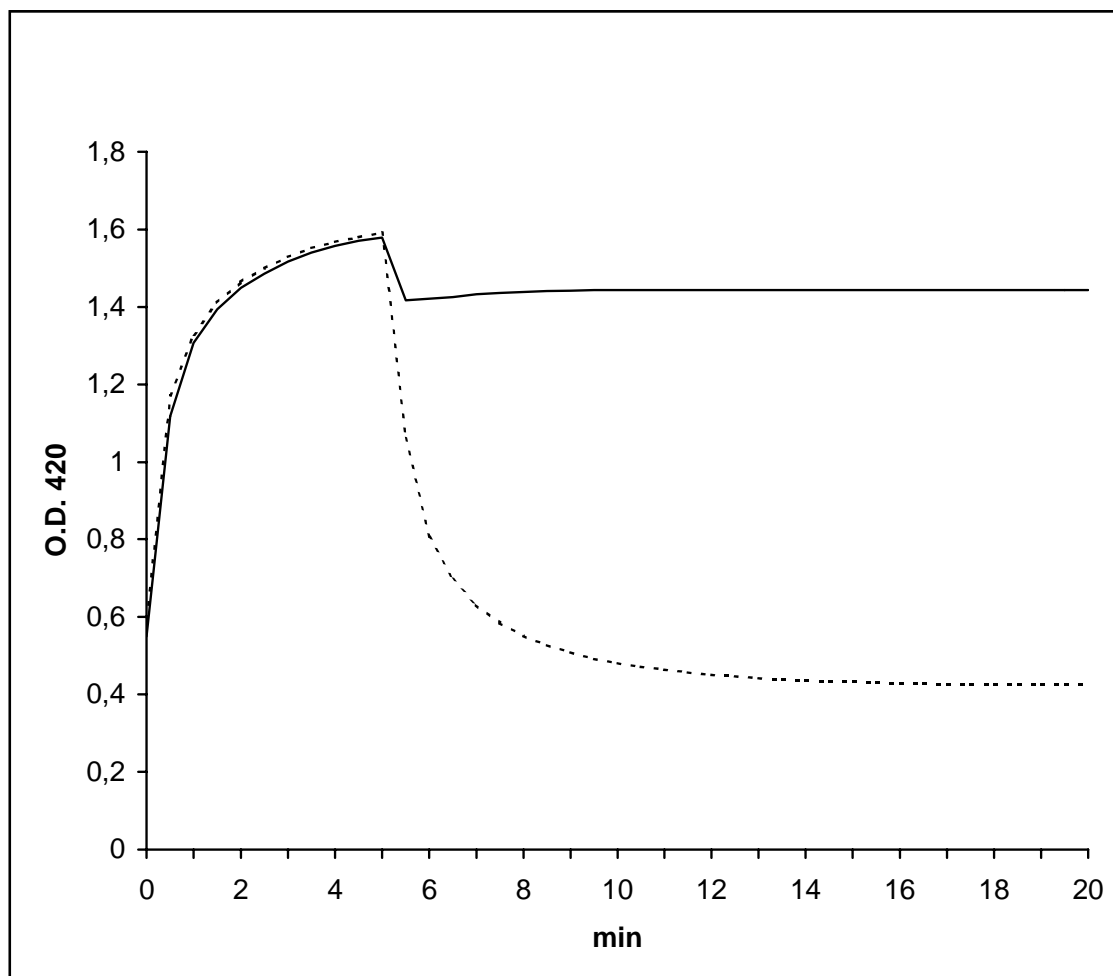


Abb. 39: Reduktion von ABTS-Kationradikalen durch Xanthurensäure.
Details wie in Abb. 15 und 38.

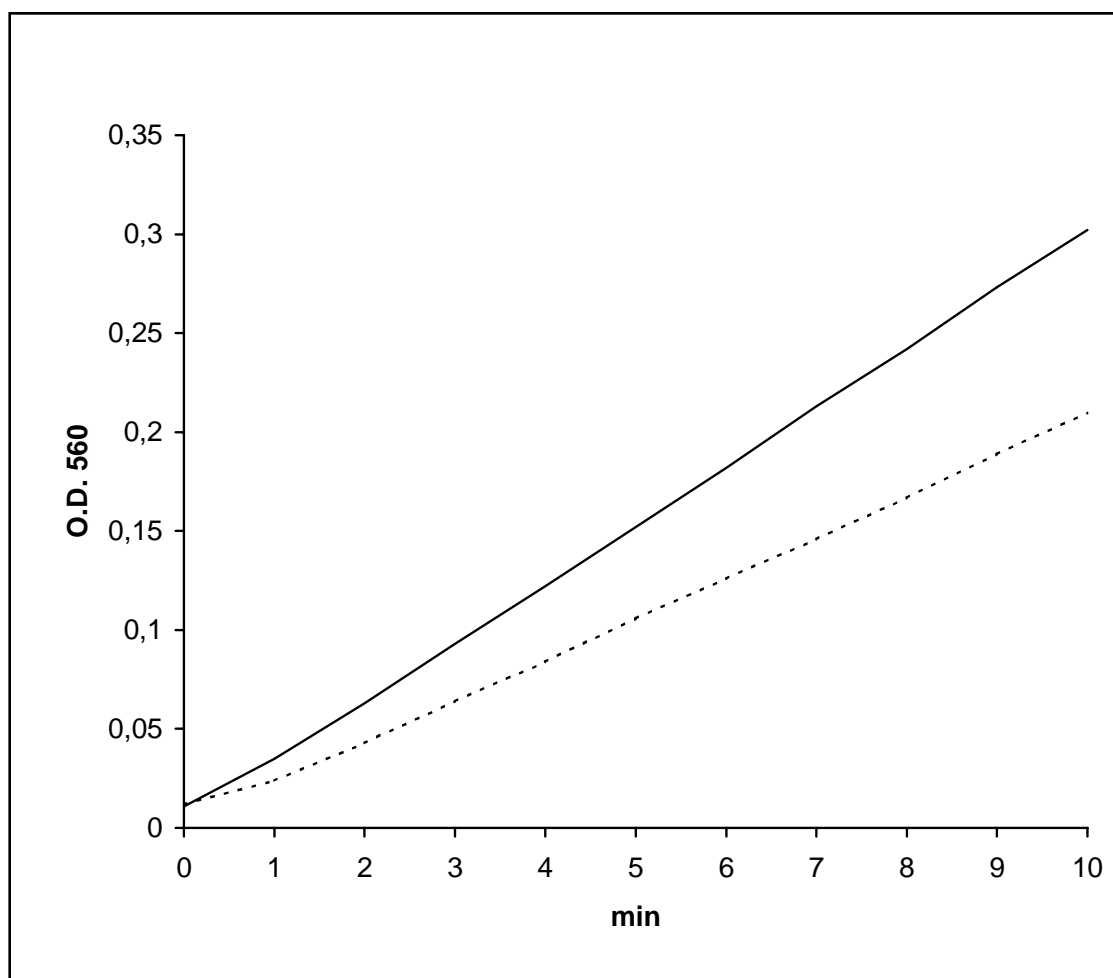


Abb. 40: Hemmung der Autoxidation von Hämatoxylin durch Xanthurensäure als Ausdruck des Fangens von Superoxidanionen.

Ordinate: Absorption von Hämatoxylin; Abzisse: Inkubationszeit [min]; durchgezogene Linie: Kontrolle; gestrichelte Linie: Inkubation mit Xanthurensäure.

3.12.3 Chemilumineszenz bei der Oxidation von Xanthurensäure

Abb. 41 zeigt die Chemilumineszenz im Verlauf der Oxidation von Xanthurensäure in Abwesenheit von Hämin. Im Gegensatz zu der für die Oxidation von Kynurensäure, 4-Hydroxychinolin und Chinaldinsäure typischen Kinetik, die durch einen schnellen Abfall gekennzeichnet war, zeigte sich im Falle der Xanthurensäure in den ersten 4 Reaktionsstunden eine langsame, kontinuierliche Zunahme der Lichtemission. Die maximale Chemilumineszenzrate wurde ca. 4 h nach Reaktionsstart mit 37.000 cpm erreicht. Die Photonemission war somit deutlich niedriger als bei der Kynurensäure, trotz der höheren Reaktivität der Xanthurensäure im ABTS- und im Hämatoxylin-System.

Aufgrund der niedrigen Lumineszenzrate während der Oxidation von Xanthurensäure erfolgte die Zugabe von DMSO und Tiron trotz andersartiger Kinetik gleich zum Reaktionsstart. Sowohl DMSO als auch Tiron bewirkten nur einen etwas verlangsamten Anstieg der ohnehin niedrigen Lichtemission, welcher in beiden Fällen bis zum Ende der Messung andauerte. In Gegenwart von DMSO wurde nach mehr als 6,5 h Reaktionszeit eine Lichtemissionsrate von 32.000 cpm gemessen, während diese in Anwesenheit von Tiron 21.000 cpm betrug.

Die in Gegenwart von Hämin erhaltenen Lumineszenzraten waren höher als bei Abwesenheit des Katalysators, blieben jedoch im Vergleich zur Kynurensäure relativ gering (Abb. 42). Der Zeitverlauf der Chemilumineszenz war insofern bemerkenswert, als die Lichtemission über einen ungewöhnlich langen Zeitraum kontinuierlich anstieg. Selbst nach 24 h Reaktionszeit war dieser Vorgang noch nicht beendet.

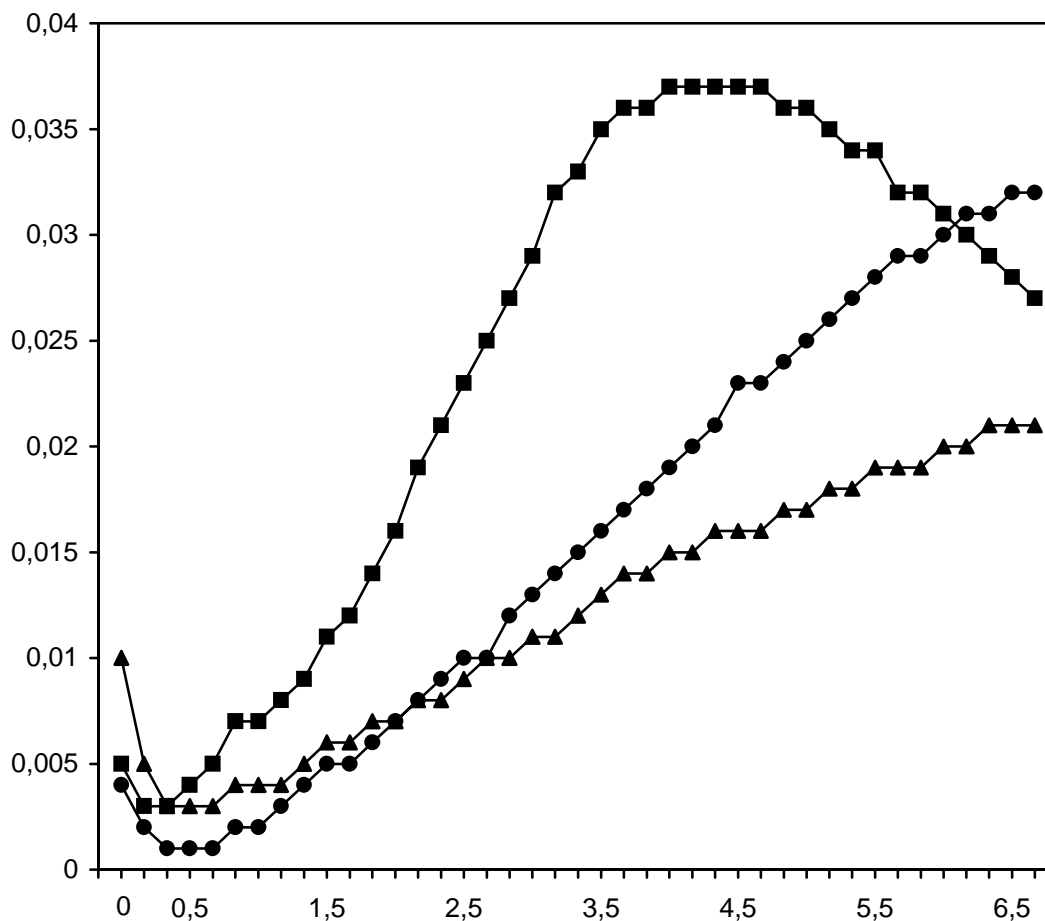


Abb. 41: Chemilumineszenz bei der Oxidation von Xanthurensäure im alkalischen H_2O_2 -System ohne Hämin als Katalysator und Effekte von DMSO bzw. Tiron.

Ordinate: Lichtemission [Mio. cpm]; Abzisse: Reaktionszeit [h]; Lumineszenz ohne konkurrierende Radikalfänger (Rechtecke), in Gegenwart von DMSO (Kreise), und in Gegenwart von Tiron (Dreiecke).

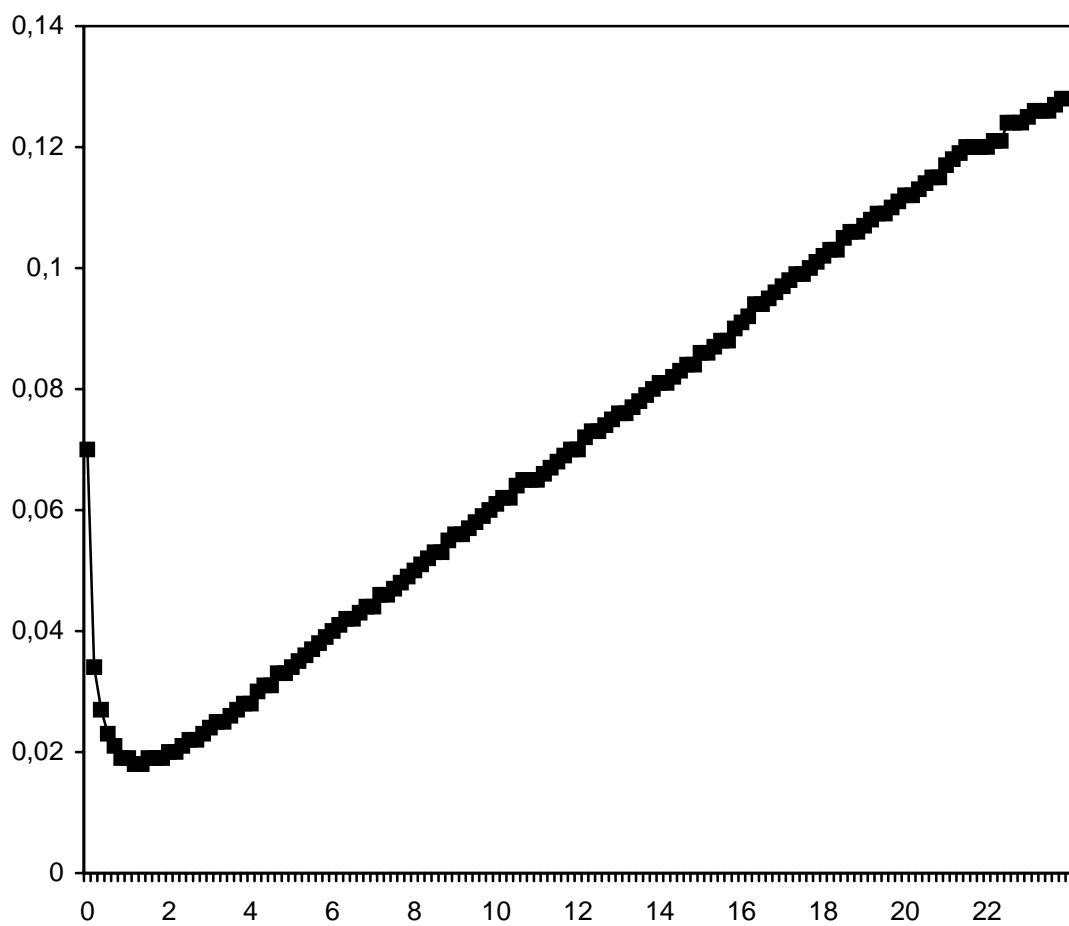


Abb. 42: Chemilumineszenz bei der Oxidation von Xanthurensäure im alkalischen H_2O_2 -System mit Hämin als Katalysator.

Details wie in Abb. 25.

3.13 Xanthurensäure und ihr Vorläufer 3-Hydroxykynurenin bei *Lingulodinium polyedrum*

Nach der Charakterisierung von Xanthurensäure als potenten Radikalfänger, stellte sich die Frage nach seiner Präsenz in dem untersuchten Modellorganismus ebenso, wie die einer etwaigen Genese aus 3-Hydroxykynurenin analog zu den für die Kynurensäure-Bildung beschriebenen Prozessen.

Nachdem Eluent und Laufzeit für die Trennung von 3-Hydroxykynurenin und Xanthurensäure sowie dieser Substanzen von anderen Metaboliten optimiert worden waren und entsprechende Kalibrierungen der elektrochemischen Detektion vorlagen, ließen sich Untersuchungen über die intra- und extrazellulären Konzentrationen der beiden Produkte durchführen.

3.13.1 3-Hydroxykynurenin und Xanthurensäure als physiologische Metaboliten

In Zellen, die normal kultiviert und mit keinem Tryptophan-Metaboliten vorinkubiert worden waren, ließen sich sowohl 3-Hydroxykynurenin als auch Xanthurensäure direkt in der HPLC mit ECD nachweisen (Abb. 43). Dies war zum einen aufgrund der guten Oxidierbarkeit beider Substanzen mit hoher Sensitivität möglich, zum anderen demonstriert dies aber auch, daß die betreffende metabolische Route innerhalb des Tryptophan-Abbaus bedeutend sein muß.

3.13.2 Metabolisierung von 3-Hydroxykynurenin im Dauerdunkel

Um die lichtabhängige Metabolisierung von 3-Hydroxykynurenin, etwa durch plastidäre Bildung von Radikalen oder H_2O_2 , auszuschließen, wurde *L. polyedrum* zunächst im DD mit exogenem 3-Hydroxykynurenin inkubiert.

Nach 2 h Inkubationszeit hatten sich die intrazellulären Konzentrationen beider Metabolite nur wenig verändert, jedoch erschien ein zusätzliches Produkt im relevanten Elutionsbereich (Abb. 44), welches eine noch kürzere Retentionszeit als 3-Hydroxykynurenin besaß und somit im Sauren noch polarer als dieses sein dürfte.

Mit fortschreitender Inkubationsdauer, 4 h (Abb. 45), 8 h (Abb. 46) und 24 h (Abb. 47), nahm die Menge des neuen Produkts weiter zu, während die Konzentration von 3-Hydroxykynurenin allenfalls moderat und auch nur vorübergehend anstieg, die der Xanthurensäure hingegen leicht absank (Zusammenfassung: Abb. 48).

Im Medium war die initiale Konzentration des 3-Hydroxykynurenins derart hoch, daß über die nächsten Stunden keine sinnvolle Darstellung ohne Überlagerung der später eluierenden Xanthurensäure möglich war. Ein starker Abfall von 3-Hydroxykynurenin wurde gleichwohl im folgenden evident, wie insbesondere der Vergleich nach 8 h (Abb. 49), 12 h (Abb. 50) und 24 h (Abb. 51) zeigt. Xanthurensäure erschien während der Inkubation im Medium und stieg von 8 h bis zu mindestens 20 h weiter an (Abb. 49-52).

3.13.3 Metabolisierung von 3-Hydroxykynurenin unter dem Einfluß von Licht

In weiteren Experimenten wurde die Möglichkeit gegeben, über plastidär generierte Oxidantien den Katabolismus von 3-Hydroxykynurenin zu verändern. Über bis zu 8 h Licht innerhalb eines LD 12:12 waren deutliche Abweichungen gegenüber dem Experiment im DD festzustellen. Nach 8 h war intrazellulär das 3-Hydroxykynurenin wenig verändert, der zusätzliche, polare Metabolit ähnlich hoch wie im DD, jedoch die Xanthurensäure deutlich erhöht (Abb. 53). Nach 24 h, d.h. nach Passieren der Scotophase und erneuter 3-stündiger Belichtung, war die Xanthurensäure auf einem ähnlich hohen Niveau wie nach 8 h im Licht, jedoch der polare Metabolit abgesunken (Abb 54). Über das Verhalten einer weiteren, noch polareren Substanz läßt sich wegen deren Nähe zum Einspritzgipfel nichts Sicheres sagen. Die quantitative Auswertung für die Xanthurensäure ist in Abb. 55 zusammengefaßt.

Unter denselben Lichtbedingungen erwies sich die extrazelluläre Xanthurensäure im Vergleich zum DD als bedeutend erhöht (Abb. 56, 57). Bereits nach 8 h war deren Konzentration im Medium relativ zu jener im DD verdoppelt, nach weiteren 8 h war sie nochmals um den Faktor 2 vermehrt, sank hernach jedoch auf Werte ab, die im Verlaufe eines Inkubationtages auch im DD erreicht wurden (Abb. 58).

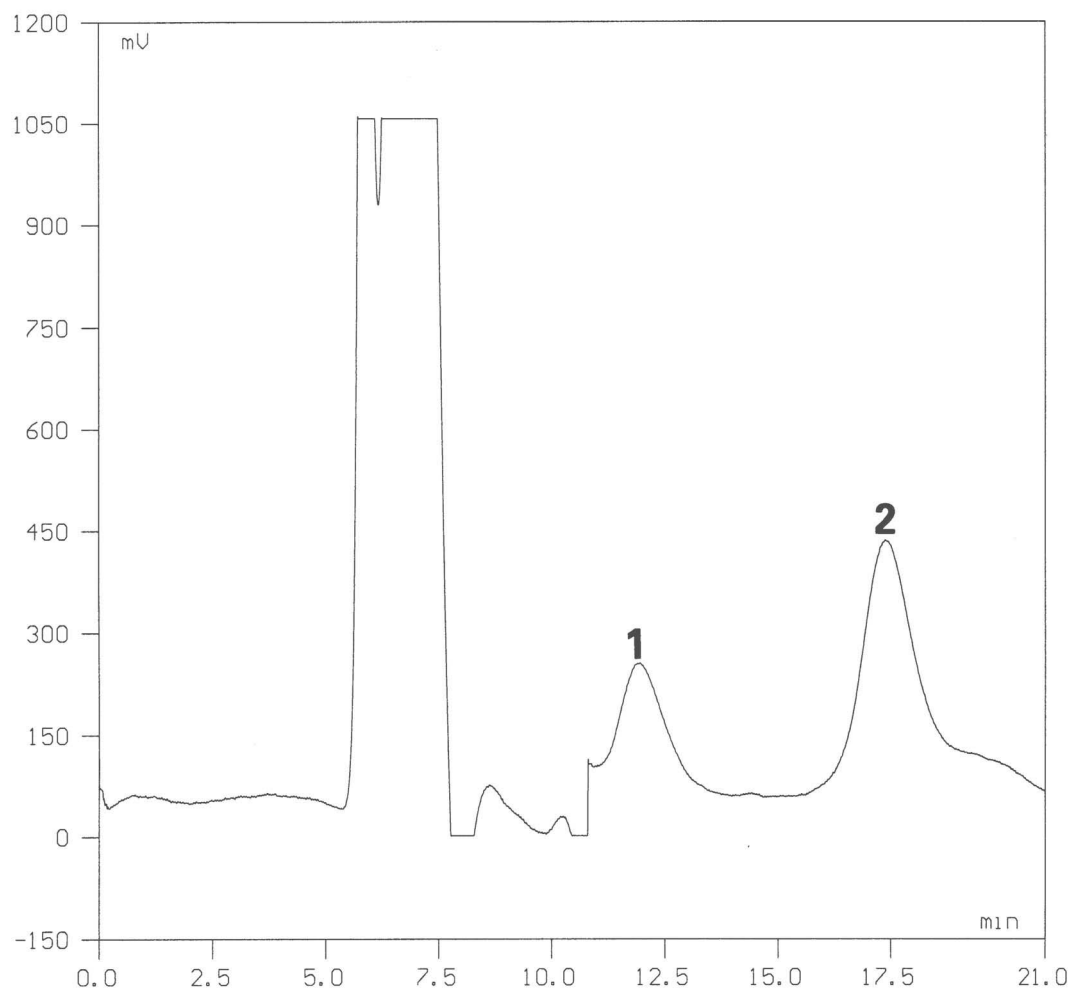


Abb. 43: 3-Hydroxykynurenin und Xanthurensäure bei *Lingulodinium polyedrum*. HPLC-ECD-Chromatogramm. 1) 3-Hydroxykynurenin; 2) Xanthurensäure. 100-fache Verdünnung des Extraktes. Abzisse: Retentionszeit; Ordinate: ECD-Signal.

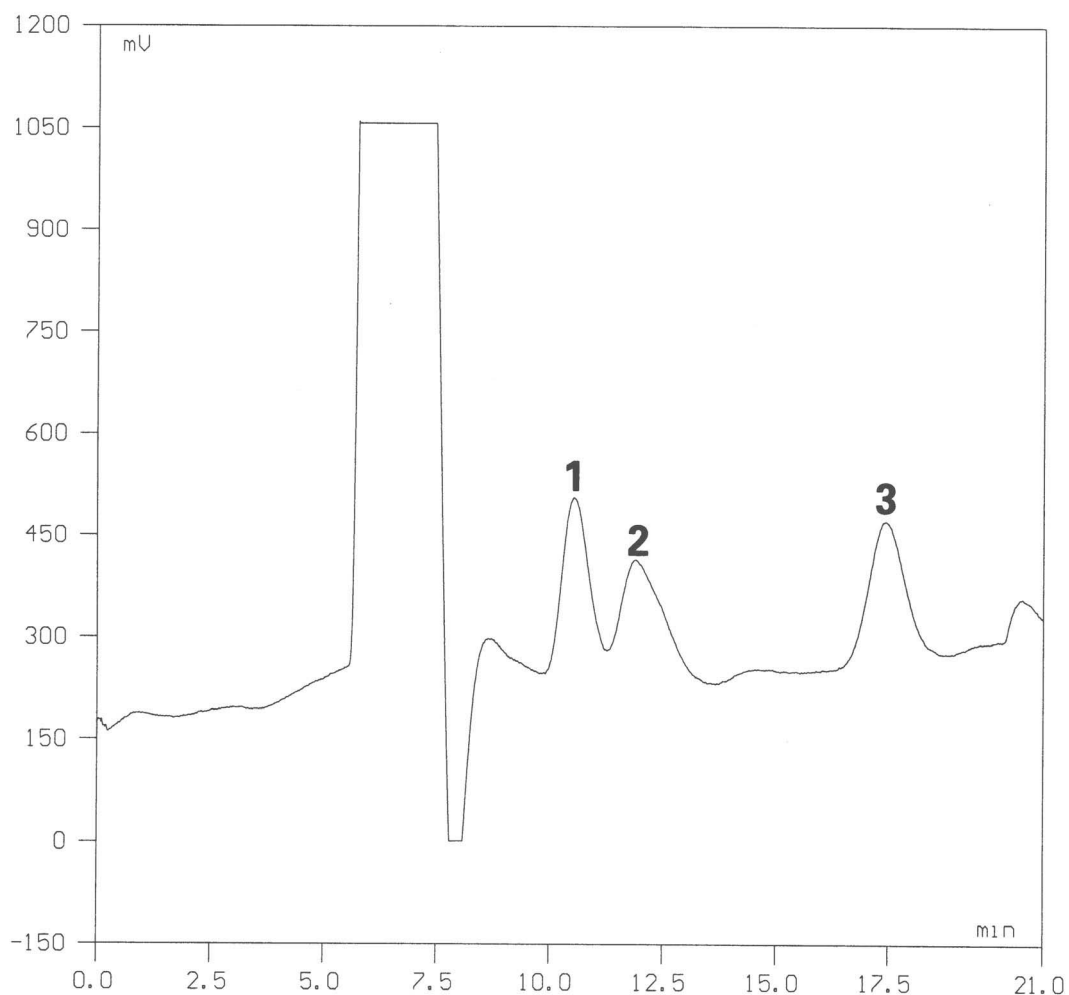


Abb. 44: Intrazelluläre Konzentrationen von 3-Hydroxykynurenin und Xanthurensäure nach 2-stündiger Inkubation mit 10^{-5} M 3-Hydroxykynurenin im DD. HPLC-ECD-Chromatogramm. 1) nicht charakterisiertes Produkt; 2) 3-Hydroxykynurenin; 3) Xanthurensäure. Weitere Details wie in Abb. 43.

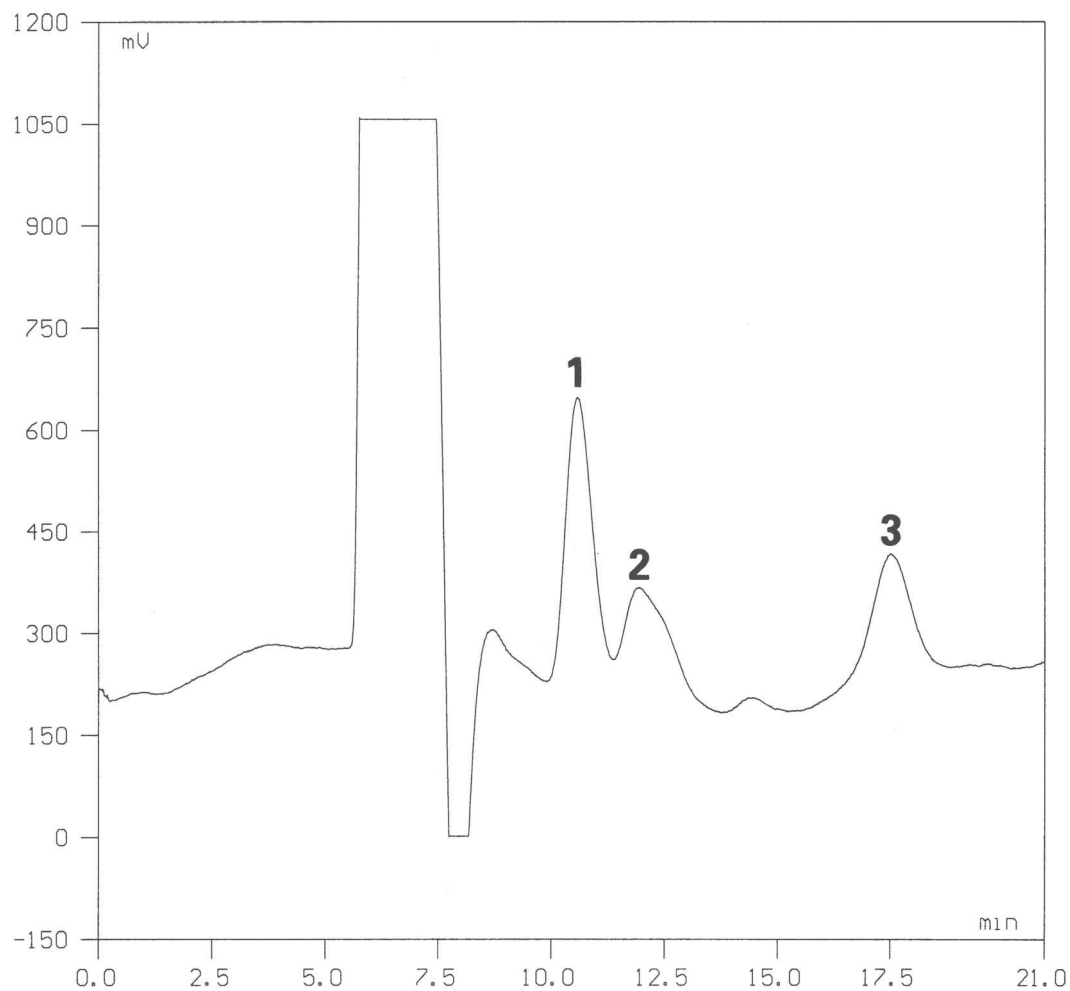


Abb. 45: Intrazelluläre Konzentrationen von 3-Hydroxykynurenin und Xanthurensäure nach 4-stündiger Inkubation mit 10^{-5} M 3-Hydroxykynurenin im DD. HPLC-ECD-Chromatogramm. 1) nicht charakterisiertes Produkt; 2) 3-Hydroxykynurenin; 3) Xanthurensäure. Weitere Details wie in Abb. 43.

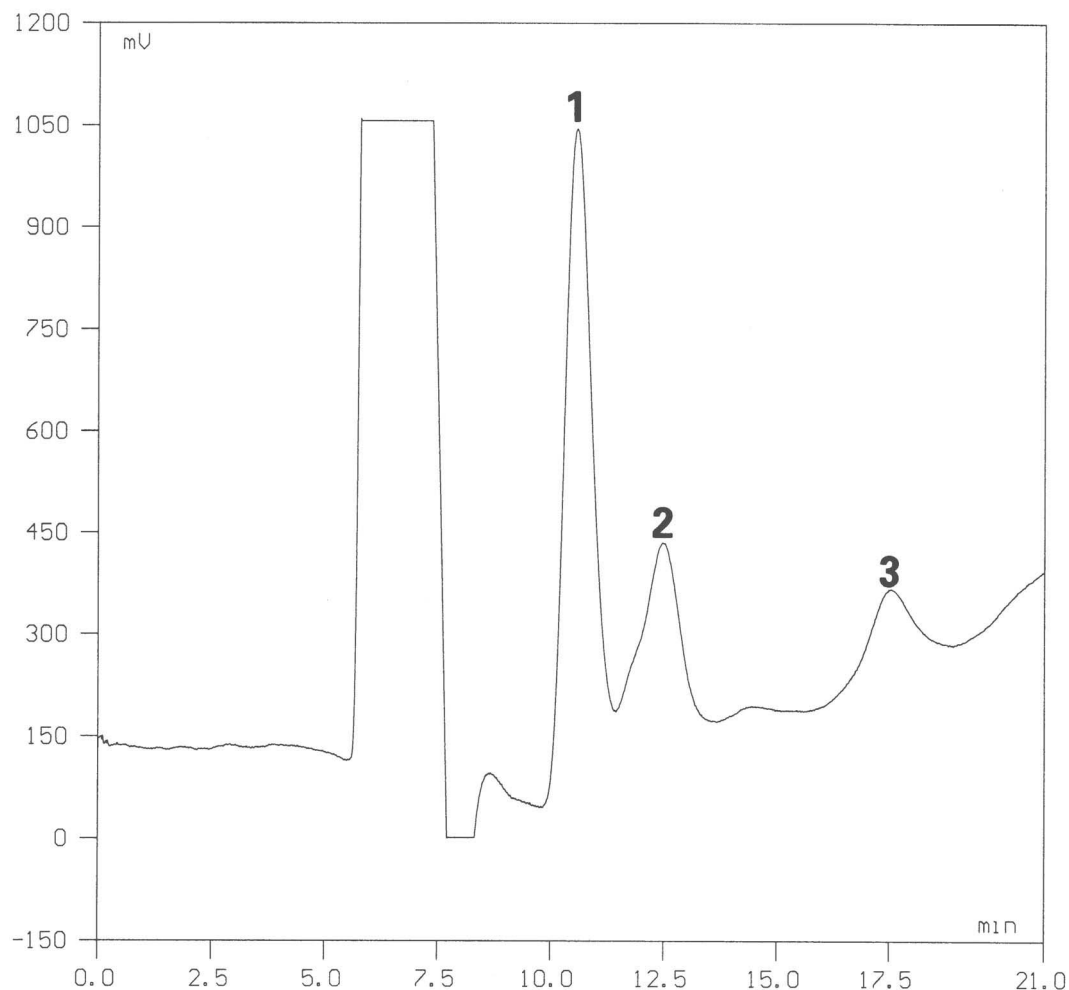


Abb. 46: Intrazelluläre Konzentrationen von 3-Hydroxykynurenin und Xanthurensäure nach 8-stündiger Inkubation mit 10^{-5} M 3-Hydroxykynurenin im DD. HPLC-ECD-Chromatogramm. 1) nicht charakterisiertes Produkt; 2) 3-Hydroxykynurenin; 3) Xanthurensäure. Weitere Details wie in Abb. 43.

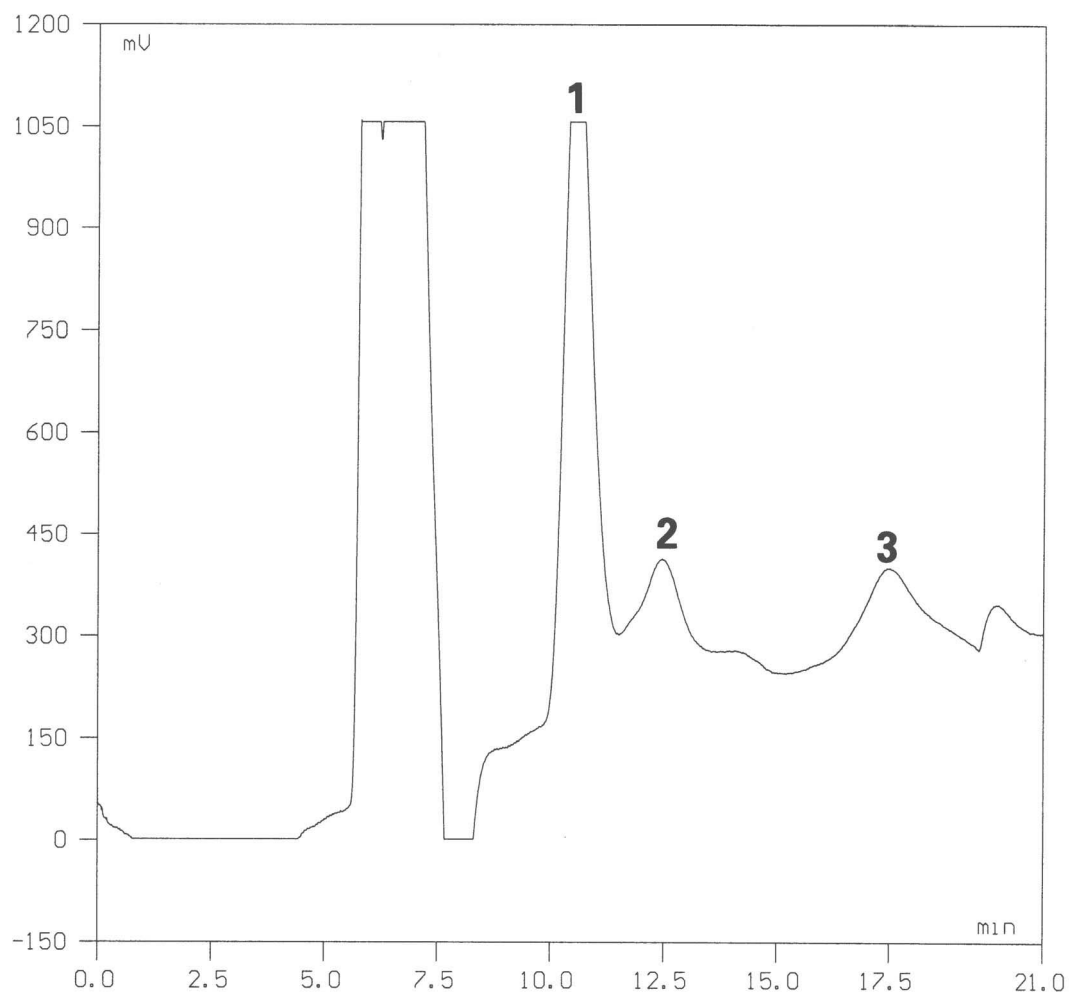


Abb. 47: Intrazelluläre Konzentrationen von 3-Hydroxykynurenin und Xanthurensäure nach 24-stündiger Inkubation mit 10^{-5} M 3-Hydroxykynurenin im DD. HPLC-ECD-Chromatogramm. 1) nicht charakterisiertes Produkt; 2) 3-Hydroxykynurenin; 3) Xanthurensäure. Weitere Details wie in Abb. 43.

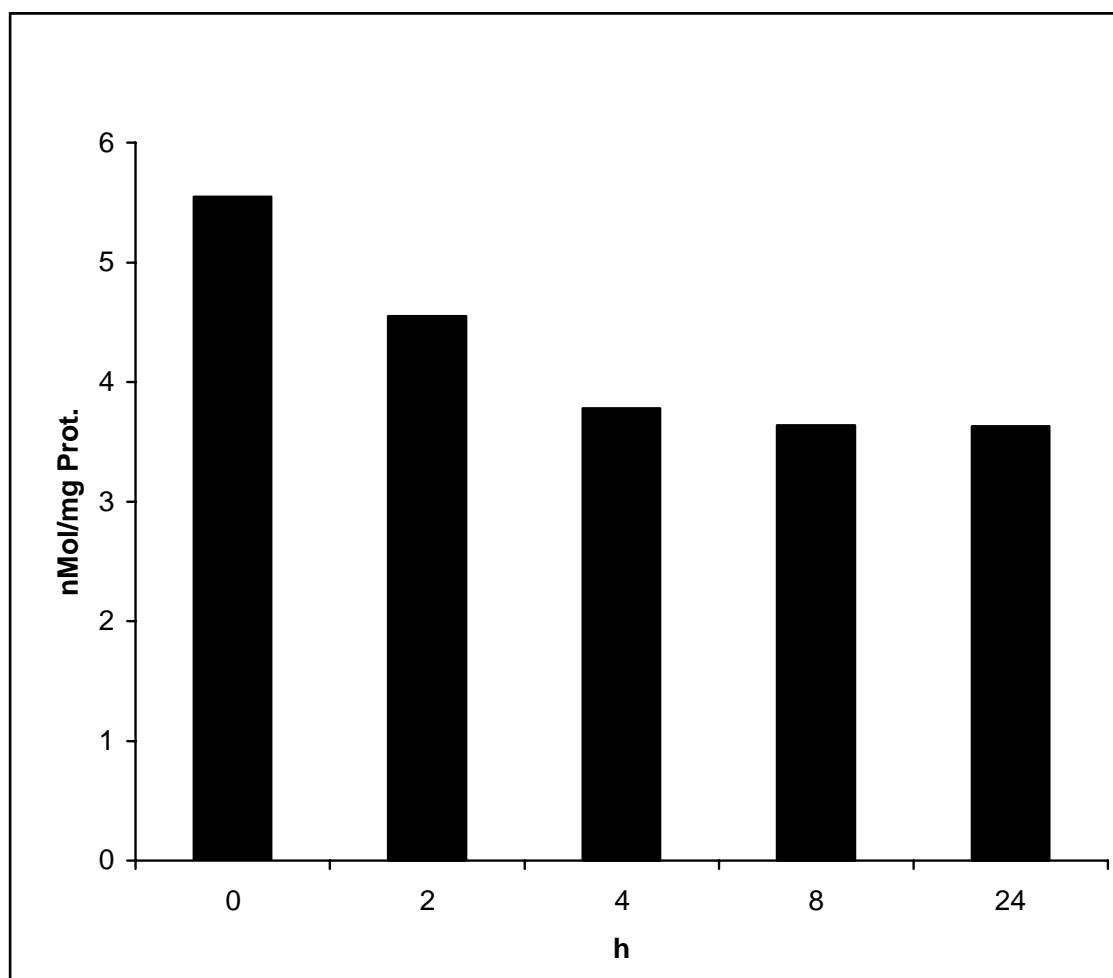


Abb. 48: Intrazelluläre Konzentrationen von Xanthurensäure in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer mit 10^{-5} M 3-Hydroxykynurenin im DD.

Abzisse: Inkubationszeit; Ordinate: Konzentration der Xanthurensäure.

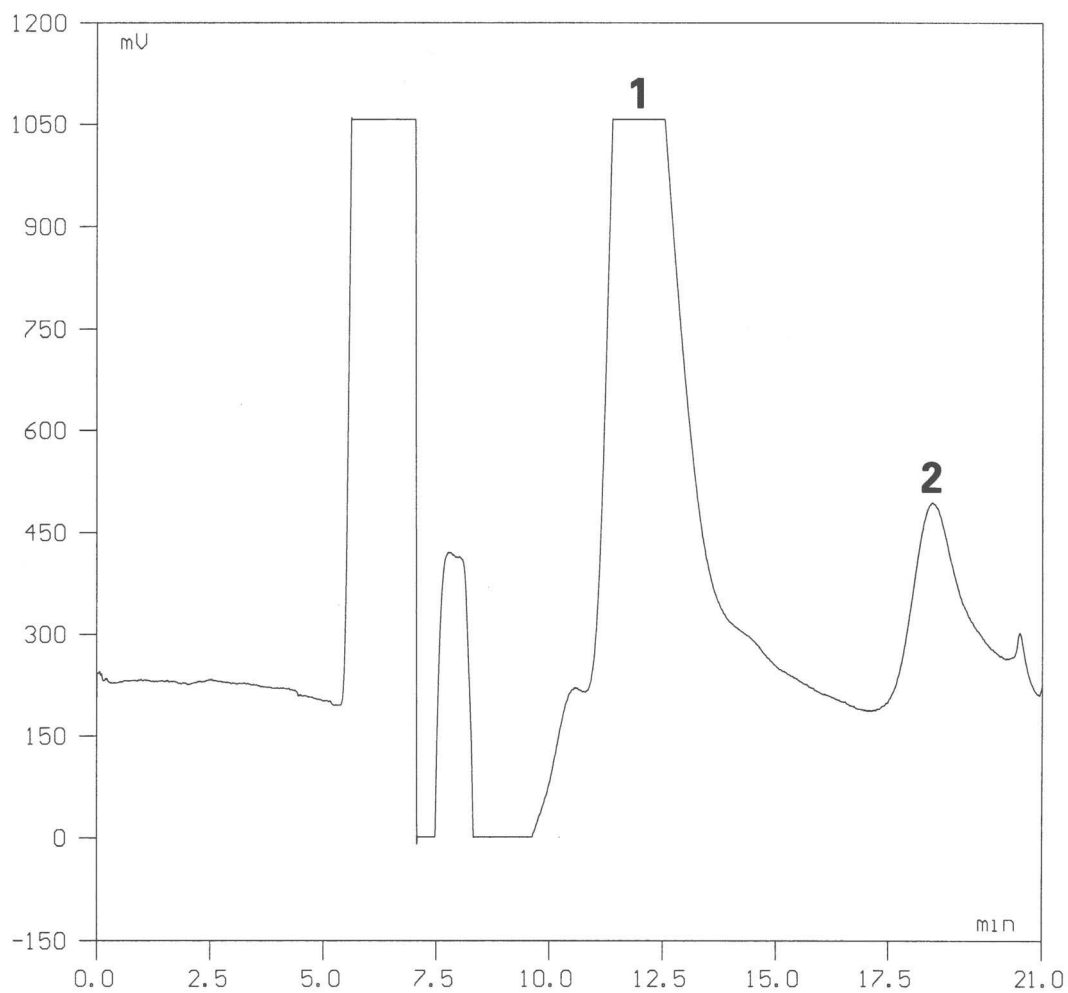


Abb. 49: Extrazelluläre Konzentrationen von 3-Hydroxykynurenin und Xanthurensäure nach 8-stündiger Inkubation mit 10^{-5} M 3-Hydroxykynurenin im DD. HPLC-ECD-Chromatogramm. 1) 3-Hydroxykynurenin; 2) Xanthurensäure. 10-fache Verdünnung des Mediums. Weitere Details wie in Abb. 43.

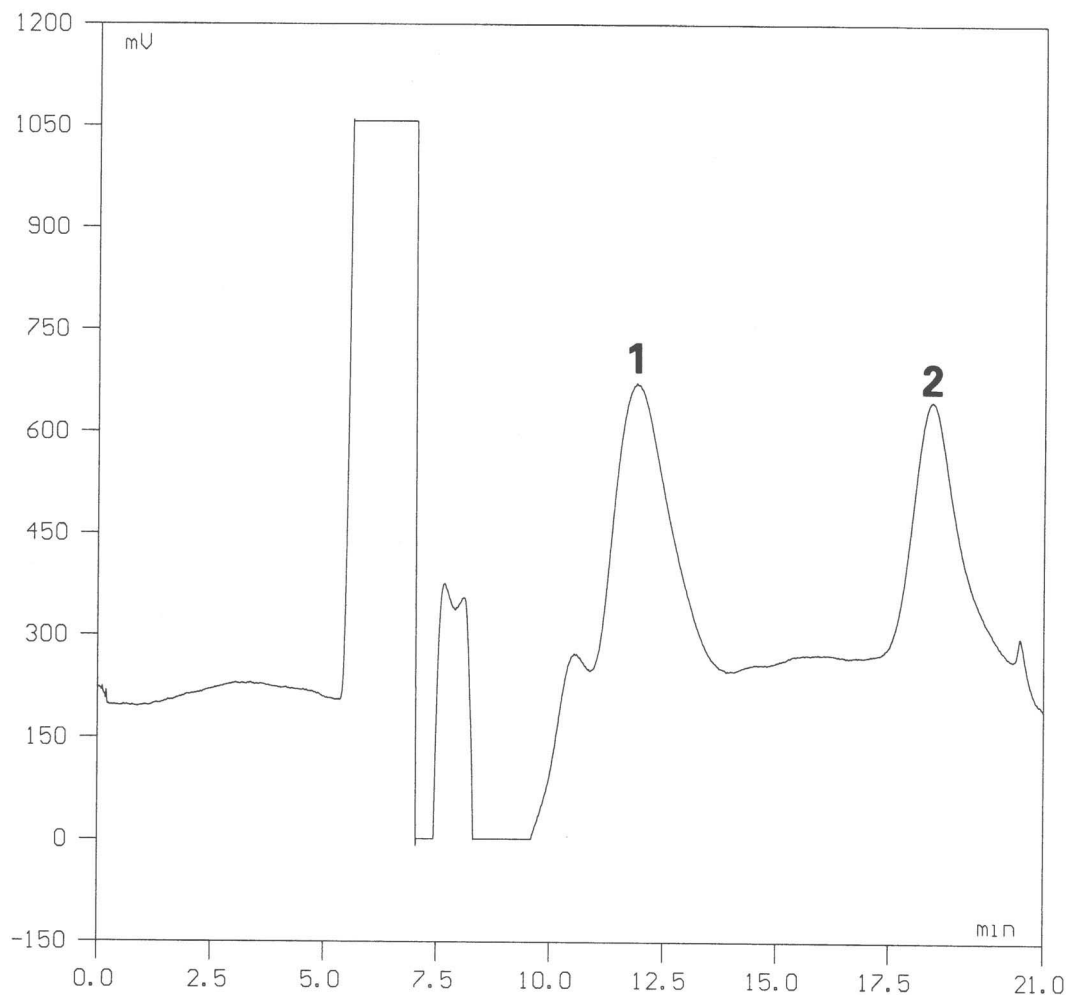


Abb. 50: Extrazelluläre Konzentrationen von 3-Hydroxykynurenin und Xanthurensäure nach 12-stündiger Inkubation mit 10^{-5} M 3-Hydroxykynurenin im DD. HPLC-ECD-Chromatogramm. 1) 3-Hydroxykynurenin; 2) Xanthurensäure. Weitere Details wie in Abb. 49.

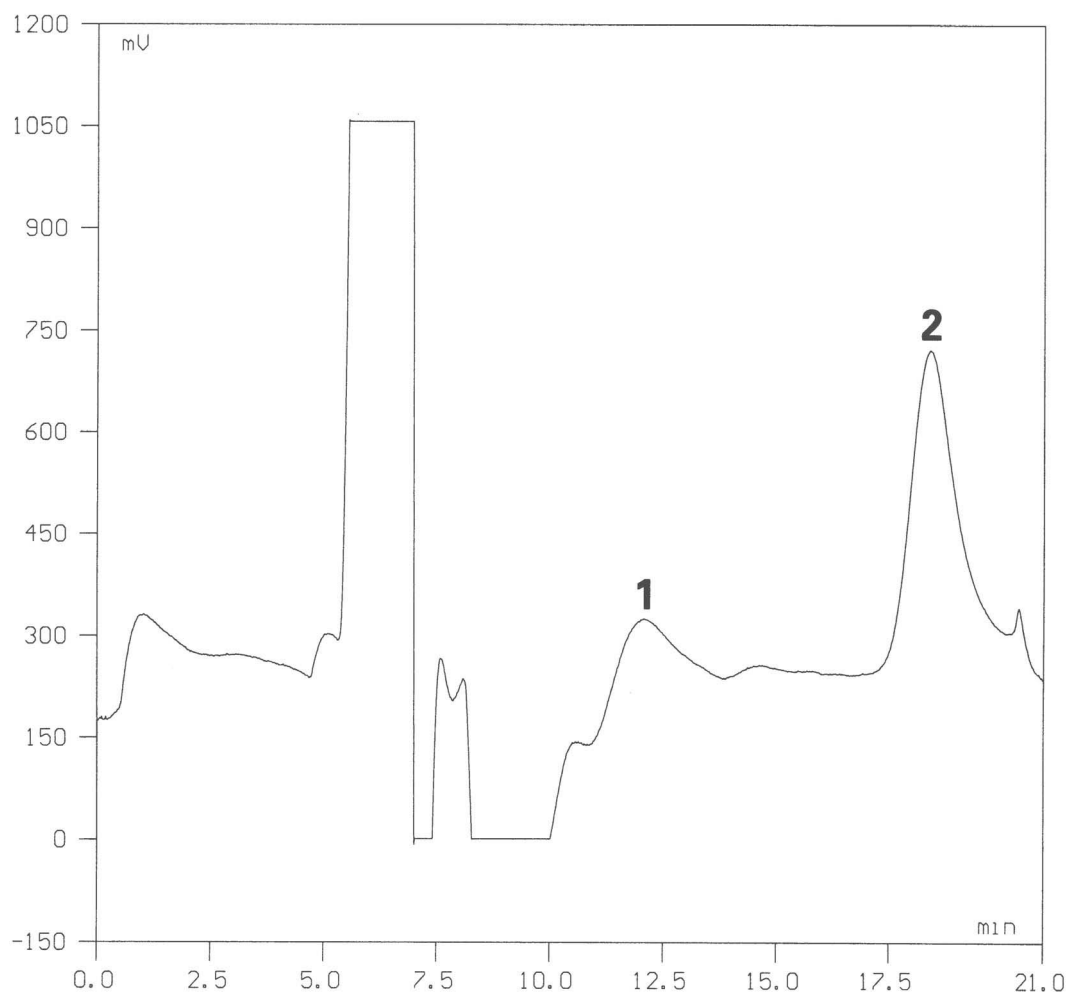


Abb. 51: Extrazelluläre Konzentrationen von 3-Hydroxykynurenin und Xanthurensäure nach 24-stündiger Inkubation mit 10^{-5} M 3-Hydroxykynurenin im DD. HPLC-ECD-Chromatogramm. 1) 3-Hydroxykynurenin; 2) Xanthurensäure. Weitere Details wie in Abb. 49.

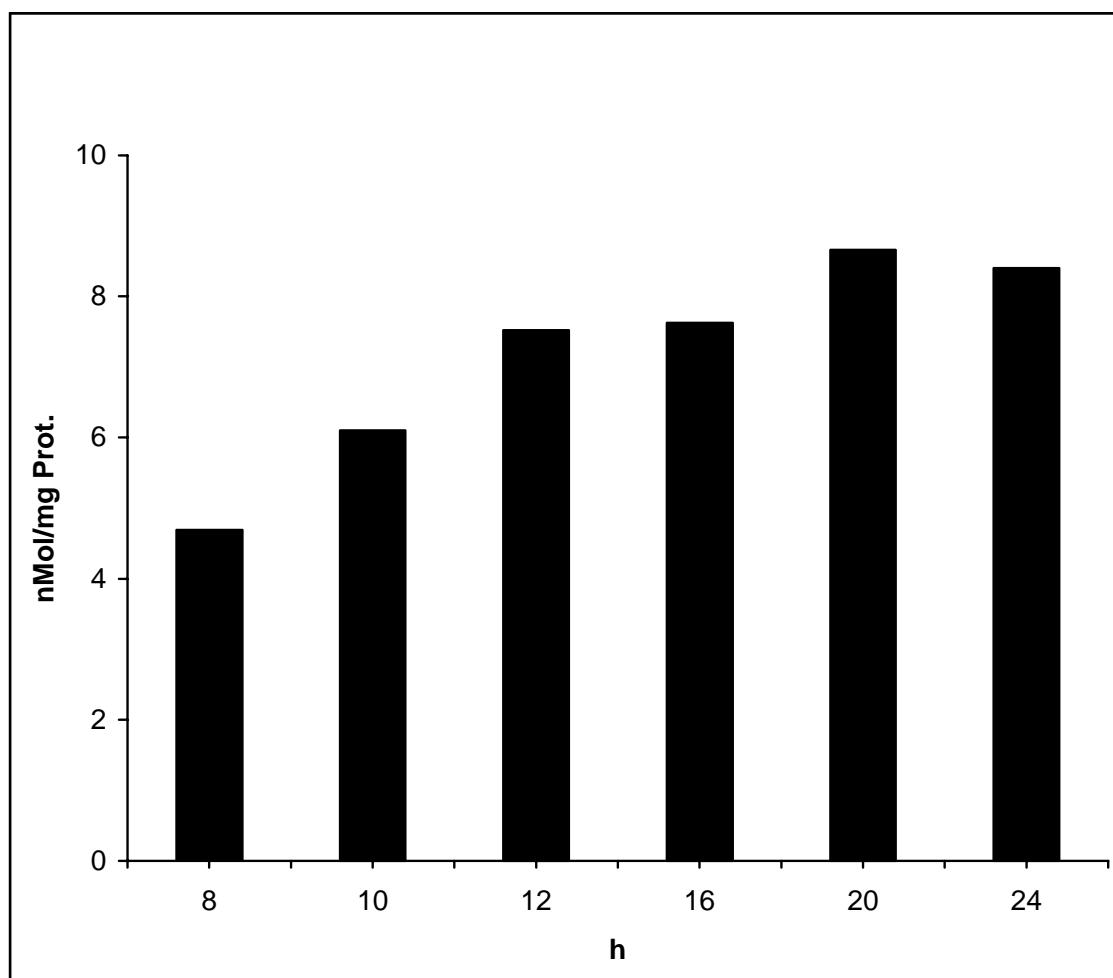


Abb. 52: Extrazelluläre Konzentrationen von Xanthurensäure in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer mit 10^{-5} M 3-Hydroxykynurenin im DD.

Details wie in Abb. 48.

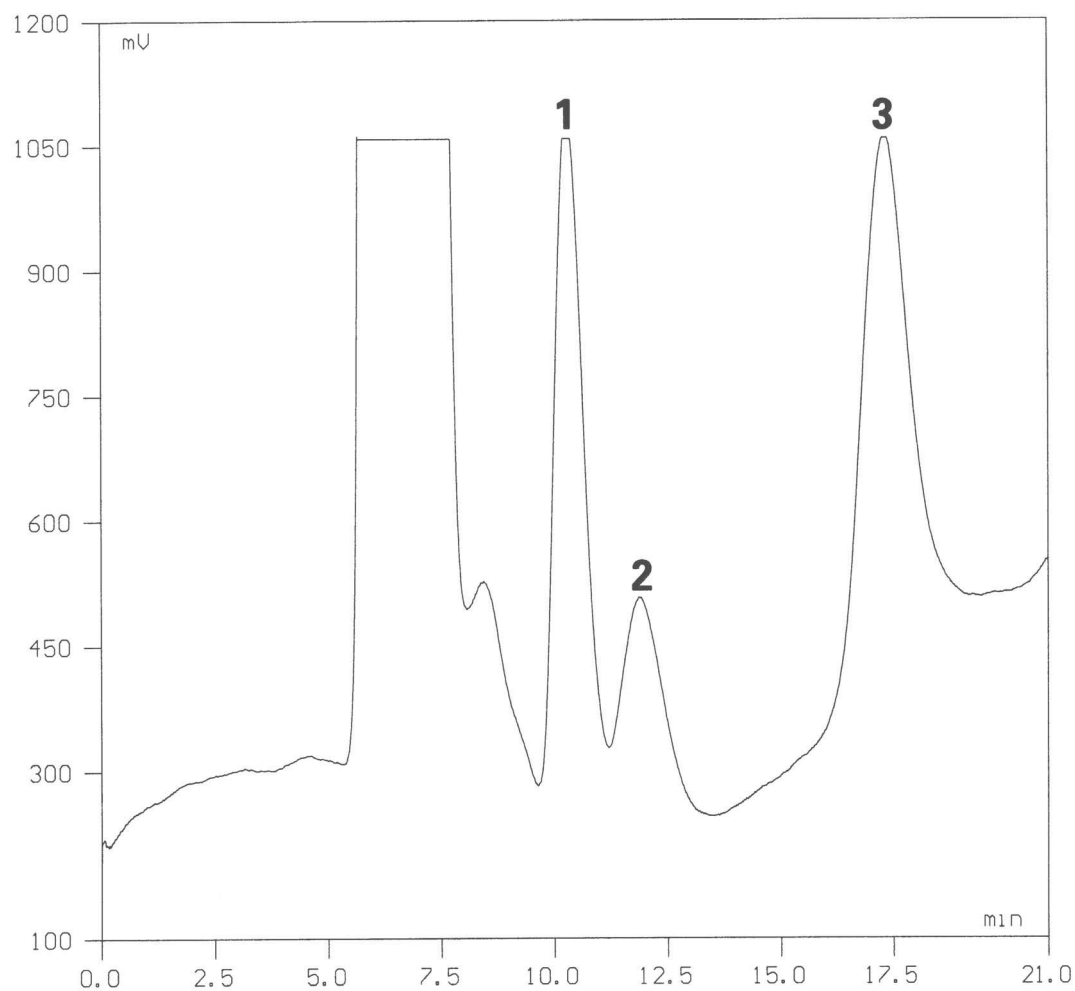


Abb. 53: Intrazelluläre Konzentrationen von 3-Hydroxykynurenin und Xanthurensäure nach 8-stündiger Inkubation mit 10^{-5} M 3-Hydroxykynurenin im LD. HPLC-ECD-Chromatogramm. 1) nicht charakterisiertes Produkt; 2) 3-Hydroxykynurenin; 3) Xanthurensäure. Weitere Details wie in Abb. 43.

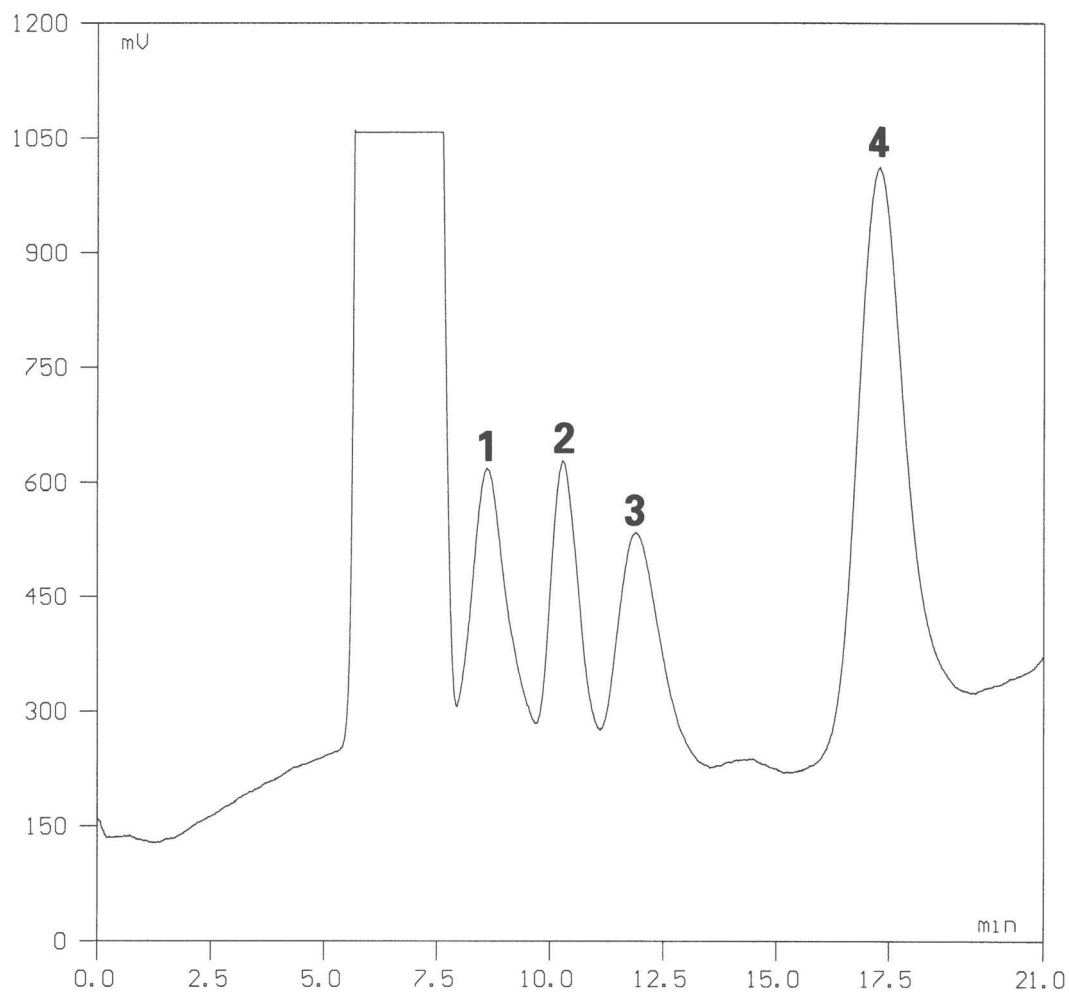


Abb. 54: Intrazelluläre Konzentrationen von 3-Hydroxykynurenin und Xanthurensäure nach 24-stündiger Inkubation mit 10^{-5} M 3-Hydroxykynurenin im LD. HPLC-ECD-Chromatogramm. 1 und 2) nicht charakterisierte Produkte; 3) 3-Hydroxykynurenin; 4) Xanthurensäure. Weitere Details wie in Abb. 43.

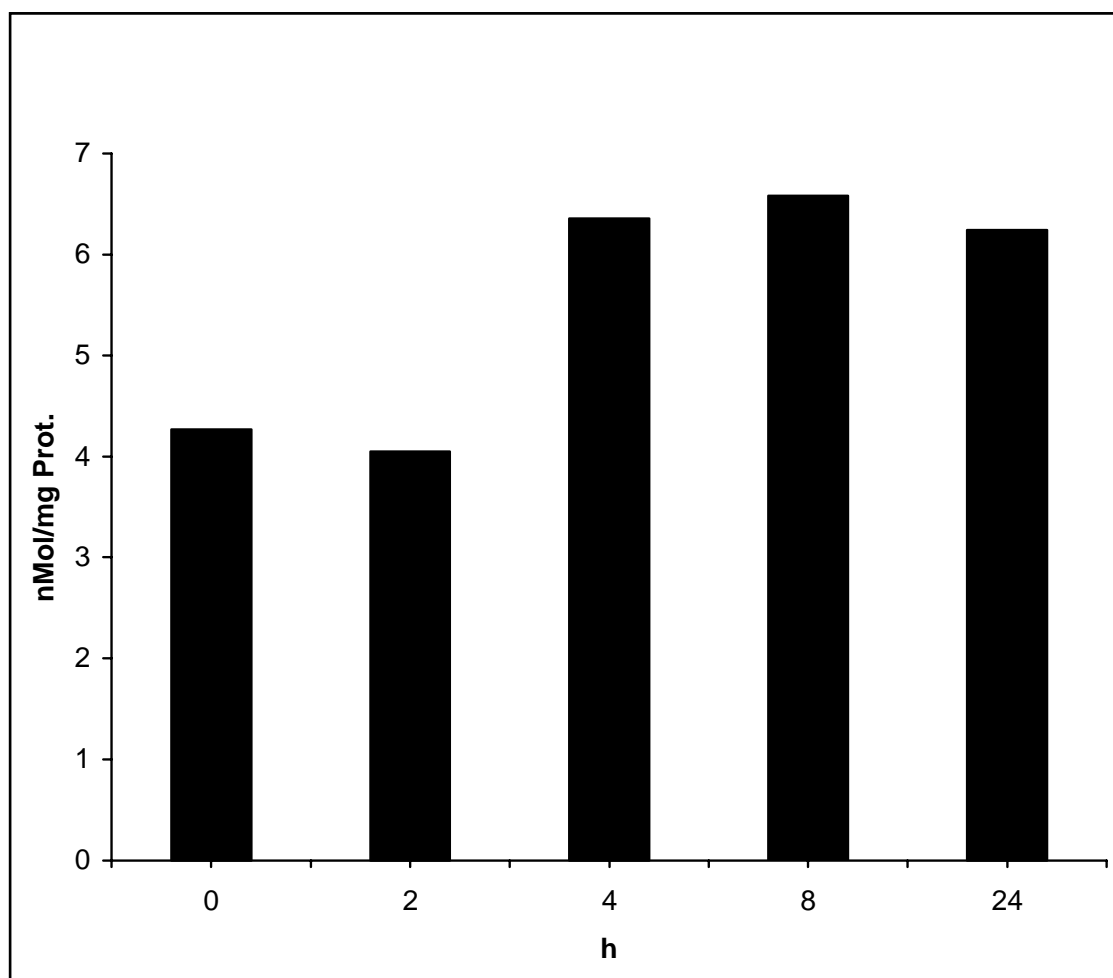


Abb. 55: Intrazelluläre Konzentrationen von Xanthurensäure in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer mit 10^{-5} M 3-Hydroxykynurenin im LD.

Details wie in Abb. 48.

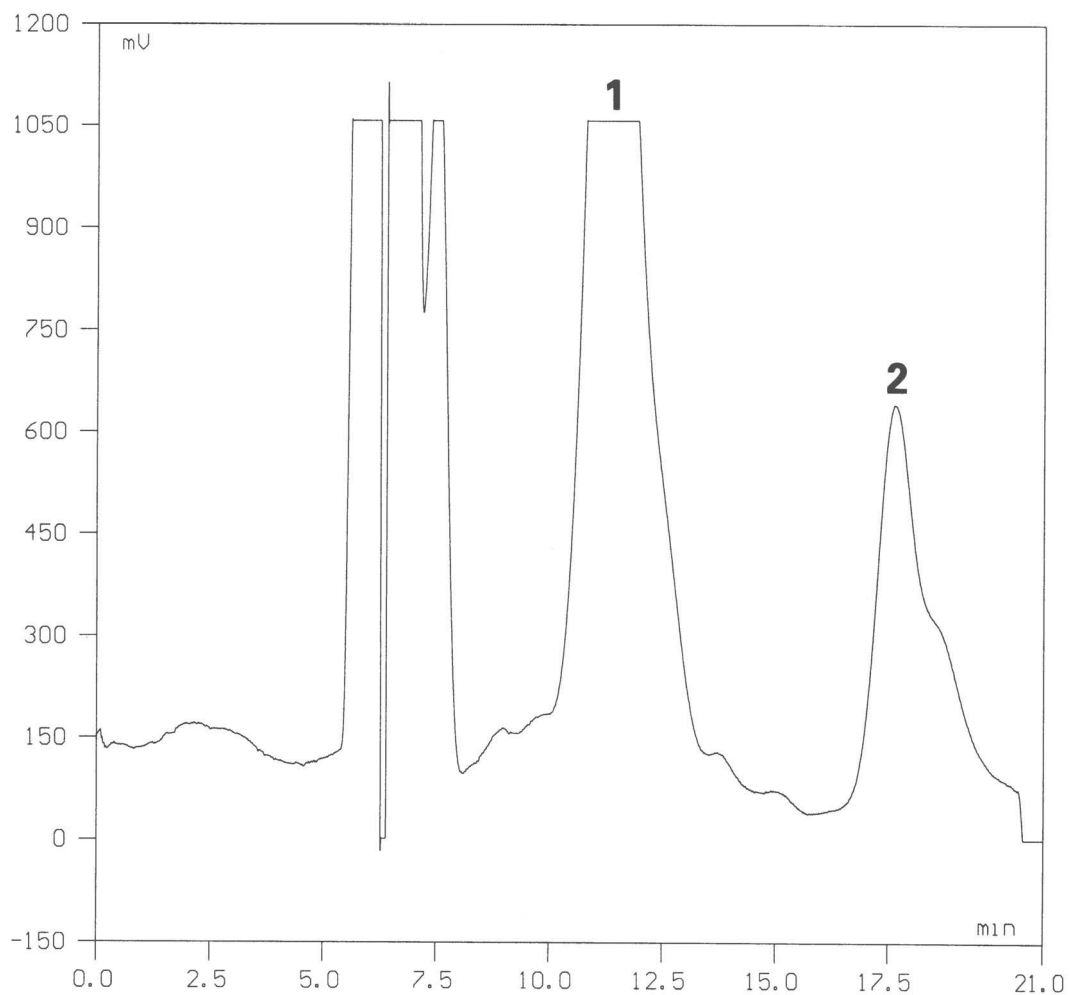


Abb. 56: Extrazelluläre Konzentrationen von 3-Hydroxykynurenin und Xanthurensäure nach 8-stündiger Inkubation mit 10^{-5} M 3-Hydroxykynurenin im LD. HPLC-ECD-Chromatogramm. 1) 3-Hydroxykynurenin; 2) Xanthurensäure. 5-fache Verdünnung des Mediums. Weitere Details wie in Abb. 43.

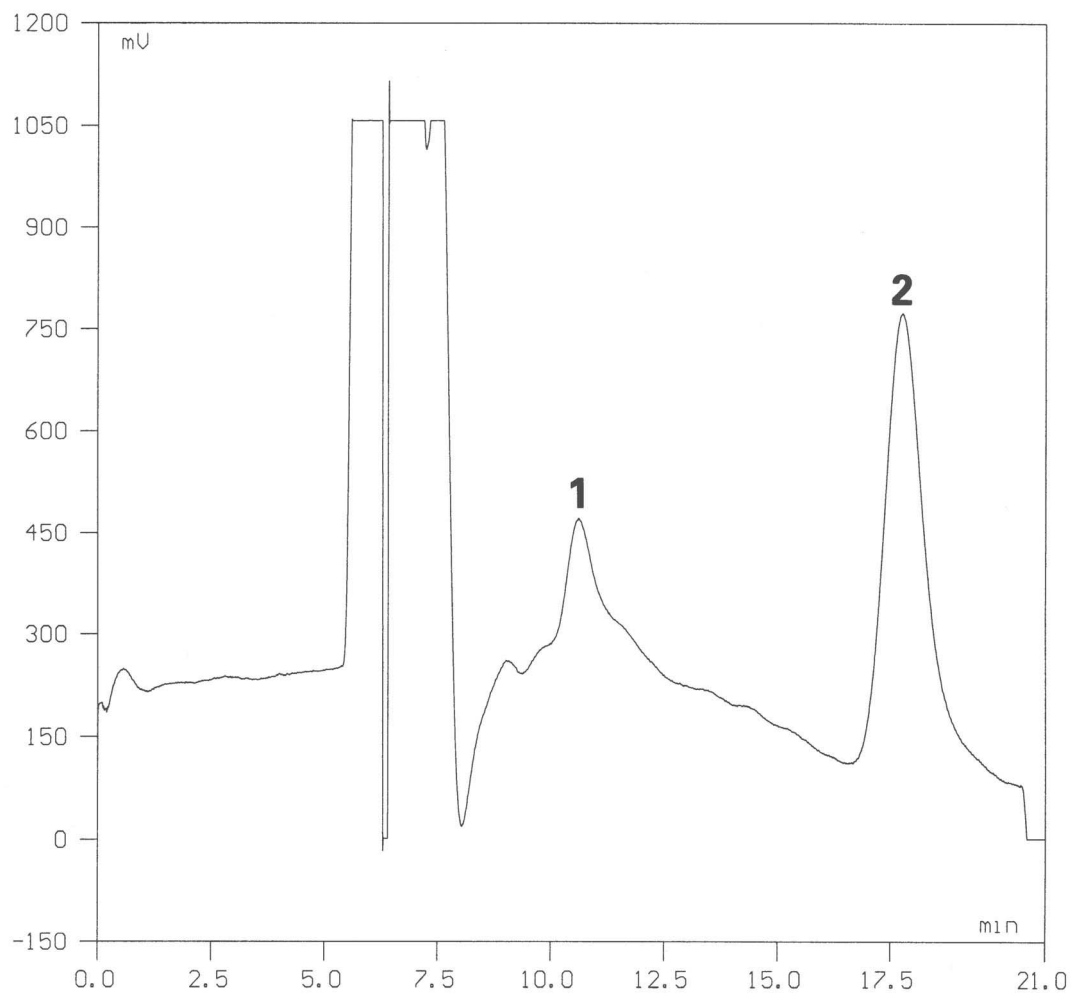


Abb. 57: Extrazelluläre Konzentrationen von 3-Hydroxykynurenin und Xanthurensäure nach 16-stündiger Inkubation mit 10^{-5} M 3-Hydroxykynurenin im LD. HPLC-ECD-Chromatogramm. 1) 3-Hydroxykynurenin; 2) Xanthurensäure. Weitere Details wie in Abb. 56.

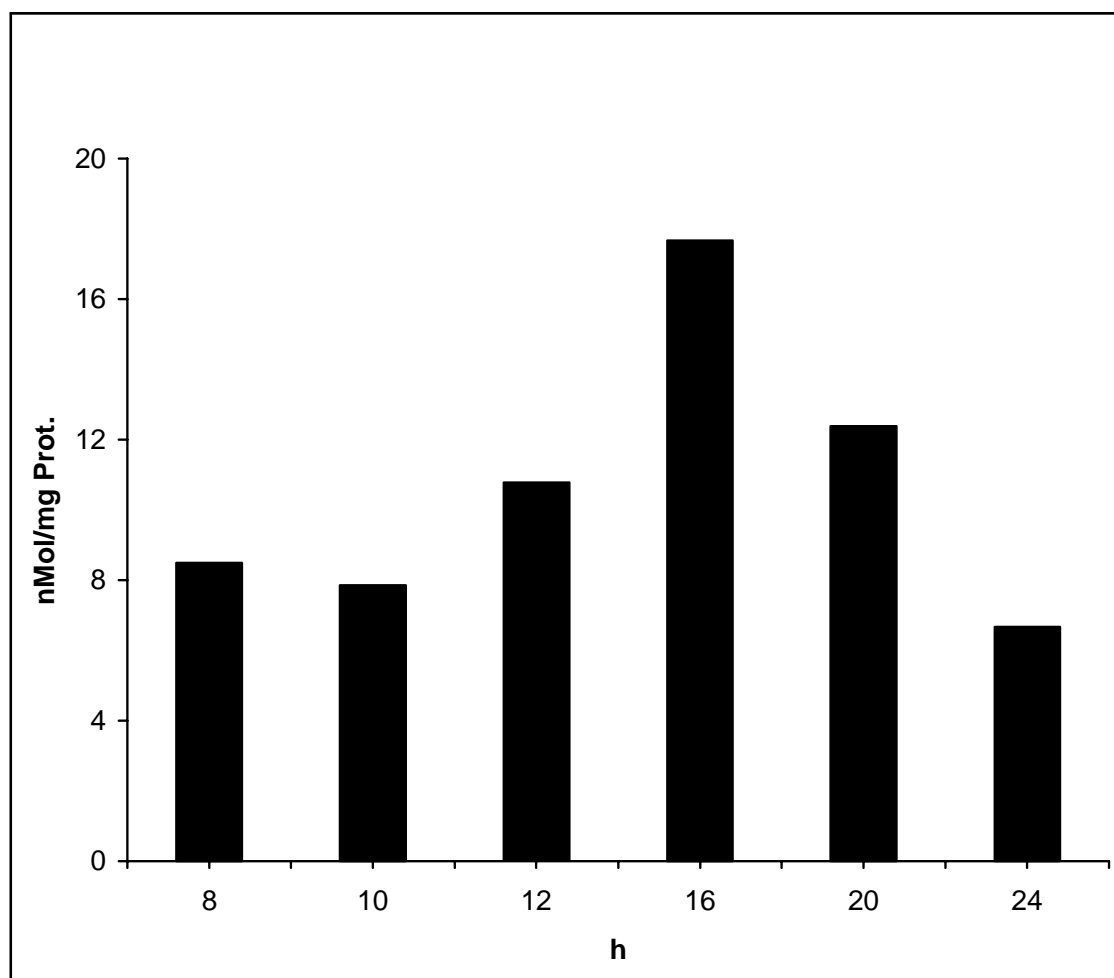


Abb. 58: Extrazelluläre Konzentrationen von Xanthurensäure in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer mit 10^{-5} M 3-Hydroxykynurenin im LD.

Weitere Details wie in Abb. 48.

3.14. Effekte verschiedener 3-Hydroxykynurenin-Konzentrationen auf die Biolumineszenz von *Lingulodinium polyedrum*

3-Hydroxykynurenin wird, zumindest über Transaminierung, zur Xanthurensäure metabolisiert. Da sich Xanthurensäure in den zuvor dargestellten Experimenten als potenter Radikalfänger erwiesen hat, könnte 3-Hydroxykynurenin zumindest nach Umwandlung in diese Substanz auch indirekt antioxidativ wirken. Andererseits könnte es durch den Umsatz zu prooxidativen Folgeprodukten auch oxidativen Stress verursachen. Beispielsweise wird bei der Autoxidation von 3-Hydroxykynurenin zum Chinonimin H_2O_2 generiert, eine Quelle weiterer reaktiver Sauerstoffspezies. Des Weiteren ist das gebildete Chinonimin selbst sehr reaktiv und zum anderen kann es zu einem Dimer kondensieren, eine weitere potentielle Ursache von Toxizität. Aus 3-Hydroxykynurenin entsteht durch Kynureninase unter Abspaltung der Seitenkette 3-Hydroxyanthranilsäure. Dieser Metabolit vermag analog zum 3-Hydroxykynurenin zu autoxidieren und ganz entsprechend prooxidativ zu wirken. Chinolinsäure entsteht durch die 3-Hydroxyanthranilat-3,4-dioxygenase aus 3-Hydroxyanthranilsäure. Chinolinsäure vermag im Komplex mit Eisen über eine Fenton-Typ-Reaktion Hydroxylradikale zu generieren. Die Bilanz dieser verschiedenen metabolischen Wege ist unbekannt: Die Verstoffwechslung von 3-Hydroxykynurenin kann einerseits zur Bildung dreier prooxidativ wirkender Substanzen führen, andererseits aber auch zur Entstehung eines potenten Radikalfängers.

Hinsichtlich dieser Überlegungen wurde die Auswirkung von 3-Hydroxykynurenin auf die Lichtemission des biolumineszierenden Dinoflagellaten *Lingulodinium polyedrum* untersucht. Bei *Lingulodinium* unterliegt die Lichtemission einer endogenen Tagesrhythmik. Hierbei lassen sich zwei circadiane Rhythmen unterscheiden: einer des spontanen, diskontinuierlichen Blitzens mit höchster Rate in der ersten Hälfte oder gegen Mitte der Dunkelzeit und einer des spontanen, kontinuierlichen Glimmens mit einem Maximum gegen Ende der Scotophase (Krasnow *et al.*, 1981). Schwacher und starker oxidativer Stress führen zu unterschiedlichen Veränderungen des Biolumineszenzmusters: Während schwacher oxidativer Stress inhibitorisch wirkt, löst subletaler oder letaler Stress eine starke Lichtemission aus (Antolín & Hardeland, 1997; Antolín *et al.*, 1997; Burkhardt, 1998; Hardeland *et al.*, 1999b).

In der Biolumineszenzkurve einer Kontrolle sind die erwähnten Maxima des diskontinuierlichen Blitzens in der ersten Hälfte der Dunkelzeit sowie des typischen Glimmens am Ende der Scotophase deutlich (Abb. 59). Eine Konzentration von 10^{-4} M 3-Hydroxykynurenin, welche im Vergleich zu der in den Experimenten für die Bestimmung der Xanthurensäure mit ECD jedoch um das 10-fache erhöht war, führte nur zu einer geringfügigen Abnahme der Biolumineszenz als Ausdruck für schwachen oxidativen Stress (Abb. 60). Durch die Zugabe von 2×10^{-4} M 3-Hydroxykynurenin wurde das Glimm-Maximum stark reduziert, blieb jedoch noch erkennbar (Abb. 61). Eine erneute Stimulation der Lichtemission am Ende der Meßreihe, welche vom circadianen Glimm-Maximum leicht unterschieden werden kann, deutete auf starken oxidativen Stress nach langer Expositionszeit hin. Eine weitere Erhöhung der Dosis auf 5×10^{-4} M, unterdrückte das Glimm-Maximum vollständig, führte nach ca. 16 h jedoch zu einem starken Anstieg des emittierten Lichts, wie er typisch für einen sog. Sterbegipfel ist (Abb. 62). Bei dieser Konzentration und Expositionszeit wird der oxidative Stress offensichtlich letal.

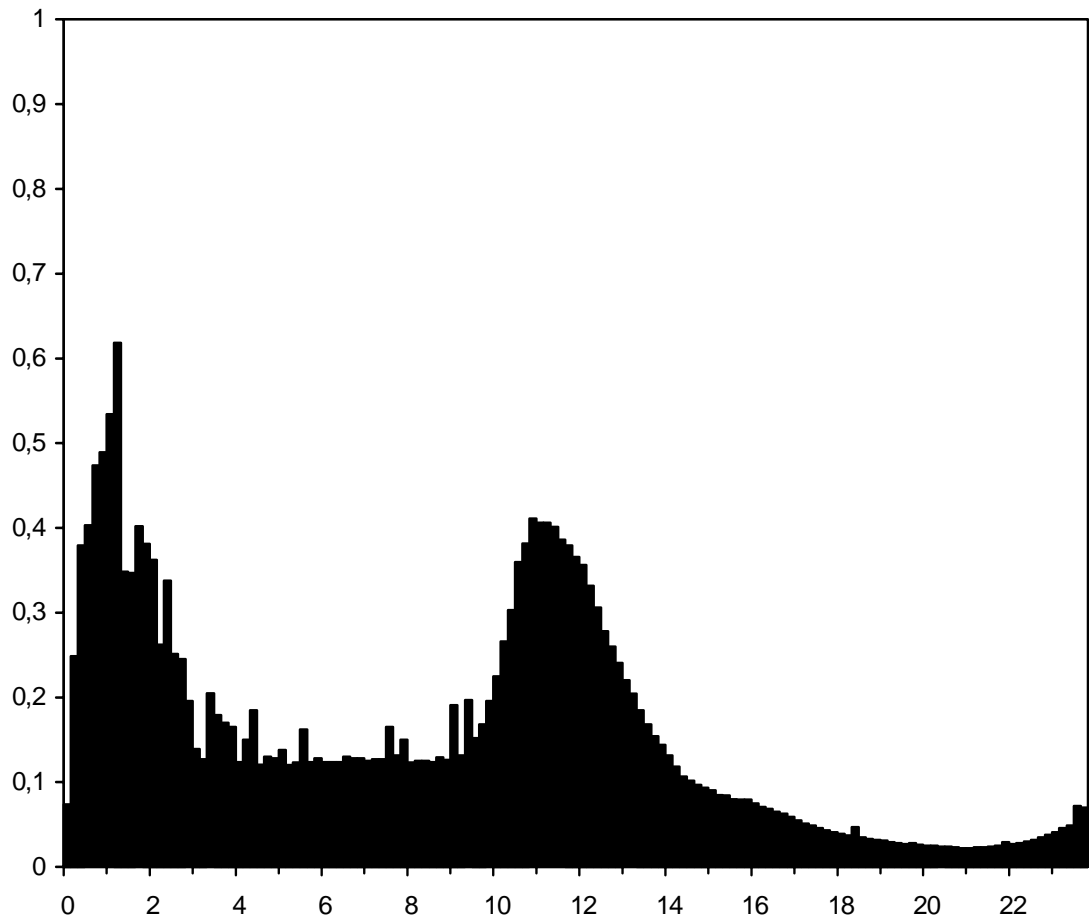


Abb. 59: Zeitliches Muster der spontanen Biolumineszenz von *Lingulodinium polyedrum* im Dauerdunkel bei einer Kontrolle, die sowohl Blitz- als auch Glimm-Maximum erkennen läßt.

Ordinate: Biolumineszenz [Mio. cpm]; Abzisse: h in DD.

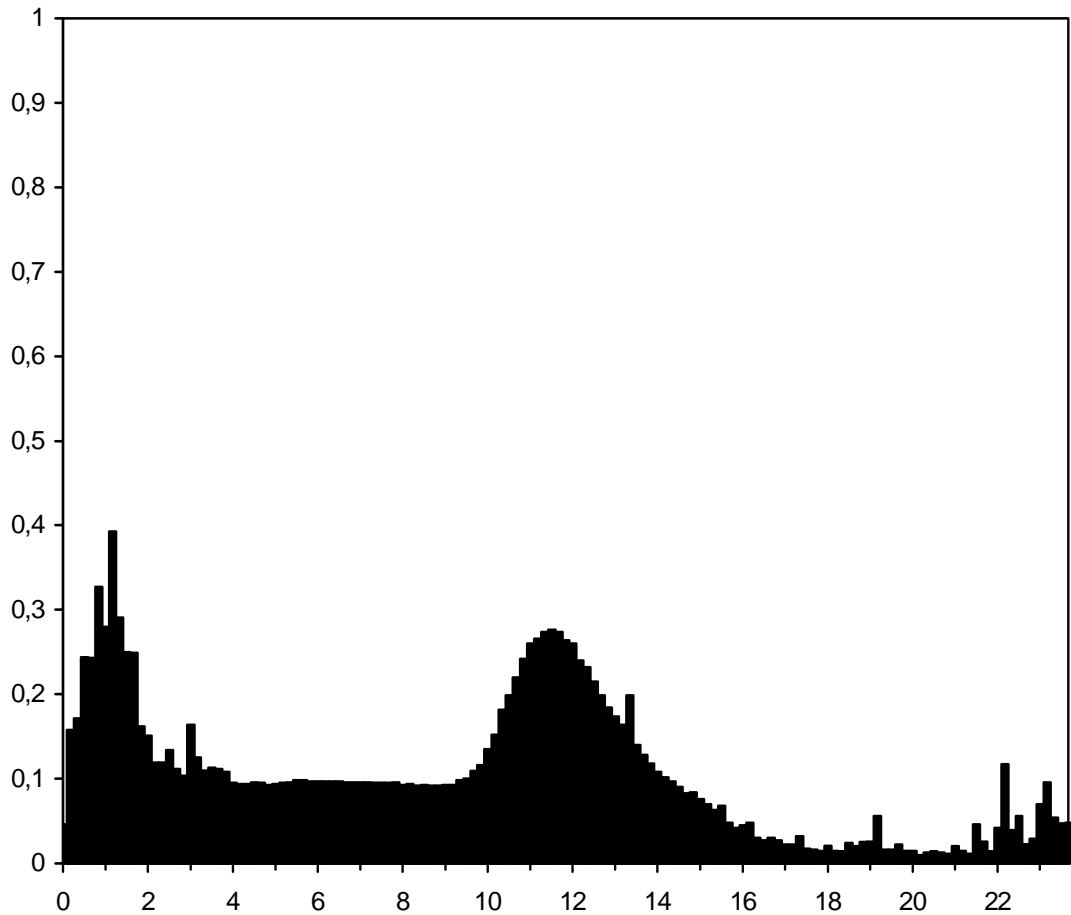


Abb. 60: Effekt von 10^{-4} M 3-Hydroxykynurenin auf die spontane Biolumineszenz von *Lingulodinium polyedrum*.

3-Hydroxykynurenin wurde zugleich mit dem Transfer nach DD (ZT 12) appliziert.

Verwendet wurde dieselbe Kultur wie in Abb. 59. Weitere Details wie in Abb. 59.

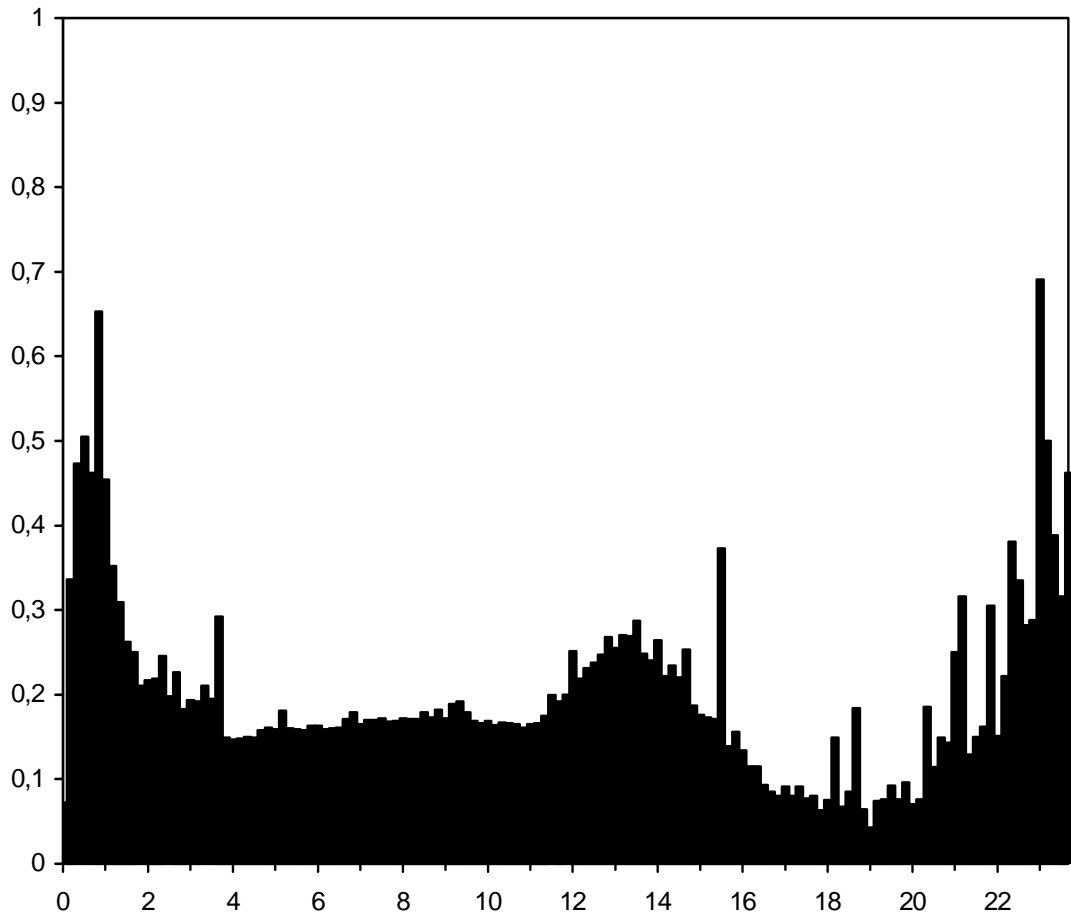


Abb. 61: Effekt von 2×10^{-4} M 3-Hydroxykynurenin auf die spontane Biolumineszenz von *Lingulodinium polyedrum*.

Weitere Details wie in Abb. 59 und 60.

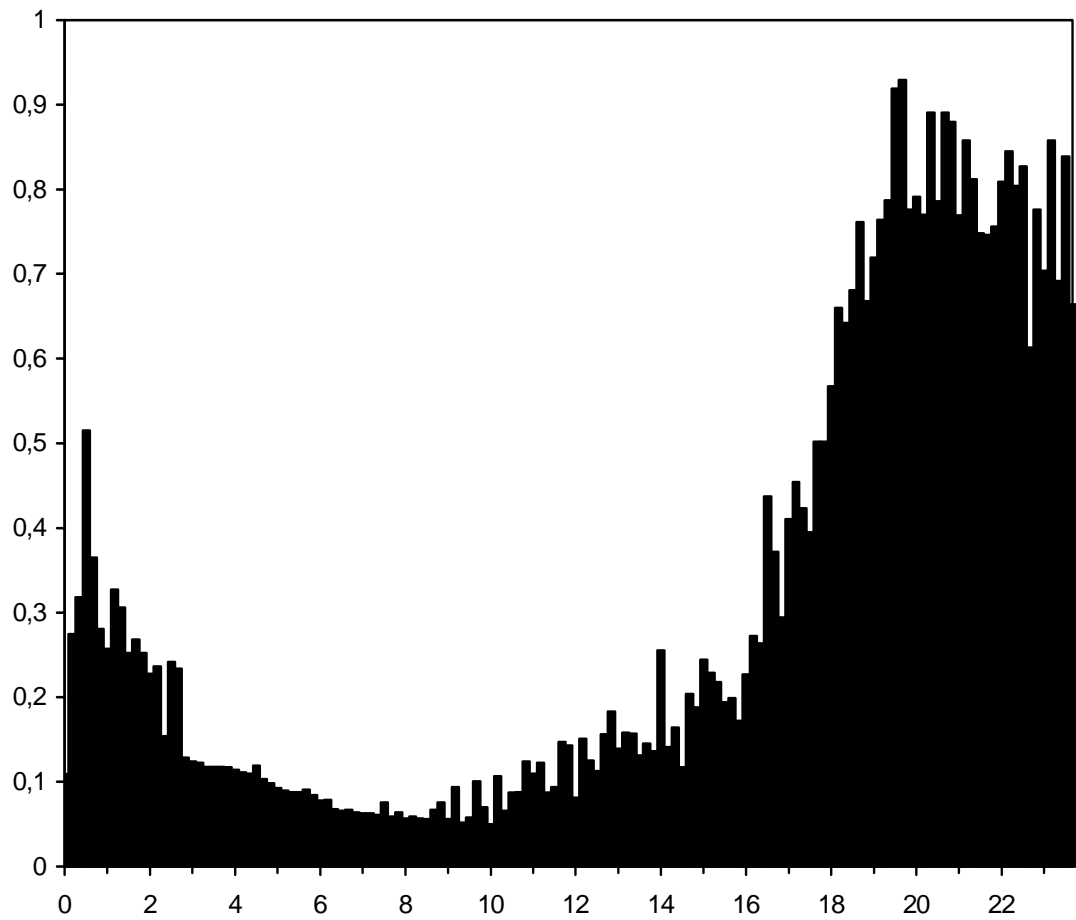


Abb. 62: Effekt von 5×10^{-4} M 3-Hydroxykynurenin auf die spontane Biolumineszenz von *Lingulodinium polyedrum*.

Weitere Details wie in Abb. 59 und 60.

3.15 Oxidative Folgeprodukte von Kynurensäure und deren Analoga

Die fluorometrische Charakterisierung der oxidativen Produkten von Kynurensäure und deren Analoga erfolgte nach einem Tag Reaktionszeit in dem alkalischen H_2O_2 -System in Abwesenheit von Hämin als Katalysator (Reaktionsansatz II), wobei die Emissionsspektren der Edukte und Produkte bei der jeweiligen maximalen Anregungswellenlänge aufgezeichnet wurde.

Die maximale Emission der Kynurensäure von 398 nm wurde bei einer Anregung von ca. 340 nm detektiert. Das Emissionsspektrum ihres fluoreszierenden Produkts wies ein Maximum von 470 nm bei einer Exzitation von 370 nm auf (Abb. 63). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit früheren Untersuchungen, in denen Kynurensäure und ihr Produkt nach mehr als einen Tag Reaktionszeit im alkalischen, Hämin-katalysierten H_2O_2 -System fluorometrisch charakterisiert wurden (Hardeland & Zsizsik, 1997b).

Das Emissionsmaximum von 4-Hydroxychinolin lag um 360 nm bei einer Anregungswellenlänge von 300 nm, wobei sein Oxidationsprodukt eine maximale Emission von 430 nm bei einer Exzitation von 350 nm zeigte (Abb. 64). Da die Fluoreszenz der Chinaldinsäure aufgrund der Quencheffekte des Produkts nicht detektierbar war, wurde nur das Emissionsspektrum ihres fluoreszierenden Produkts aufgezeichnet (Abb. 65). Das Emissionsspektrum dieses Produkts wies ein Maximum von 460 nm bei einer Anregung von 340 nm auf. Analog wurden auch die Fluoreszenzspektren der Xanthurensäure und ihres Oxidationsprodukts aufgenommen (Abb. 66), wobei Xanthurensäure durch eine maximale Emission von 440 nm bei einer Exzitation von 320 nm charakterisiert war. Ihr fluoreszierendes Produkt wurde bei einer Anregungswellenlänge von 410 nm mit einem Emissionsmaximum von 500 nm detektiert.

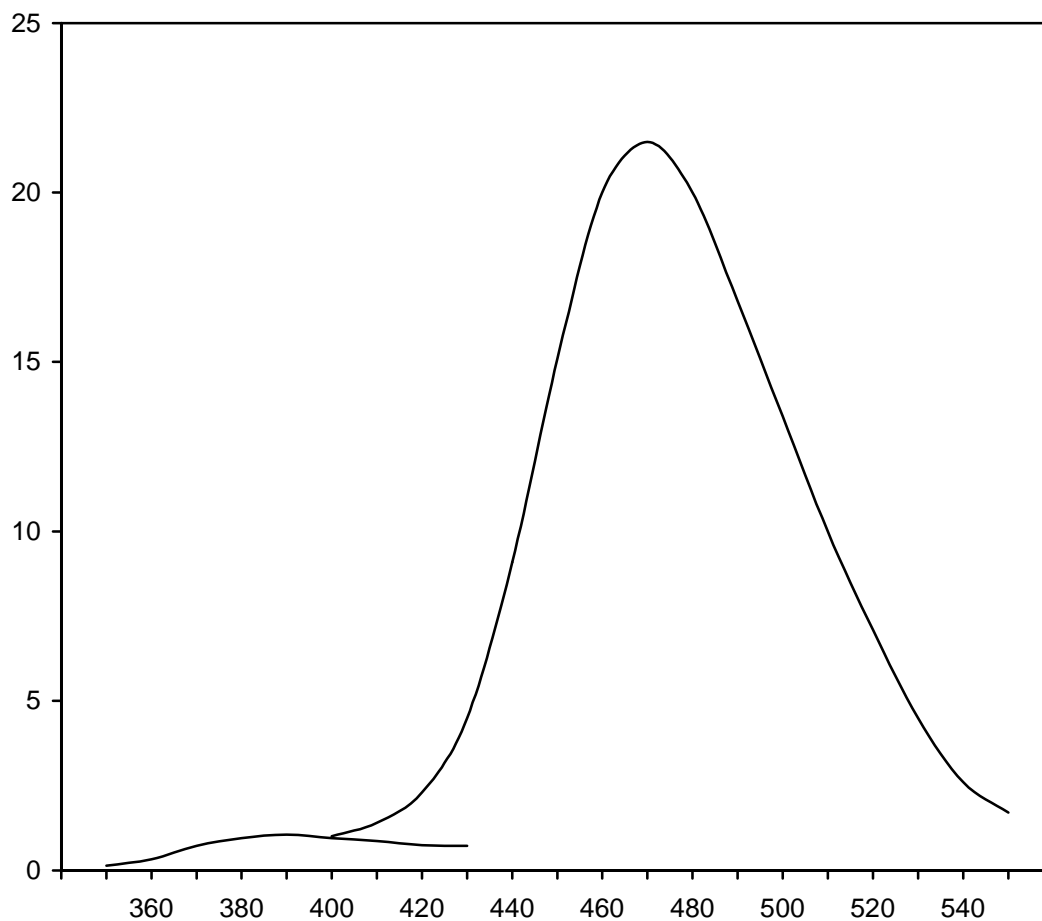


Abb. 63: Emissionsspektrum des Oxidationsprodukts der Kynurensäure

Abzisse: Emissionswellenlänge [nm]; Ordinate: RFU = relative Fluoreszenzeinheiten; linke Kurve: Restfluoreszenz der Kynurensäure [Exz.:340 nm, Em.:398 nm]; rechte Kurve: Produkt [Exz.:370 nm, Em.:470 nm]. Die Messungen wurden nach 1 Tag Reaktionszeit durchgeführt.

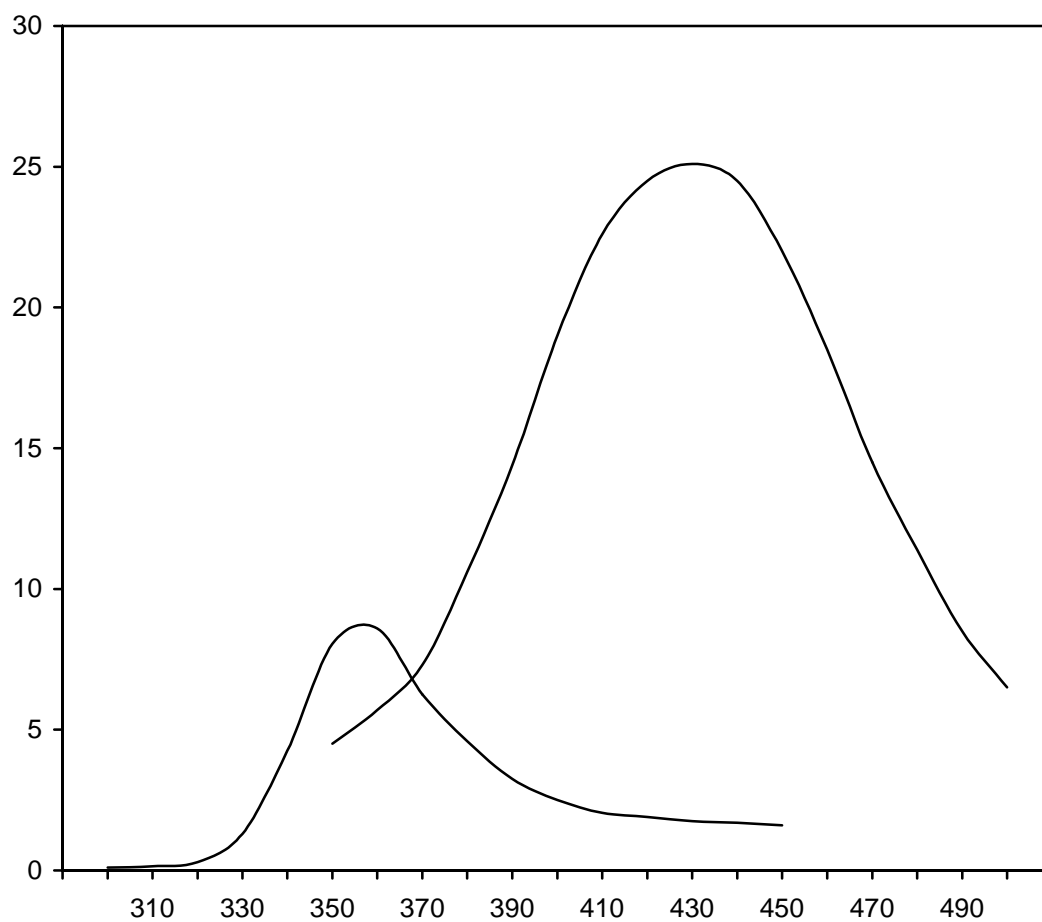


Abb. 64: Emissionsspektren von 4-Hydroxychinolin und seines Oxidationsprodukts

Linke Kurve: verbliebenes 4-Hydroxychinolin [Exz.:300 nm, Em.:360 nm]; rechte Kurve: Produkt [Exz.:350 nm, Em.:430 nm]; weitere Details wie in Abb. 63.

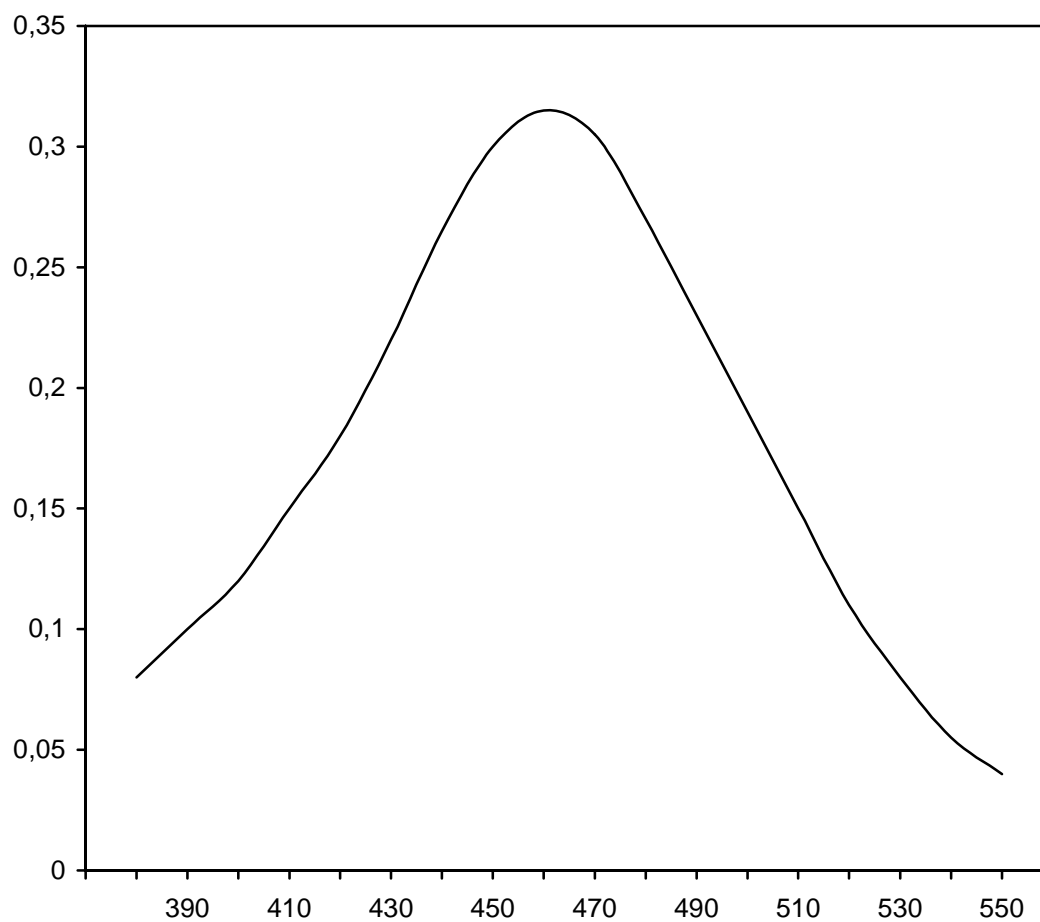


Abb. 65: Emissionsspektrum des Oxidationsprodukts von Chinaldinsäure

Produkt [Exz.:340 nm, Em.:460 nm]; weitere Details wie in Abb. 63.

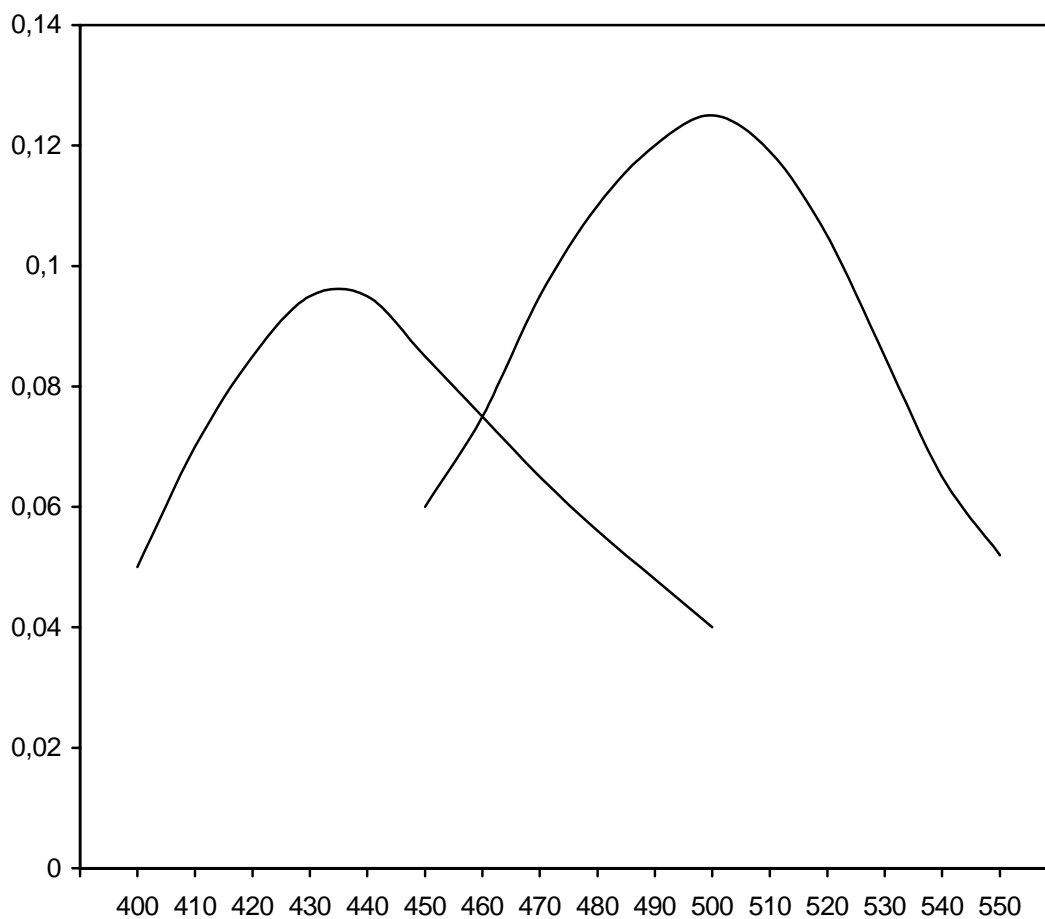


Abb. 66: Emissionsspektren der Xanthurensäure und ihres Oxidationsprodukts

Linke Kurve: verbliebene Xanthurensäure [Exz.:320 nm, Em.:440 nm]; rechte Kurve: Produkt [Exz.:410 nm, Em.:500 nm]; weitere Details wie in Abb. 63.

3.16 Weitere Charakterisierung des Oxidationsprodukts von Kynurensäure; Trennung von Kynurensäure und ihrem Produkt durch HPLC mit UV-Detektion und durch Dünnschichtchromatographie

Im Rahmen dieser Versuchsreihe zur Untersuchung oxidativer Folgeprodukte der o.g. Tryptophanmetabolite wurden Kynurensäure und ihr Oxidationsprodukt zusätzlich durch HPLC aufgetrennt und mittels UV-Detektion bei den Wellenlängen von 260 nm und 370 nm bestimmt. Zuvor war die Kynurensäure über eine Reaktionszeit von etwa 20 h in dem alkalischen H_2O_2 -System in Abwesenheit von Hämin als Katalysator oxidiert worden (Reaktionsansatz II). Die betreffenden Wellenlängen wurden unter Berücksichtigung der Absorptionsspektren dieser beiden Metabolite ausgewählt. Die Absorptionsmaxima der Kynurensäure lagen bei 240 nm und 330 nm, während ihr Produkt maximal bei 245 nm und 370 nm absorbierte.

Abb. 67 C und D zeigen die Chromatogramme des Kynurensäure-Standards bei 260 nm und 370 nm. In den beiden oberen Chromatogrammen (Abb. 67, A und B) sind entsprechende Messungen für Kynurensäure und ihr Oxidationsprodukt wiedergegeben. Dieses Produkt besaß eine etwas längere Retentionszeit als die Kynurensäure und dürfte somit apolarer sein als diese.

Kynurensäure und ihr Produkt konnten des weiteren präparativ durch Dünnschichtchromatographie in Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:1) getrennt werden; die R_f -Werte betragen 0,56 bzw. 0,52. Trotz deren Nähe waren die beiden Substanzen deutlich separiert. Das Produkt konnte reeluiert, in gereinigter Form isoliert und einer vorläufigen massenspektrometrischen Charakterisierung zugeführt werden. Hierbei ergab sich eine dominierende Masse von 164 Da. Der Vergleich mit Kynurensäure (189 Da) zeigt, daß das Oxidationsprodukt funktionelle Gruppen verloren haben muß und auch keinen Stickstoff mehr enthalten kann (Daten nicht dargestellt).

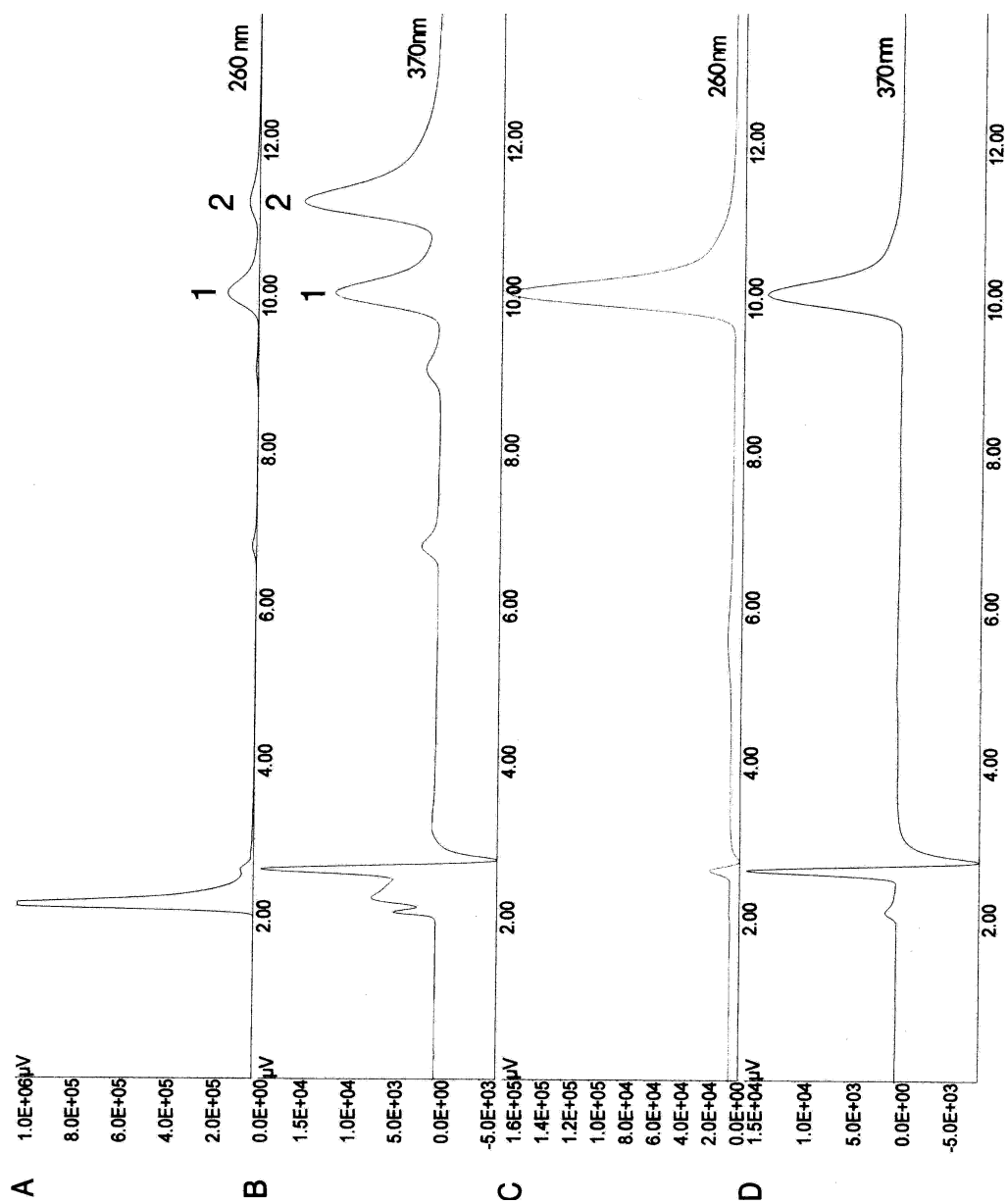


Abb. 67: HPLC-UV-Chromatogramme der Kynurensäure und ihres Oxidationsprodukts

1) Kynurensäure; 2) Oxidationsprodukt; Abzisse: Retentionszeit; Ordinate: Absorption. Bei jeweils 2 Wellenlängen (260 und 370 nm).

3. 17 Abbau von 2-Desoxyribose in Gegenwart von Hydroxylradikalfängern

Der oxidative Abbau von 2-Desoxyribose durch Hydroxylradikale resultiert in der Bildung von Malondialdehyd (MDA), welches mit Thiobarbitursäure (TBA) ein photometrierbares Addukt bildet (Gutteridge, 1981; Gutteridge 1987). Die Generierung der interagierenden Hydroxylradikale erfolgte in den nachfolgenden Experimenten durch Belichtung von N-Hydroxy-2-pyridinthion (HPT; Hess & Dix, 1992) oder von δ -Aminolävulinsäure (ALA). Die genannten photokatalytischen Methoden vermeiden die starke zeitliche Dynamik der Radikalbildung, wie sie für übergangsmetallhaltige Systeme typisch ist. Nach diesem Verfahren wurden Kynurensäure, Xanthurensäure sowie, zu Zwecken des Vergleichs, Melatonin auf ihre Eigenschaften als Hydroxylradikalfänger untersucht.

In Gegenwart von Kynurensäure konnte der oxidative Abbau von 2-Desoxyribose auf mehr als die Hälfte reduziert werden. Dies ist Ausdruck seiner Fähigkeit, kontinuierlich generierte Hydroxylradikale auch über einen ausgedehnten Zeitraum effektiv fangen zu können (Abb. 68). Obwohl die Konzentration der Kynurensäure im Vergleich zur 2-Desoxyribose 10-fach niedriger war, wurde die Destruktion der Pentose effizient inhibiert. Vergleichende Untersuchungen mit Melatonin, einem potenten Hydroxylradikalfänger (Tan *et al.*, 1993), führten zu einer Hemmung des radikalischen Abbaus von 2-Desoxyribose in ähnlicher Größenordnung wie Kynurensäure (Abb. 69). Da sich Xanthurensäure im Hämatoxylin-Autoxidationssystem als überaus effektiver Hydroxylradikalfänger erwiesen hatte, wurde sie ebenfalls anhand der Destruktion von 2-Desoxyribose auf ihre antioxidativen Eigenschaften untersucht. Die Gegenwart von Xanthurensäure verursachte in diesem System eine instantane und nahezu vollständige Inhibition der oxidativen Zerstörung der Pentose über den relativ langen Zeitraum von 4 h hinweg (Abb. 70).

Basierend auf der Photooxidation von ALA als Quelle reaktiver Sauerstoffspezies wurde die Destruktion von 2-Desoxyribose ebenfalls untersucht. Überraschenderweise wurde der ALA-initiierte oxidative Abbau der Pentose durch Kynurensäure auf ca. das 9-fache gesteigert (Abb. 71). Somit konnten erstmalig prooxidative Effekte von Kynurensäure nachgewiesen werden.

Parallel zur Photooxidation wurde die radikalische Destruktion von 2-Desoxyribose unter dem Einfluß von ALA und Kynurensäure in entsprechender Weise auch im Dunkeln gemessen. Obwohl ALA grundsätzlich auch ohne photokatalytisch wirksame Anregung reaktive Sauerstoffspezies generieren kann (Monteiro *et al.*, 1989; Hermes-Lima, 1995; Hiraku & Kawanishi, 1996; Douki *et al.*, 1998), wurde in diesem chemischen System im Dunkeln keine ALA-initiierte Pentosedestruktion detektiert. Bei gemeinsamer Anwesenheit von Kynurensäure und ALA wurde jedoch auch im Dunkeln ein erheblicher oxidativer Abbau von 2-Desoxyribose mehrfach festgestellt (Abb. 71). Dieser Befund deutet auf eine direkte Interaktion zwischen ALA und Kynurensäure hin, die prooxidative Effekte hervorruft.

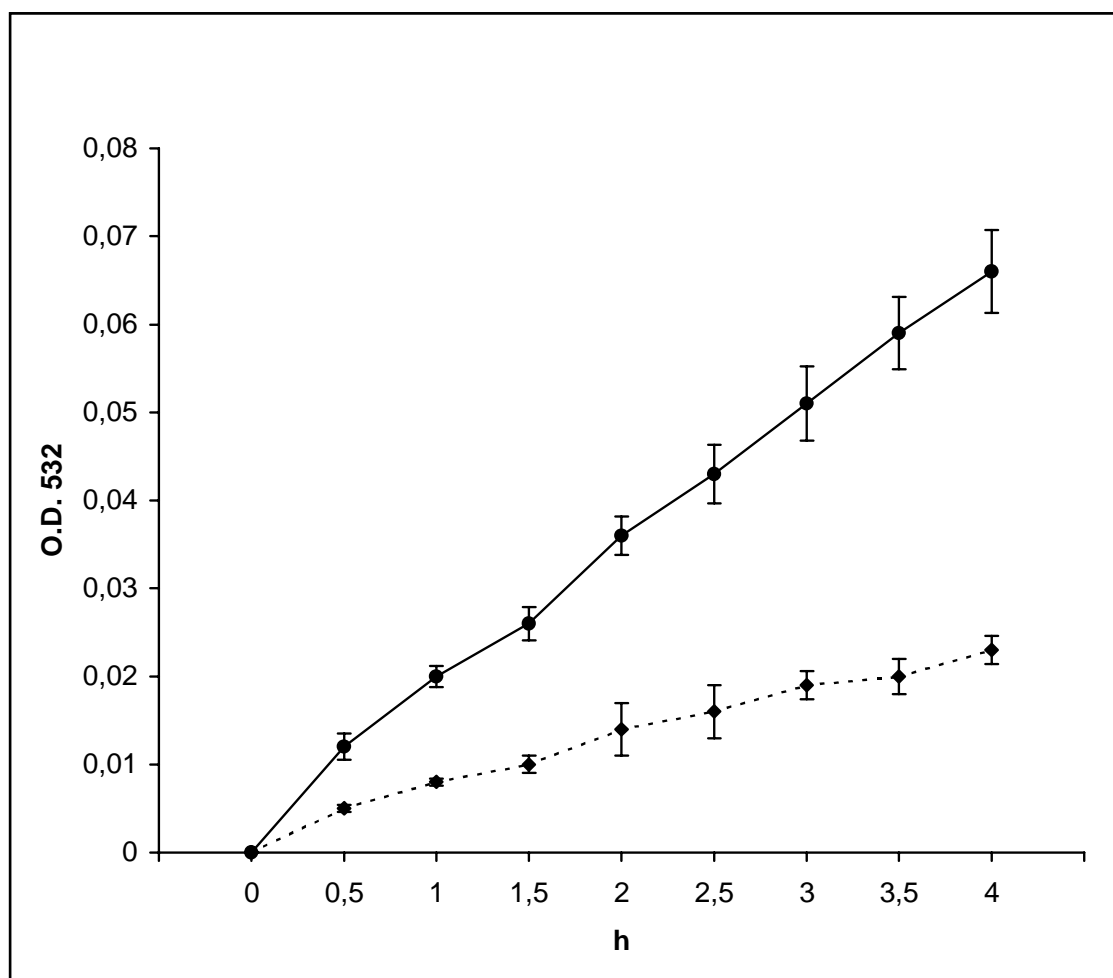


Abb. 68: Hemmung der Destruktion von 2-Desoxyribose durch Kynurensäure bei der Photolyse von N-Hydroxy-2-pyridinthion.

Ordinate: Absorption des Thiobarbiturat-Addukts nach oxidativen 2-Desoxyribose-Abbau; Abzisse: Inkubation unter Belichtung; durchgezogene Linie: Kontrolle; gestrichelte Linie: Inkubation mit Kynurensäure; vertikale Linien: Standardfehler.

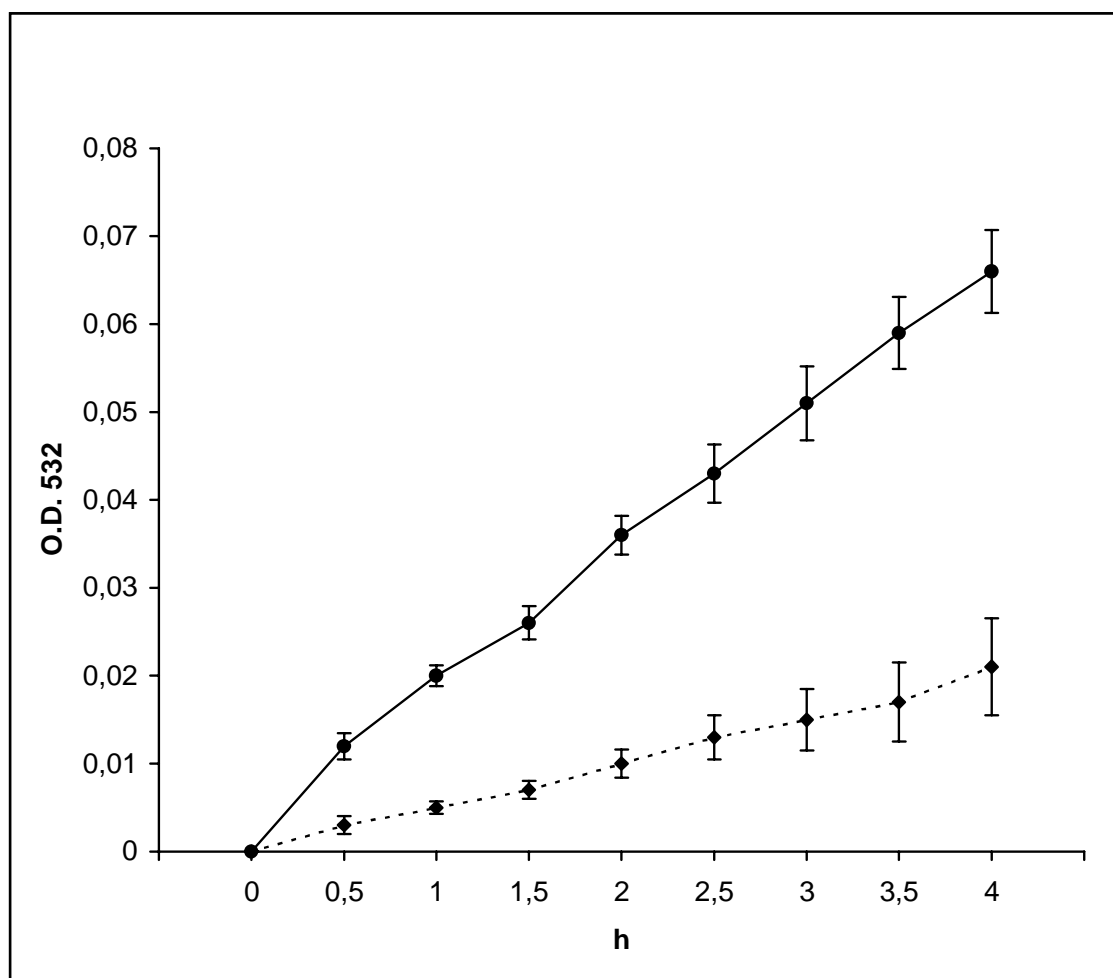


Abb. 69: Hemmung der Destruktion von 2-Desoxyribose durch Melatonin bei der Photolyse von N-Hydroxy-2-pyridinthion.

Durchgezogene Linie: Kontrolle; gestrichelte Linie: Inkubation mit Melatonin; weitere Details wie in Abb. 68.

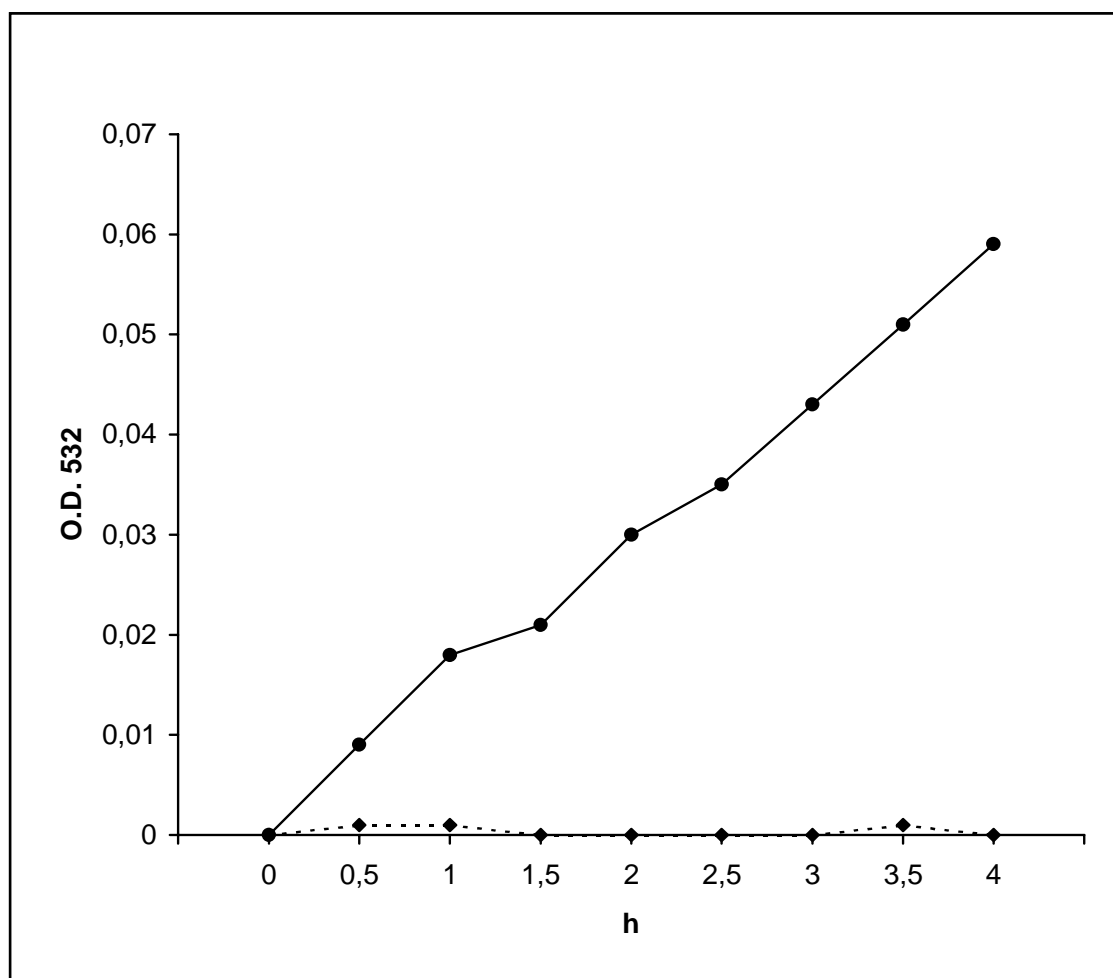


Abb. 70: Nahezu vollständige Hemmung der Destruktion von 2-Desoxyribose durch Xanthurensäure bei der Photolyse von N-Hydroxy-2-pyridinthion.

Durchgezogene Linie: Kontrolle; gestrichelte Linie: Inkubation mit Xanthurensäure; weitere Details wie in Abb. 68.

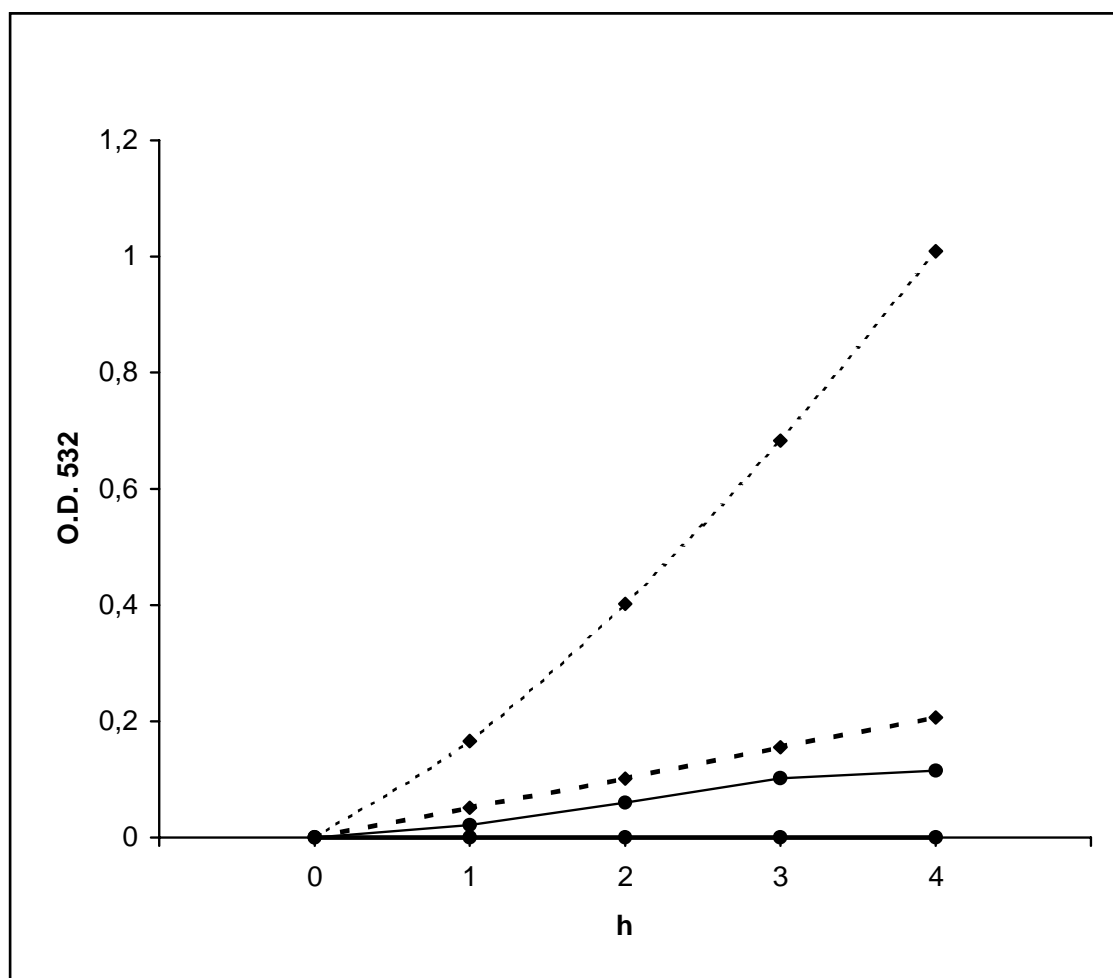


Abb. 71: Effekte der Kynurensäure auf die δ -Aminolävulin säure-initiierte Destruktion von 2-Desoxyribose.

Ordinate: Absorption des Thiobarbiturat-Addukts nach oxidativen 2-Desoxyribose-Abbau; Abzisse: Inkubation unter Belichtung oder im Dunkeln; durchgezogene Linie (fett): ALA im Dunkeln; durchgezogene Linie (dünn): ALA unter Belichtung; gestrichelte Linie (fett): ALA und Kynurensäure im Dunkeln; gestrichelte Linie (dünn): ALA und Kynurensäure unter Belichtung. Inkubationen mit Kynurensäure alleine ergaben weder im Dunkeln noch in Licht eine Destruktion der 2-Desoxyribose (Daten nicht dargestellt).

4. Diskussion

Lingulodinium polyedrum besitzt die Stoffwechselzweige des Kynureninweges ebenso wie den der Tryptophan-Transaminierung, der ebenfalls in die Kynurensäure-Bildung einmünden kann. Einzelne Schritte dieser Synthesewege wie z.B. die Transaminierung von Tryptophan oder Kynurenin, aber auch nicht-enzymatische Vorgänge haben sich bei diesem Modellorganismus gut verfolgen lassen. Tryptophan und dessen hier studierte Metabolite werden von den Zellen gut aufgenommen und sind, soweit sie nicht in extremen Konzentrationen verabreicht werden, gut verträglich. Eine extrazelluläre Dosis von 10^{-4} M Tryptophan wurde von *Lingulodinium polyedrum* gut toleriert und hatte üblicherweise keinen Einfluß auf den sehr sensitiven Indikator Biolumineszenz (Burkhardt *et al.*, 1995; Burkhardt & Hardeland, 1996). Eine entsprechend gute Verträglichkeit zeigte sich auch im Falle von Kynurenin. 3-Hydroxykynurenin, das sich prooxidativ zu verhalten vermag und zur Entstehung ebenfalls prooxidativer Nebenprodukte führen kann, wird in einer Konzentration von 10^{-5} M von *Lingulodinium polyedrum* über einen längeren Zeitraum gut vertragen; schwache prooxidative Effekte deuteten sich erst an, wenn die Dosis um eine Größenordnung erhöht wird. Die Produkte von Kynurenin und 3-Hydroxykynurenin lassen sich sowohl intra- als auch extrazellulär, also nach Freisetzung ins Medium, gut nachweisen.

Sinnvolle Aussagen über die Bildungs- und Freisetzungsraten können nur getroffen werden, wenn bekannt ist, unter welchen Umständen diese variieren können. Hierbei müssen grundsätzlich die Möglichkeiten von Substratinduktionen der betreffenden Enzyme sowie tagesrhythmischer Variationen berücksichtigt werden.

Für die Bildungs- und Freisetzungsraten der Kynurensäure wurde im LD 12:12 eine klare unimodale Tagesrhythmik mit einem Maximum in der zweiten Hälfte der Photophase nachgewiesen. Dieses unimodale Tagesmuster war unter Bedingungen wie Dauerdunkel oder konstanter Belichtung nicht nachweisbar. Das Durchschnittsniveau der Freisetzungsrates von Kynurensäure ins Medium hing von der Belichtung und ihrer Dauer ab. Diese Befunde deuten auf einen diurnalen Rhythmus exogenen Ursprungs hin, wobei allerdings die Existenz einer minder bedeutenden endogenen Komponente nicht ausgeschlossen werden kann.

Fluktuationen, wie sie im LL beobachtet wurden, deuten in diese Richtung. Das Ausbleiben einer nennenswerten Rhythmik im DD muß nicht hiergegen sprechen, sofern der schwingende physiologische Parameter an die Photosynthese gekoppelt ist und somit im DD permissive Bedingungen fehlen.

Die gemessenen Freisetzungsraten müssen mit den Aktivitäten der beiden bekannten Kynurensäure-liefernden Enzyme, der Tryptophan- und der Kynurenin-Aminotransferase in Beziehung gesetzt werden.

Die Aktivität der Tryptophan-Aminotransferase zeigt einen Tagesrhythmus mit bimodalem Verlauf, der ein ausgeprägtes Maximum kurz nach Beginn der Scotophase und ein Nebenmaximum in der Mitte der Photophase aufweist. Das tagesperiodische Muster der Tryptophan-Aminotransferase unterscheidet sich deutlich von dem der Kynurensäure-Freisetzung und kann diese somit nicht erklären. Außerdem unterscheidet es sich von dem einer anderen bei *Lingulodinium polyedrum* bereits untersuchten Aminotransferase, der Tyrosin:2-Oxoglutarat-Aminotransferase (Groß *et al.*, 1994). Die Tyrosin-Aminotransferase zeigte in ihrem zeitlichen Muster eine weniger ausgeprägte Bimodalität; deren Hauptmaximum lag in der Mitte der Scotophase und ein relativ kleines Nebenmaximum in der Mitte der Photophase. Mit Blick auf diese Unterschiede läßt sich feststellen, daß es sich bei den Tryptophan- und Tyrosin-Aminotransferasen von *Lingulodinium polyedrum* nicht um ein einziges multisubstratspezifisches, sondern um zwei verschiedene Enzyme handelt, im Gegensatz zu manchen Aromatischen Aminosäure-Aminotransferasen anderer Organismen, wie *Phaseolus aureus* und *Clostridium sporogenes*, die Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin als Aminodonor verwenden können (Gamborg, 1965; O'Neil & DeMoss, 1968), oder *Phaseolus vulgaris*, bei deren Aminotransferase sogar fünf Aminosäure-Substrate identifiziert wurden (Forest & Wightman, 1972). Der Tagesverlauf der Kynurenin-Aminotransferase zeigte ebenfalls eine Tendenz zur Bimodalität mit Maxima während der Scoto- bzw. Photophase, jedoch bleibt angesichts der bemerkenswert hohen Variabilität der Daten dieses Musters relativ ungewiss. Sicher ist dagegen, daß sich das tagesperiodische Muster der Kynurenin-Aminotransferase von jenen der Tryptophan- und Tyrosin-Aminotransferasen unterscheidet und das Enzym somit von diesen verschieden sein muß.

Da in Abwesenheit von Oxoglutarat kein nennenswerter Blindgang nachgewiesen wurde (Daten nicht dargestellt), ist auch die Involvierung einer unspezifischen Aminosäure-Oxidase ausgeschlossen.

Ein bimodales tagesperiodisches Muster ist bei Rhythmen, die nur indirekt an den Primäroszillator angekoppelt sind, ein eher häufiges Phänomen. Derartiges wurde auch im Kynurenin-Stoffwechsel der Ratte festgestellt, u.a. bei der cytosolischen Kynurenin-Aminotransferase der Niere (Hardeland, 1969).

Die erhöhten Nachtwerte der Tryptophan-Aminotransferase bei *L. polyedrum* legten eine Überprüfung der Möglichkeit nahe, daß Melatonin, welches ca. 1,5 h vorher seinen Gipfel erreicht (Poeggeler *et al.*, 1991), eventuell dieses phasenkorrelierte Enzym induzieren könnte. Melatonin bewirkte jedoch keine wesentliche Veränderung in der Aktivität dieses Enzyms, so daß eine von dem Indolamin ausgehende Enzyminduktion ausgeschlossen werden konnte. Das tagesperiodische Muster der Kynurenin-Aminotransferase sprach von vornherein gegen eine Induzierbarkeit durch Melatonin. Da Tryptophan zugleich Substrat der Tryptophan-Aminotransferase und Ausgangssubstanz für die Synthese von Kynurenin ist, wurden die beiden untersuchten Aminotransferasen auf ihre Substratinduzierbarkeit überprüft. Ein Überangebot des Substrats führte in der Tat zu Änderungen im zeitlichen Muster der Tryptophan-Aminotransferase, wogegen die Aktivität der Kynurenin-Aminotransferase weder in ihrer durchschnittlichen Höhe noch im Muster durch Tryptophan fast nicht verändert wurde (Zsizsik, unpubl.); selbst in Anbetracht dessen, daß Tryptophan erst zu Kynurenin metabolisiert werden muß, spricht das Ausbleiben jeglichen Effekts gegen eine Substratinduktion. Auch die Effekte auf die Tryptophan-Aminotransferase sind nicht einfach als Induktion zu erklären, da zum einen das Ausmaß der Erhöhungen moderat blieb und zum anderen, in der zweiten Hälfte der Photophase, auch Unterdrückungen auftraten. Tryptophan bewirkte allein in der Mitte der Scotophase eine Erhöhung der Tryptophan-Aminotransferase, also einer Zeit höchster Stickstoffaufnahme (Roenneberg & Rehman, 1996) und Proteinsynthese (Schröder-Lorenz & Rensing, 1987) und vermutlich auch Aminosäurebildung; exogenes Tryptophan würde somit zu endogen gebildetem hinzukommen und einen Bedarf an Tryptophan-Abbau bedingen.

Die Bildungs- und Freisetzungsraten der Kynurensäure lagen um eine Größenordnung höher als die der bekannten enzymatischen Kapazität, welche unter Meßbedingungen bei pH-Optimum und Substratsättigung nicht wesentlich den maximalen physiologischen Umsatz unterschreiten sollte. Diese Befunde deuten auf die Existenz mindestens eines weiteren Stoffwechselweges der Kynurensäure-Bildung hin, wobei die Lichtabhängigkeit einen Hinweis auf die Involvierung der Photosynthese liefert.

Die Photosyntheserate muß im LD wegen der Maskierung im Dunkeln selbstverständlich weitgehend eine exogene Rhythmik reflektieren. Zwar sind für Photosyntheserate und -kapazität bei *Lingulodinium polyedrum* auch circadiane Komponenten nachgewiesen (Sweeney, 1960; Hastings *et al.*, 1961; Prézelin & Sweeney, 1977; Prézelin *et al.*, 1977; Sweeney, 1979; Harding *et al.*, 1981), doch zeigen Stämme, die bereits seit langer Zeit (>15 Jahre) im Labor gehalten wurden, starke Verminderungen der Amplituden in den endogenen Anteilen der Photosynthesefunktionen (Sweeney, 1986). Bei der hier verwendeten Zelllinie (seit 1970 in Kultur) ist die Schwingungsweite bereits auf einen Wert von ca. 20 % abgesunken (Pape & Hardeland, 1999b) und somit erheblich niedriger als bei Wildstämmen. Eine Nachuntersuchung bei Neuisolaten sollte demnach im LL eine stärker ausgeprägte endogene Komponente von Kynurensäure-Bildung und -Freisetzung erwarten lassen.

Die bei *Lingulodinium polyedrum* gemessenen Bildungs- und Freisetzungsraten von Kynurensäure lassen sich, wie oben angeführt, allein mit der Kapazität der bis dahin bekannten Enzyme, Tryptophan- und Kynurenin-Aminotransferase, nicht erklären. Die Beteiligung einer unspezifischen Aminosäure-Oxidase konnte ebenfalls ausgeschlossen werden. In Anbetracht der starken Lichtabhängigkeit der Kynurensäure-Bildung wäre die Suche nach weiteren Isoenzymen mit anderer Kosubstratspezifität (vgl. Einleitung: Okuno *et al.*, 1991; Guidetti *et al.*, 1997) für die Erklärung der Gesamtbilanz nicht aussichtsreich gewesen; sinnvoller war die Überprüfung einer direkten Beziehung zur Photosynthese. Eine Möglichkeit, durch die aus Kynurenin eine zyklisierende Oxosäure entstehen könnte, bestünde in einer desaminierenden Oxidation. Derartiges könnte sich mit der Photosynthese insoweit in Verbindung bringen lassen, als die Elektronentransportketten der Photosysteme bei photoautotrophen Organismen die Hauptquelle der Wasserstoffperoxidbildung darstellen (Collén *et al.*, 1995; Collén & Pedersén, 1996; Collén & Davison, 1997; Halliwell & Gutteridge, 1999).

Wasserstoffperoxid jedoch kann als Reaktionspartner diverser Verbindungen auftreten, wenn Peroxidasen mit geringer Substratspezifität für Wasserstoffdonatoren vorhanden sind. Da Aminosäuren als Substrate von Hämoperoxidasen zu fungieren vermögen (Change & Maehly, 1968), und L-Kynurenin dieser Substanzklasse angehört, wurde ein etwaiger Umsatz mit Meerrettich-Peroxidase als Modell für unspezifische Hämoperoxidasen untersucht. Hierbei ließ sich sowohl in Ab- als auch in Anwesenheit der Peroxidase Kynurensäure-Bildung nachweisen. Angesichts der generellen Unspezifität von Hämoperoxidasen (außer Ascorbat-Peroxidase) ist damit zu rechnen, daß solche Enzyme auch aus anderer Herkunft dies zu leisten vermögen. *Lingulodinium polyedrum* verfügt über solche unspezifischen Peroxidasen aus der Gruppe der Hämoperoxidasen (Antolín *et al.*, 1997). Eine solche Interpretation ist umso wahrscheinlicher, als Kynurenin bereits in Abwesenheit des Enzyms mit H_2O_2 direkt interagieren kann.

Der Mechanismus der Peroxidase-Wirkung liegt auf der Hand. Die Wasserstoffdonation müßte analog zu einer flavinabhängigen, etwa wie im Falle von Aminosäure-Oxidasen, in der primären Bildung einer Iminosäure bestehen, wobei die Peroxidase wie üblich die beiden Wasserstoffe auf das H_2O_2 überträgt. Die Iminosäure kann zur Oxosäure hydrolysieren, welche sodann zur Kynurensäure zyklisiert (Abb. 72).

Für die Entstehung der Kynurensäure wären auch andere photosyntheseabhängige Mechanismen des Wasserstoffentzugs denkbar, wie z.B. Interaktionen von Kynurenin mit freien Radikalen, die aus der Photosynthese stammen, oder mit Komponenten der Elektronentransportkette selbst. Daß Kynurenin als Reduktionsmittel fungieren kann, wurde bereits bestätigt (Goda *et al.*, 1999). Durch den Einsatz von Carbonylcyanid-m-chlorphenylhydrazon (CCCP), Paraquat sowie Dichlorphenyldimethylharnstoff (DCMU) ließ sich eine Beteiligung der Photosynthese an der Kynurensäure-Bildung im Homogenat von *Lingulodinium polyedrum* nachweisen. Die Verwendung von Homogenaten anstatt lebender Zellen hatte sich aufgrund von Problemen der Aufnahme der Agentien als notwendig erwiesen; dies wurde jedoch durch niedrigere Raten der Kynurensäure-Bildung erkauft, denn mit dem unvermeidbaren Zerfall der hochgradig verzweigten Plastiden in Vesikeln bei der Homogenisierung sind Funktionsverluste verbunden.

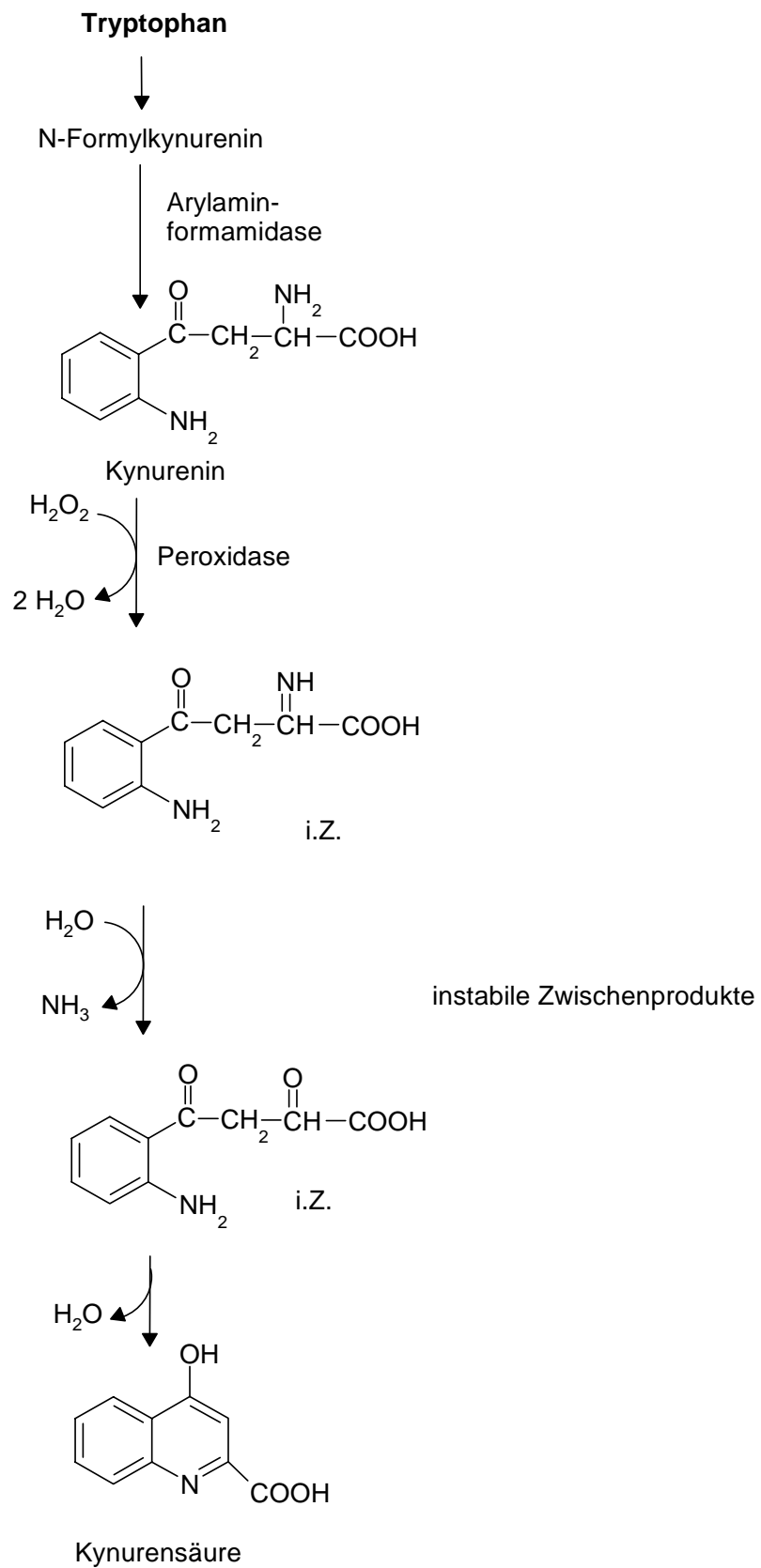


Abb. 72: Ein neuer Stoffwechselweg der Kynurensäure-Bildung durch Peroxidase.

Trotz der niedrigeren Raten und dem niedrigeren Photosynthese-abhängigen Anteil der Kynurensäure-Synthese im Homogenat zeigen die Agentien Veränderungen in der zur erwartenden Richtung. CCCP, als Entkoppler der Photophosphorylierung, sowie Paraquat, ein Elektronenakzeptor der Elektronentransportkette, führen zu vermehrter H₂O₂-Bildung; dementsprechend wurde auch eine signifikante Steigerung der Kynurensäure-Bildung gemessen. DCMU hingegen blockiert den Elektronentransport im Photosystem II und hemmt somit die H₂O₂-Generierung; auch die Kynurensäure-Bildung ist im Experiment vermindert.

Alle bis dahin gezeigten Daten weisen darauf hin, daß der Kynurenin-Weg des Tryptophan-Stoffwechsels sowie dessen Metabolite bei *Lingulodinium polyedrum* quantitativ nicht vernachlässigbar sind. Kynurenin stellt hierbei einen entscheidenden Verzweigungspunkt des Tryptophan-Abbaus dar. Xanthurensäure und ihr direkter Vorläufer, 3-Hydroxykynurenin, wurden im Rahmen dieser Arbeit als physiologische Metabolite bei diesem Dinoflagellaten detektiert. Auch unter dem Gesichtspunkt von Radikalfangen und -generieren stellt sich Kynurenin als Knotenpunkt dar, wobei die Produkte der verschiedenen Stoffwechselzweige eine z.T. gegensätzliche Rolle spielen. Zum einen ist Kynurenin Ausgangssubstanz der Kynurensäure und somit Quelle eines potenten und physiologisch wichtigen Radikalfängers. Zum anderen kann die Monooxygenierung zum *in vivo* nachweisbaren 3-Hydroxykynurenin sowohl zur Bildung einer antioxidativ wirkenden Substanz, der Xanthurensäure, führen als auch zur Entstehung prooxidativer Metabolite (s.a. 3.14).

Die Bildung von Xanthurensäure aus 3-Hydroxykynurenin sollte analog zu jener von Kynurensäure aus Kynurenin möglich sein. Kynurenin-Aminotransferasen akzeptieren üblicherweise auch 3-Hydroxykynurenin als Substrat (Wiss, 1953; Ogasawara, 1962). Wasserstoffdonation wie im Falle der Kynurensäure wäre ebenfalls denkbar. Die HPLC-Chromatogramme zeigen, daß bei Inkubation der Zellen mit 3-Hydroxykynurenin weitere Produkte entstehen. Dies ist im Prinzip nicht weiter erstaunlich, da die Metabolite des 3-Hydroxyanthranilsäure-Zweiges einschließlich der Pyridincarboxylsäuren zu erwarten wären. Der wesentliche Unterschied zwischen Kynuren- und Xanthurensäure betrifft die Lichtabhängigkeit von intrazellulären Konzentrationen und Freisetzung.

Diese sind im Falle der Xanthurensäure wesentlich geringer. 3-Hydroxykynurenin ist im Vergleich zum Kynurenin ein besserer Radikalfänger und auch ein besseres Reduktionsmittel (Goda *et al.*, 1999). Zum einen könnte 3-Hydroxykynurenin über radikalische Interaktionen aus dem Stoffwechselweg abfließen, zum anderen sollte man aber annehmen, daß eine Wasserstoffdonation mit anschließender Zyklisierung zur Xanthurensäure im Vergleich zum nichthydroxylierten Analog begünstigt sein sollte. Daß dennoch im Licht weniger Xanthurensäure (ca. 1 nMol/h \times mg Protein im Licht; ca. 0,5 nMol/h \times mg Protein im Dunkeln) freigesetzt wurde als Kynurensäure (ca. 1,8 μ Mol/h \times mg Protein im Licht, ca. 0,4 μ Mol/h \times mg Protein im Dunkeln), muß nicht zwingend eine geringere lichtabhängige Synthese bedeuten, sondern könnte auch darauf beruhen, daß Xanthurensäure als weitaus besserer Radikalfänger von Oxidantien aus der Photosynthese weiter umgesetzt wird.

Bei allen Betrachtungen der ins Medium freigesetzten Mengen an Kynuren- und Xanthurensäure sollten die erheblichen Volumenunterschiede zwischen der Gesamtzellmasse und dem Medium beachtet werden. Die Zellen machen höchstens ein halbes Prozent des Gesamtvolumens aus. Der Vergleich von intrazellulärer und extrazellulärer Menge im Falle der Xanthurensäure macht dabei einen sehr großen Konzentrationsunterschied deutlich. Wiewohl die proteinbezogenen Werte in Zellen und Medium in derselben Größenordnung liegen, sind angesichts des Volumenunterschieds zwischen Zellen und Medium die intrazellulären Konzentrationen um ca. das 2000-fache höher. Hieraus ergibt sich zwingend der Schluß auf eine wirksame Diffusionsbarriere. Der Metabolit dürfte daher nicht aktiv sezerniert werden, sondern leckt mit geringer Rate aus den Zellen heraus.

Diese unter derartiger Betrachtung eher geringe Freisetzungsrates kontrastiert stark mit der effizienten Aufnahme der Vorstufe. Trotz des äußerst geringen Volumenanteils der Zellen im Medium sind diese imstande, innerhalb von 12 Stunden den allergrößten Teil des extrazellulären 3-Hydroxykynurenins aufzunehmen. Da kaum vorstellbar ist, daß dieser Metabolit im Seewasser eine bedeutende Nährstoffquelle darstellt, dürfte er über einen wenig spezifischen Aromatischen Aminosäure-Transporter aufgenommen werden. Entsprechendes sollte für das Kynurenin gelten.

Wie bereits dargelegt, beinhalten die Stoffwechselwege der Bildung und des Abbaus von Kynurensäure bzw. ihrer Analoga sowohl enzymatische als auch nicht-enzymatische, radikalische Schritte. Im folgenden sollen die Radikalreaktionen der jeweiligen Metabolite betrachtet werden. Zu diesem Zweck war deren Verhalten in diversen chemischen Oxidationssystemen studiert worden. Eine hochreaktive Verbindung, die zur Bildung von Kynurensäure führen kann, ist Indol-3-pyruvat. Grundsätzlich können aus dieser Vorstufe aber auch andere Produkte entstehen, insbesondere gefärbte Polymere (Atsumi & Hayashi, 1979), die als rote Herbstlaubfarbstoffe in der Natur auffallen. Auch deren Entstehung verläuft über die Spaltung des Pyrrolrings, während ein radikalischer Angriff an der Seitenkette zur Bildung von Oxalsäure und Glyoxylsäure führen kann (Politi *et al.*, 1996). Rote Polymere wurden nach Zugabe zum Indol-3-pyruvat ins Kulturmedium von *L. polyedrum* gefunden, jedoch nicht im alkalischen H₂O₂-System, in welchem Kynurensäure offenbar das dominierende Produkt darstellt, wie auch die Fluorometrie zeigte.

Indol-3-pyruvat erwies sich als sehr reaktiver Radikalfänger, was z.T. mit zuvor bekannten Daten über Hemmung von Radikalschäden in Homogenaten übereinstimmt (Politi *et al.*, 1991, 1996). Im Detail wird nunmehr die Spezifität gegenüber einzelnen Radikalarten aufgezeigt: Die Substanz erwies sich als ein sehr potenter Fänger von Hydroxylradikalen, ABTS-Kationradikalen und auch Superoxidanionen. Grundsätzlich vermag sie also sowohl gefährliche hochreaktive Radikale zu entgiften als auch langlebige mesomeriestabilisierte organische Radikale. Trotz dieser positiv erscheinenden Eigenschaften und trotz der erwähnten Protektion in Homogenaten muß man den praktischen Wert als Radikalfänger in Frage stellen: Da Indol-3-pyruvat auch sehr gut mit Superoxidanionen interagiert, würde es vermutlich von solchen niederreaktiven aber höherkonzentrierten (Halliwell & Gutteridge, 1999) Radikalen eliminiert. Einen Hinweis hierauf gibt der Umsatz von Indol-3-pyruvat im *Lingulodinium*-Medium. Dort existiert mit Sicherheit kein hoher oxidativer Druck; in Abwesenheit von Zellen sind dort allein niedrige Konzentrationen von Superoxidanionen (vgl. Meßprinzip des Hämatoxylin-Tests) und H₂O₂ (Marler, 1966; Cooper & Zika, 1984) zu erwarten.

Der tatsächliche Wert des Indol-3-pyruvats könnte somit weniger in der Eliminierung von hochreaktiven Radikalen liegen, wofür es möglicherweise wegen seines anderweitigen Umsatzes nicht ausreichend zur Verfügung steht, sondern in der Erzeugung eines weiteren Radikalfängers, der Kynurensäure.

Die Verfolgung der Chemilumineszenz bei der Oxidation von Indol-3-pyruvat bot eine weitere Möglichkeit zur Analyse der Radikalreaktionen. Zwar war grundsätzlich bereits bekannt gewesen, daß bei der Oxidation dieser Substanz Licht emittiert wird (Zinner *et al.*, 1974). Hier wurde jedoch die Chemilumineszenz genutzt, um die an der Emitterbildung beteiligten Radikale zu identifizieren. Die Kinetik der Lichtemission ähnelte sehr stark jener einer Gruppe anderer Indolverbindungen, wenn auch mit jeweils für die einzelne Substanz spezifischen mittleren Emissionsrate, so z.B. Melatonin (Fuhrberg & Hardeland, 1994a), N-Acetyltryptamin (Thuermann & Hardeland, unveröff.) und Indol-3-propionat (Hardeland *et al.*, 1999c). Insofern überrascht es nicht, daß die Beteiligung von Radikalen an der Emitterbildung aus Indol-3-pyruvat im Grundsatz jener der anderen Substanzen entspricht. Wie bei diesen (Hardeland *et al.*, 1999c) laufen nebeneinander Einschnitt- und Zweischrittmechanismen radikalischer Interaktionen ab: zum einen vermag das Hämin die Addition eines Sauerstoff-Moleküls aus einem Superoxidanion bei gleichzeitiger Übernahme des Elektrons durch das Eisen zu katalysieren (Einschnittmechanismus), zum anderen kann ein Hydroxylradikal ein Elektron aus dem Indol abstrahieren und somit ein stickstoffzentriertes Indolylkationradikal erzeugen, welches unter Ladungsausgleich und Elektronenpaarung mit einem Superoxidanion kombiniert (Zweischrittmechanismus); bzgl. dieser Mechanismen bei Melatonin s.a. Hardeland *et al.* (1993) und Hardeland & Fuhrberg (1996). Die Gültigkeit dieser beiden Reaktionsformen erweist sich bei den Inhibitionsexperimenten mit dem hochkonzentrierten Hydroxylradikalfänger DMSO und dem Superoxidanionfänger Tiron. DMSO vermag die Chemilumineszenz nur partiell zu unterdrücken, d.h., daß der Einschnittmechanismus weiter ablaufen kann, während Tiron die Lichtemission nahezu instantan und komplett supprimiert, also beide Mechanismen blockiert.

Superoxidanionen sind aber in jedem Fall zur Emitterbildung erforderlich, weil Sauerstoff zur Entstehung von Dioxetanstrukturen mit nachfolgender Erzeugung aktiver Carbonyle addiert werden muß, Vorgängen also, wie sie von Luciferinen (vgl. Hardeland *et al.*, 1997b) und anderen chemilumineszenten Systemen (Nery *et al.*, 1999) bekannt sind. Der Unterschied gegenüber Luciferinen besteht darin, daß die Sauerstoffübertragung nicht durch ein Enzym katalysiert wird, sondern entweder durch Hämin in einer pseudoenzymatischen Reaktion oder durch die Abstraktion eines Elektrons mittels eines Hydroxylradikals.

In der vorliegenden Untersuchung wurden mit voller Absicht verschiedene Oxidationssysteme eingesetzt, um nicht durch je nach System unterschiedliche Randbedingungen zu unausgewogenen Schlüssen zu gelangen. Es erscheint auch erforderlich, die Aussagefähigkeit der jeweiligen Systeme zu betrachten, mit denen das Radikalfangen verfolgt wurde. Der verwendete ABTS-Test erweist sich als robust und zugleich einfach im Vergleich zu spin-trap-Messungen; gegenüber diesen besitzt er den Vorteil, ohne Zeitverluste durch HPLC und ESR-Prozeduren vor allem auch schnell genug durchgeführt zu werden, um die kurzlebigen Radikale gut zu erfassen. Auch hinsichtlich der bemerkenswerten Stabilität des ABTS-Kationradikals und des geringen zeitlichen wie maschinellen Aufwandes stellt dieser Test eine vorteilhafte und in mancher Hinsicht überlegene Technik dar. Im Wettbewerbstest mit ABTS wird notwendigerweise im leicht sauren Milieu gearbeitet (Hardeland *et al.*, 1999b); für die Reaktivität des Hydroxylradikals ist dies nicht von Belang, potentiell jedoch für den mit ABTS kompetierenden Radikalfänger, sofern dieser durch Protonierung seine Eigenschaften verändert. Indol-3-pyruvat erwies sich unter diesen Bedingungen allerdings als äußerst potent. Die Kurve der Bildung von ABTS-Kationradikalen enthält zwei Abschnitte mit unterschiedlicher Aussage: Der Anstieg reflektiert die Fähigkeit des kompetierenden Radikalfängers, Hydroxylradikale zu fangen, während der Test in der zweiten Phase, wenn die Fenton-Reaktion zurückgeht, zugleich einen Anhaltspunkt für die Reduktion des Kationradikals durch Einelektronentransfer liefert. Diese letztere Möglichkeit kann auch separat getestet werden, wenn nach Erreichen des Plateaus der zu untersuchende Radikalfänger zugegeben wird.

Im Hämatoxylin-Test werden Superoxidanionen allein unter nicht-katalysierten Bedingungen gefangen. Nur hochreaktive Radikalfänger erweisen sich hier als effektiv. Reaktivität als chemische Eigenschaft sagt jedoch noch wenig über den biologischen Wert eines Radikalfängers aus. Wie oben bereits im Falle des Indol-3-pyruvats ausgeführt, vermögen die in biologischem Material am höchsten konzentrierten Radikale, die Superoxidanionen, hochreaktive Fänger leicht zu eliminieren. Somit zeigt der Hämatoxylin-Test an, welche der Antioxidantien leicht radikalisch verstoffwechselt werden, ohne vor den gefährlicheren Radikalspezies wie Hydroxylradikalen zu schützen. Die Interaktionen mit Superoxidanionen in katalysierten Systemen dürfen mit jenen ohne Katalyse keinesfalls verwechselt werden. Unter Katalyse können viele Antioxidantien sehr wohl mit Superoxidanionen reagieren, auch wenn sie im Hämatoxylynsystem ineffektiv sind.

Dieser Unterschied ist von erheblicher biologischer Bedeutung. Nach Abstraktion eines Elektrons, z.B. durch ein Hydroxylradikal, und der hieraus resultierenden Bildung eines Kationradikals vermag letzteres durch Kombination mit einem Superoxidanion die radikalische Reaktionskette zu terminieren. Die Radikalreaktionen propagieren also nicht weiter in wichtigen Biomolekülen. In diesem Sinne sind Superoxidanionen für Vorgänge der Protektion sogar wichtig und z.T. notwendig. Auch an dieser Stelle zeigt sich, wie wenig die bloße chemische Betrachtung der Reaktivität für die biologische Bedeutung aussagt.

Dieser Gedanke läßt sich auch für die ABTS-Rückreduktion aufgreifen. Wiewohl ABTS-Kationradikale nicht in biologischem Material vorhanden sind, stellen sie doch ein Modell für langlebige organische mesomeriestabilisierte Radikale dar; solche Verbindungen werden im Stoffwechsel durchaus gebildet, doch in ihrer Gefährlichkeit wegen ihrer geringen Reaktivität vermutlich unterschätzt. Sie stellen jedoch für die Zellen eine Art von „Damoklesschwert“ dar, da sie, zwar nach Überschreiten einer längeren mittleren Lebensdauer, dennoch aber mit großer Wahrscheinlichkeit neue Reaktionsketten zu initiieren vermögen. Eine Substanz, die imstande ist, ABTS-Kationradikale zu reduzieren, sollte somit einen biologischen Wert vermuten lassen.

Die Fähigkeit, wie bei der Reduktion des ABTS-Kationradikals eine Einelektronentransferreaktion einzugehen, ist nicht durch die Reaktivität *per se* auszudrücken.

Diese Aussage hat zwei Seiten, von denen die eine sofort plausibel erscheint, die andere aber überraschend ist: Man würde z.B. nicht erwarten müssen, daß ein Hydroxylradikalfänger wie etwa Salicylat, der vornehmlich über die Addition von Hydroxylradikalen wirksam wird (Hall *et al.*, 1994), auch zugleich ein guter Elektronendonator und damit Reaktionspartner eines Kationradikals sein müßte. In der vorliegenden Arbeit wird aber auch im Falle der Chinaldinsäure gezeigt, daß sie als Hydroxylradikalfänger geradezu ineffizient ist, aber dennoch das weitaus niederreaktivere ABTS-Kationradikal zu reduzieren vermag. Trotz der scheinbaren Inplausibilität zeigen die Daten den Sachverhalt sehr deutlich. Die geringe Effizienz im Fangen von Hydroxylradikalen korrespondiert mit der extrem niedrigen Chemilumineszenzrate, die unter erheblich anderen Randbedingungen gemessen wurde. Ferner existiert ein ähnlicher Fall bei einer Indolverbindung, dem 5-Methoxytryptophol, welches eine entsprechende Spezifität gegenüber den genannten Radikalen besitzt (Haldar *et al.*, 1999).

Ein spezieller Aspekt des Radikalfangens ist die hiermit unter geeigneten Bedingungen verbundene Chemilumineszenz. Diese bietet eine Möglichkeit, Interaktionen mit bestimmten Oxidantien schnell und hochsensitiv zu detektieren und zu identifizieren. Auf der anderen Seite ist es wichtig, sich bewußt zu machen, daß nur diejenigen Reaktionen dabei betrachtet werden, die zur Lichtemission führen, wie in den hier untersuchten Fällen jene, die letztlich, über die geschilderten Katalysemechanismen, zur Sauerstoffaddition und Bildung aktiver Carbonyle führen. Dies schließt andere, sog. „schwarze“ Nebenreaktionen aber keineswegs aus. Man könnte daher daran denken, daß die langsamen Anstiege der Lumineszenz bei der radikalischen Oxidation von Kynurensäure und Xanthurensäure darauf beruhen könnten, daß am Beginn der Inkubation die schwarzen Reaktionen überwiegen und die zur Photonenemission führenden später dominieren. Gegen eine solche Sicht spricht allerdings die hohe Gesamtlumineszenz, die über die Inkubationsdauer gemessen wird und sich über mehr als einen Tag erstreckt; der langsame Anstieg könnte sich somit auch aus der Bildung von Zwischenprodukten vor der Emitterentstehung erklären.

Die Vergleichbarkeit der Chemilumineszenzraten aus der Oxidation verschiedener Substanzen ist nicht unbedingt gegeben. Hier geht selbstverständlich die Reaktionsrate ein, zusätzlich aber auch die Emitterstärke, die nach Größe des Moleküls und Elektronenverteilung variieren kann. Beim Vergleich der Oxidationschemie von Kynurensäure und ihren Analoga zeigt sich, mit einer noch zu diskutierenden Ausnahme, aber eine im großen und ganzen gute Korrelation zwischen der Fähigkeit, Hydroxylradikale als Initiatoren der Lumineszenzreaktion zu fangen und der Emissionsrate.

Die detaillierte Betrachtung der Chinoline als Radikalfänger zeigt deutliche Unterschiede gegenüber dem Verhalten der Indole, wie hier etwa dem Indol-3-pyruvat. Letzteres reagiert im Prinzip ähnlich wie manche anderen Indole mit hinreichend langer Seitenkette, etwa Melatonin oder Indol-3-propionat, also Bildung kynurischer Produkte durch Öffnung des Pyrrolrings; auch die Interaktionen in Einschnitt und Zweischnittmechanismen sind, wie oben dargelegt, entsprechend (vgl. Hardeland & Fuhrberg, 1996; Hardeland *et al.*, 1993, 1999c). Alle diese sind zugleich gute Hydroxylradikalfänger wie auch Reduktantien des ABTS-Kationradikals. Kynurensäure hingegen fängt mit passabler Rate Hydroxylradikale, reduziert ABTS-Kationradikale dagegen nur wenig. Ohne Katalyse interagiert Kynurensäure mit Superoxidanionen nicht nennenswert, wohl aber in katalysierter Situation; in dieser Hinsicht unterscheidet sie sich zwar deutlich von dem Indol-3-pyruvat, aber nicht von Indolen generell: Melatonin oder Indol-3-propionat entsprechen in dieser Hinsicht durchaus der Kynurensäure (Fuhrberg & Hardeland, 1996; Hardeland *et al.*, 1999c), während das enolisierte Indol-3-pyruvat in der bei dieser Substanz möglichen Tautomerieform eine wesentlich höhere Reaktivität besitzt (Politi *et al.*, 1996). Ein erheblicher Unterschied besteht zwischen der Kynurensäure und den genannten Indolen hinsichtlich der Möglichkeit, Sauerstoff aus Superoxidanionen mit Hilfe von Hämin zu übertragen. Dieser Einschnittmechanismus scheint hier ausgeschlossen, wie die völlige Abhängigkeit der Emitterbildung von der vorherigen Interaktion mit Hydroxylradikalen zeigt: Zugabe von DMSO führt zu einer raschen und weitgehenden Unterdrückung der Chemilumineszenz, im klaren Gegensatz zu den entsprechenden Experimenten mit Indolen, bei denen in dieser Situation der Einschnittmechanismus weiter abläuft (vgl. Abb. 20 sowie Hardeland *et al.*, 1999c).

Der nachfolgend zu diskutierende Oxidationsmechanismus der Kynurensäure macht diesen Unterschied plausibel.

Der Vergleich der Kynurensäure-Oxidation mit jener ihrer Analoga identifiziert, auf der Basis der verschiedenen Reaktionssysteme, die für die radikalischen Interaktionen wichtigen funktionellen Gruppen. Wie das Fehlen der Säuregruppe im 4-Hydroxychinolin zeigt, ist diese für das Fangen von Hydroxylradikalen essentiell. Ähnliches gilt für die Hydroxylgruppe in Position 4, deren Fehlen wie bei der Chinaldinsäure die Reaktivität gegenüber diesem Radikal erheblich vermindert. Erstaunlich erscheint die mit dem Nichtvorhandensein der OH-Gruppe verbundene Fähigkeit der Chinaldinsäure, ABTS-Kationradikale zu reduzieren, was über eine detaillierte Betrachtung der Elektronenverteilung erklärt werden sollte. Eine zusätzliche OH-Gruppe in Position 8 wie im Falle der Xanthurensäure führt, wie zu erwarten, zu einer Erhöhung der Reaktivität und somit zu einem deutlich effizienteren Fangen aller hier getesteten Radikale. Ein solcher Effekt der Hydroxylgruppe ist im Rahmen des Üblichen und findet seine Entsprechung auch bei anderen Radikalfängern, so etwa beim Vergleich hydroxylierter Indole mit methoxylierten oder unsubstituierten (Goda *et al.*, 1999; Dose, Poeggeler & Hardeland, unveröff. Daten).

Weniger leicht zu erklären ist das langsamere Ansteigen der Chemilumineszenz bei der Oxidation der Xanthurensäure, die mit ihrer höheren Reaktivität kontrastiert. Dies mag an der Möglichkeit liegen, eine intramolekulare Wasserstoffbrücke zwischen der 8-OH-Gruppe und dem Stickstoff auszubilden. Die Interaktion mit einem Hydroxylradikal wird hierdurch offenbar nicht entscheidend beeinflusst. Dies sollte auch nicht eine Angelegenheit des pH-Wertes sein, der sich im ABTS- und im alkalischen H₂O₂-System unterscheidet; der saurere pH des ABTS-Systems könnte zwar die Ausbildung der Wasserstoffbrücke behindern, doch sollte eine Protonierung die Möglichkeit einer Elektronenabstraktion vermindern.

Wenn man den langsamen Anstieg der Chemilumineszenz als Ausdruck einer verzögerten Emitterbildung in einem mehrstufigen Reaktionsprozeß versteht, könnte jedoch eine intramolekulare Wasserstoffbrücke auch in einem späteren Stadium der Reaktionskette von Bedeutung sein, etwa bei einer finalen Interaktion mit einem Superoxidanion.

Die Chemilumineszenz bei der Oxidation von Chinolinen zeigt des weiteren überraschende kinetische Unterschiede in Gegenwart und Abwesenheit des Katalysators Hämin. Ohne diesen fällt die Lichtemission sehr rasch ab, soweit Kynurensäure, 4-Hydroxychinolin und Chinaldinsäure betroffen sind. Bei Xanthurensäure erfolgt ebenfalls ein früherer Abfall, wenn auch erst mit einer Verzögerung von über vier Stunden. In Gegenwart des Katalysators wird in jedem Fall eine erheblich höhere Lichtemission erreicht. Die auffälligsten Unterschiede betreffen jedoch den schon diskutierten langsamen Anstieg, der ohne Katalysator bei Kynurensäure und 4-Hydroxychinolin ausbleibt, bei Xanthurensäure vorhanden, aber vermindert ist. Auch dies könnte ein Hinweis darauf sein, daß der Anstieg in einer Beziehung zur Interaktion mit einem Superoxidation steht. Dessen Übertragung in einem letzten Schritt der Reaktionskette könnte durch Hämin katalysiert werden, würde aber eine zuvorige initiale Interaktion mit einem Hydroxylradikal voraussetzen. Bei der höherreaktiven Xanthurensäure wären solche Prozesse auch ohne Katalysator möglich. Diese Interpretation ist aber nur dann plausibel, wenn die nahezu sofortige Hemmung der Chemilumineszenz durch DMSO bei der Kynurensäure-Oxidation ebenfalls erklärt wird. Ein langsam akkumulierendes, mäßig stabiles Zwischenprodukt würde durch Eliminierung der Hydroxylradikale zwar nicht weiter nachgebildet, müßte aber angesichts der ohne DMSO Stunden währenden Anreicherung dermaßen stabil sein, daß es nicht beim Ausbleiben seiner Neubildung sofort abfallen sollte. Diese wäre nur dann einleuchtend, wenn DMSO nicht nur Hydroxylradikale fangen würde, sondern auch mit einem radikalischen, mesomeriestabilisierten Zwischenprodukt interagieren würde. Die Beantwortung dieser Frage würde weiterer chemischer Untersuchungen über Natur und Eigenschaften der Zwischenprodukte erfordern. Wie auch immer die endgültige Interpretation aussehen wird, so bleibt festzuhalten, daß die beobachteten langsamen Anstiege der Emitterbildung ungewöhnlich sind und nach bestem Wissen kein Vorbild hierfür in der Literatur existiert. Vor kurzem sind über einige Stunden andauernde Zunahmen auch bei der Oxidation anderer Radikalfänger entdeckt worden (Thuermann & Hardeland, unveröff.), doch existiert noch kein mit der Xanthurensäure vergleichbarer Fall, bei dem sich der Anstieg über mehr als einen Tag erstreckt.

Radikalfänger sind oft mit dem Problem behaftet, daß sie sich nicht immer antioxidativ verhalten, sondern oftmals, auch situationsspezifisch, prooxidativ wirken können. Gut bekannt ist dies für Vitamine des antioxidativen Protektionssystems wie Ascorbat und Tocopherol. Diese sind zwar radikaleliminierende Verbindungen, vermögen jedoch andererseits über Redox-Cycling Radikale zu generieren und sich somit prooxidativ zu verhalten. Intrazelluläre und hochkonzentrierte Antioxidantien wie reduziertes Glutathion (GSH) und reduzierte Nicotinamid-Nucleotide (NADH, NADPH) leisten einen bedeutenden Beitrag zur Entgiftung von Radikalen. Doch verhält sich auch GSH in bestimmten Konstellationen prooxidativ (Fischer-Nielsen *et al.*, 1992; Spear & Aust, 1995). Als Quelle von DNA-Addukten kann es aufgrund seines prooxidativen Verhaltens auch zur Mutagenese und Carcinogenese führen (Huang *et al.*, 1998). Reduzierte Nicotinamid-Nucleotide vermögen mit Sauerstoff zu interagieren und auf diese Weise Superoxidanionen zu erzeugen, welche in H_2O_2 übergehen können (Land & Swallow, 1971; Messner & Imlay, 1999); ferner partizipieren sie am Redox-Cycling (Rao & Cederbaum, 1997); beides führt zu prooxidativen Effekten. Es mehren sich die Anzeichen dafür, daß auch Metabolite aromatischer Aminosäuren einen wichtigen Beitrag zur antioxidativen Protektion leisten können. Aufgrund ihrer Amphiphilie können sie in allen Kompartimenten präsent sein. Ihre mesomeren Systeme erlauben nach Interaktion mit freien Radikalen die Ausbildung stabilisierter Zwischenprodukte, deren Lebenszeit lang genug ist, um erneut mit den im Vergleich zu anderen Substanzen niedriger konzentrierten Radikalen interagieren zu können und somit die Reaktionskette zu terminieren.

Um über den antioxidativen Wert der hier untersuchten Radikalfänger, insbesondere Kynurensäure und Xanthurensäure, sinnvolle Aussagen treffen zu können, wurde ihr Verhalten unter Verwendung unterschiedlicher Systeme untersucht, die das Radikalfangen unter verschiedenen Aspekten reflektieren.

Eines von diesen bediente sich des oxidativen Abbaus von 2-Desoxyribose bei der Photolyse von N-Hydroxy-2-pyridinthion (HPT). Kynurensäure zeigte eine effiziente Hemmung der Destruktion von 2-Desoxyribose als Ausdruck ihrer Fähigkeit Hydroxylradikale zu fangen. Xanthurensäure, die sich hier im Vergleich zur Kynurensäure als weitaus potenter erwies, bewirkte eine instantane und nahezu vollständige Hemmung der oxidativen Zerstörung der Pentose.

Trotz dieser positiv erscheinenden Eigenschaften der Xanthurensäure muß man ihren praktischen Wert als Radikalfänger in Frage stellen: Da Xanthurensäure auch sehr gut mit Superoxidanionen interagiert, würde sie vermutlich von solchen niederreaktiven aber höherkonzentrierten Radikalen verbraucht und somit zur Eliminierung hochreaktiver Radikalen nicht ausreichend zur Verfügung stehen. Ein weiteres Problem betrifft ihre Bildung aus 3-Hydroxykynurenin, das sich prooxidativ zu verhalten vermag und außerdem zur Entstehung prooxidativer Nebenprodukte führen kann.

Ein anderes Problem prooxidativen Verhaltens ging überraschenderweise von der Kynurensäure aus, wenn die Destruktion von 2-Desoxyribose durch δ -Aminolävulinsäure initiiert wurde. Da in diesem System ohne photokatalytische Anregung von ALA keine Pentosedestruktion gemessen wurde und die Inkubationen mit Kynurensäure alleine weder im Dunkeln noch im Licht einen Abbau der 2-Desoxyribose ergaben, deuten diese Befunde auf eine direkte Interaktion zwischen ALA und Kynurensäure hin. Erst in dieser Kombination werden prooxidative Effekte hervorgerufen, die jedoch erheblich sind. Diese waren bereits im Dunkeln deutlich, unter Lichtanregung bedeutend verstärkt. Obwohl der genaue Mechanismus dieser Interaktion noch zu untersuchen bliebe, sollte dieses Phänomen in der Zukunft unbedingt beachtet werden, da es eine potentielle Implikation für Porphyrien besitzt. Bei Porphyrien kommt es zum vermehrten Auftreten von Protoporphyrinen wie Uroporphyrin oder Coproporphyrin, aber auch, je nach Porphyrie-Typ verschieden stark, zum massiven Übertritt von deren Vorstufen Porphobilinogen und ALA in die Zirkulation und von dort in die Gewebe.

Eine solche Überschwemmung mit Vorstufen ist insbesondere für die Akute Intermitierende Porphyrie (AIP) charakteristisch, bei der eine genetisch bedingte Insuffizienz der Porphobilinogen-Desaminase vorliegt, und bei der erhöhter oxidativer Stress mit mitochondrialer Schädigung auftritt (Hermes-Lima *et al.*, 1991, 1992; Vercesi *et al.*, 1994), der z.T. durch Adaptation antioxidativer Enzyme vom Organismus zu kompensieren versucht wird (Medeiros *et al.*, 1982). Die Akkumulation von ALA stellt offenbar eine endogene Quelle reaktiver Sauerstoffspezies dar, bedingt zum einen durch Photooxidation, zum anderen durch Autoxidation in Gegenwart von Übergangsmetallen.

Die Generierung von Radikalen, insbesondere Hydroxylradikalen, und anderen Oxidantien durch ALA ist verschiedentlich untersucht worden, aber nicht restlos geklärt (Monteiro *et al.*, 1989; Hermes-Lima, 1995; Hiraku & Kawanishi, 1996; Douki *et al.*, 1998). Porphyrien werden oft auch von psychiatrischen Phänomenen begleitet (Princ *et al.*, 1998), da ALA die Blut-Hirn-Schranke passieren kann. Die Interaktion von ALA mit Kynurensäure, welche, wie jetzt gezeigt, sogar ohne photokatalytische Anregung stattfindet, würde zu einer über jene von ALA hinausgehende Oxidotoxizität führen. ALA könnte darüber hinaus auch einen Einfluß auf die Bildung von Kynurensäure haben, wenn die Mikroglia auf den durch ALA erzeugten oxidativen Stress ähnlich wie bei inflammatorischen Stimulationen reagiert. In einer solchen Situation wird der Tryptophan-Abbau über Induktion der Indolamin-2,3-dioxygenase stimuliert (Alberati-Giani *et al.*, 1996; Reinhard & Flanagan, 1996), wie dies generell für Makrophagen gilt (Taylor *et al.*, 1996; Saito *et al.*, 1996; Ferrario *et al.*, 1996; MacKenzie *et al.*, 1999); und letztlich über den Kynurenin-Weg vermehrt Kynurensäure gebildet (Saito & Hayes, 1996). Im Falle von AIP könnte ALA durch Interaktion mit Kynurensäure einen erheblich höheren oxidativen Stress verursachen als bislang angenommen. Diese Befunde könnten somit Konsequenzen für das Verständnis der cerebralen Vorgänge bei Porphyrien haben.

Im oxidativen Metabolismus der Kynurensäure wären die anti- und prooxidativen Effekte zu bilanzieren. Die Interaktion mit ALA mag dabei ein nur sehr situationspezifischer Nebenaspekt sein.

Indol-3-pyruvat als Ausgangssubstanz der Kynurensäure vermag seriell Radikale zu fangen, wobei ein Hydroxylradikal ein Elektron aus dem Indol abstrahiert und somit ein stickstoffzentriertes Indolykationradikal erzeugt, welches unter Ladungsausgleich und Elektronenpaarung mit einem Superoxidanion kombiniert. Die Oxidation von Kynurensäure, welche ebenfalls durch die Interaktion mit Hydroxylradikalen und Superoxidanionen abläuft, führt zur Bildung eines dominierenden Hauptproduktes. Dieses konnte von der Kynurensäure präparativ durch Dünnschichtchromatographie getrennt, reeluiert, in gereinigter Form isoliert und einer vorläufigen massenspektrometrischen Charakterisierung zugeführt werden.

Hierbei ergab sich eine dominierende Masse von 164 Da. Der Vergleich mit Kynurensäure (189 Da) zeigt, daß das Oxidationsprodukt funktionelle Gruppen verloren haben muß und auch keinen Stickstoff mehr enthalten kann. Diese Befunde schränken das Spektrum der denkbaren Reaktionsmöglichkeiten bei der Oxidation von Kynurensäure bereits beträchtlich ein. Zwei eventuell in Frage kommende Produkte mit der geforderten Masse konnten aufgrund ihrer Fluoreszenzeigenschaften ausgeschlossen werden, und zwar Acetophenon-2-carboxylsäure und 3-Hydroxyphthalsäureanhydrid (Daten nicht gezeigt); aufgrund dessen zugleich das Stereoisomer 4-Hydroxyphthalsäureanhydrid. Für eine weitere Substanz dieser Masse, 2-Hydroxychromanon, stand kein Referenzmaterial zur Verfügung; sein Analogon Chromanon besaß eine Fluoreszenz mit ähnlichen Eigenschaften, jedoch mit einer Verschiebung in den kürzerwelligen Bereich (Daten nicht gezeigt). Angesichts der begrenzten Reaktionsmöglichkeiten hinsichtlich Masse und fehlendem Stickstoff, ist somit als Produkt das 2-Hydroxychromanon bzw. sein Tautomer 2,4-Dihydroxychromen wahrscheinlich. Ein Modell für den Oxidationsmechanismus ist in Abb. 73 dargestellt. Initial wird durch ein Hydroxylradikal ein Elektron aus der Kynurensäure abstrahiert, so daß ein Kationradikal entsteht, ähnlich dem Zweischnittmechanismus bei der Oxidation von Melatonin (Hardeland *et al.*, 1996). Um zu der gefundenen Produktmasse zu gelangen, muß das Molekül decarboxyliert werden. Hierbei oder, wie im Schema, nachfolgend könnte das betreffende Kationradikal sehr leicht eine Additionsreaktion mit einem Hydroxylradikal eingehen, was zwar zur Elektronenpaarung führt, nicht aber die positive Ladung eliminiert. Letztere könnte die Interaktion mit einem Superoxidanion begünstigen; da aber das Endprodukt keinen Stickstoff mehr enthält, müßte diese Reaktion unter Freisetzung von Stickstoffmonoxid ($\text{NO}\cdot$) ablaufen, wodurch die Aufnahme des Sauerstoffradikals zur Freisetzung eines $\text{NO}\cdot$ führen würde, die radikalische Reaktionskette somit terminiert würde, soweit die Kynurensäure-Umsetzung betroffen ist. Das Endprodukt wäre danach ein 2,4-Dihydroxychromen, welches die geforderte Masse besitzt und in zwei tautomeren Formen auftreten könnte. Das freigesetzte $\text{NO}\cdot$ hingegen könnte eine radikalische Reaktionskette fortsetzen, wenn es in Peroxynitrit übergeht, eine Quelle für Hydroxyl- oder Carbonatradikale (Blanchard *et al.*, 2000).

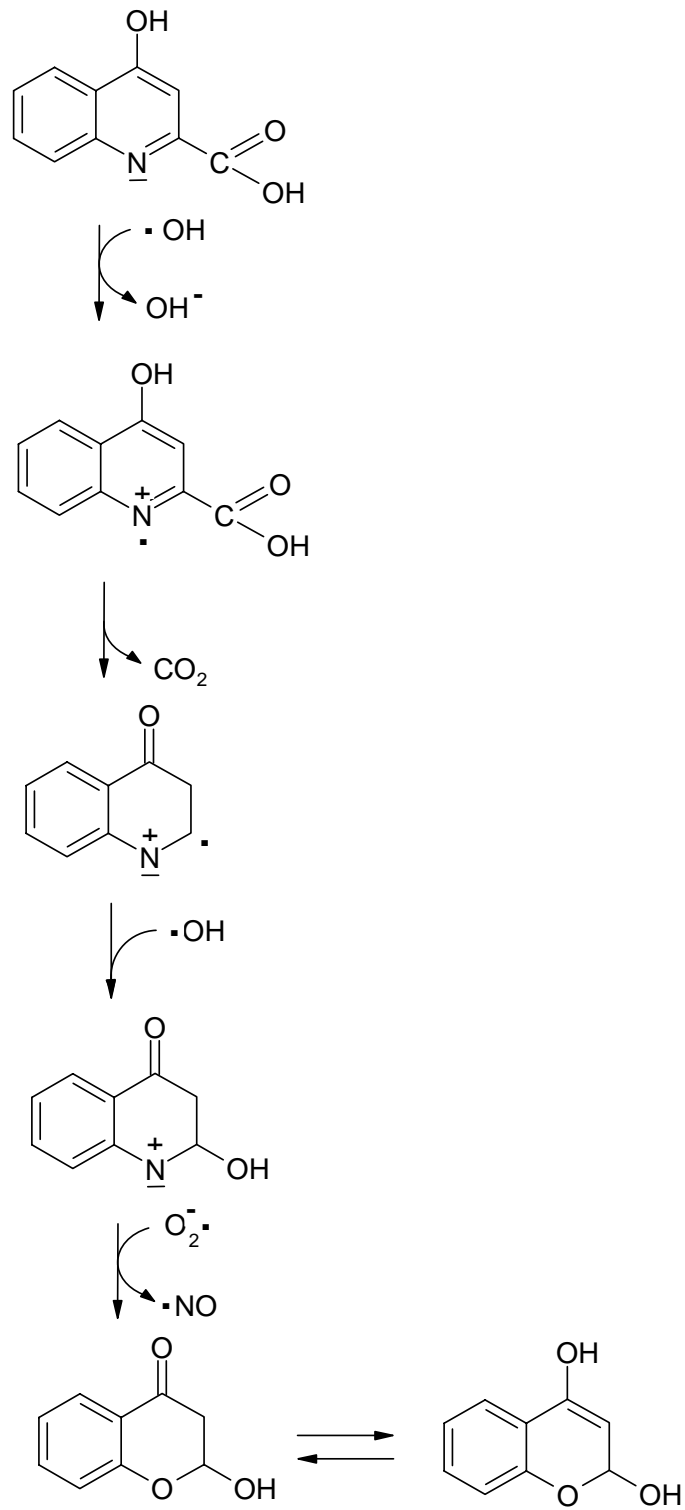


Abb. 73: Modell des radikalischen Oxidationsmechanismus der Kynurensäure.

Wie in diesem Modell dargestellt, würde die finale Interaktion bei der Kynurensäure-Oxidation mit einem Superoxidanion erfolgen, ein Prozeß, welcher für die Chemilumineszenz erforderlich sein dürfte. Da das letzte Intermediat zwar ein mesomeriestabilisiertes Kation darstellt, jedoch kein Radikal, könnte es eine längere Halblebenszeit besitzen, die für die beobachteten langsamen Anstiege der Chemilumineszenz bedeutsam wäre.

Selbst wenn man Varianten des vorgeschlagenen Reaktionsschemas annehmen wollte, so würde doch in jedem Fall die oxidative Eliminierung des Stickstoffs erforderlich sein und daher mit hoher Wahrscheinlichkeit NO \cdot -Freisetzung stattfinden. Folglich unterscheidet sich der Mechanismus des Radikalfanges von Chinolinen wie Kynurensäure im letzten Reaktionsschritt prinzipiell von jenem der Indole, bei dem die finale Interaktion mit einem Superoxidanion über die Spaltung des Pyrrolringes verläuft und dessen Addition ohne NO \cdot -Freisetzung zu einer totalen Termination der Radikalkette führt. Zwei strukturell ähnliche Substanzklassen, Indole und Chinoline, beide zweiringige heterozyklische Aromaten, divergieren somit fundamental in einem die antioxidativen Eigenschaften betreffenden Punkt. Gleichwohl ist die Bilanz für die Kynurensäure-Oxidation noch immer positiv: Einem – nicht immer, aber mit gewisser Wahrscheinlichkeit – auf dem NO \cdot /Peroxynitrit-Wege gebildeten hochreaktiven Radikal stehen zwei gefangene Hydroxylradikale und ein gefangenes Superoxidanion gegenüber.

5. Zusammenfassung

Der Tryptophan-Metabolit Kynurensäure (= 4-Hydroxychinolin-2-carboxylsäure) gilt als zellprotektive, im speziellen auch neuroprotektive Substanz, deren Schutzwirkung teils auf rezeptormediierte, zum anderen Teil aber auch auf antioxidative Effekte zurückgeführt wird. In der vorliegenden Arbeit wurde der oxidative Metabolismus der Kynurensäure – hinsichtlich Bildung wie auch Abbau – unter Berücksichtigung enzymatischer ebenso wie nicht-enzymatischer, vor allem radikalischer Reaktionsschritte untersucht. Hierbei wurden zwei experimentelle Konzepte zugrunde gelegt. Zum einen wurde ein einzelliger Modellorganismus eingesetzt, der photoautotrophe Dinoflagellat *Lingulodinium polyedrum*, der in sich zwei Vorteile vereint: eine gute Aufnahme der metabolischen Vorstufen und die Möglichkeit, lichtabhängig einen hohen oxidativen Druck zu erzeugen, der einen starken nicht-enzymatischen oxidativen Umsatz erwarten läßt. Zum anderen wurden diverse chemische Systeme verwendet, um die Interaktionen mit freien Radikalen zu charakterisieren.

Die Bildung von Kynurensäure wurde bei *L. polyedrum* anhand zweier Enzyme verfolgt, der L-Kynurenin:2-Oxoglutarat-Aminotransferase, die Kynurensäure direkt generiert, und der L-Tryptophan:2-Oxoglutarat-Aminotransferase, deren Produkt Indol-3-pyruvat durch reaktive Sauerstoffspezies in Kynurensäure überführt werden kann, ferner durch Messung der Freisetzung ins Medium nach Inkubation der Zellen mit L-Kynurenin. Beide Enzyme zeigen nennenswerte Aktivitäten in einer Größenordnung wie bei Säugergeweben und weisen bimodale tagesperiodische Muster auf, die sich voneinander und von dem der L-Tyrosin:2-Oxoglutarat-Aminotransferase unterscheiden; sie stellen somit nicht ein einziges multisubstratspezifisches Enzym dar. Die Rhythmik der L-Tryptophan:2-Oxoglutarat-Aminotransferase enthält eine endogene Komponente, wird von Melatonin nicht beeinflusst, jedoch, phasenabhängig in Ausmaß und Richtung, vom Substrat Tryptophan.

Bei Messung der Kynurensäure-Freisetzung im Licht liegen die Enzymaktivitäten ca. eine Größenordnung unter den Freisetzungsraten, können diese also nicht erklären.

Freisetzung und demnach offenbar auch Bildung sind in hohem Maße lichtabhängig, zeigen eine weitgehend exogene Tagesrhythmik und steigen im Dauerlicht weiter an als im Hell-Dunkel-Wechsel. In belichteten Homogenaten wird die Kynurensäure-Bildung durch CCCP und Paraquat erhöht, durch DCMU erniedrigt. Diese offenkundige Beziehung zur Photosynthese legt eine Generierung durch Oxidantien aus den Photosystemen nahe. In diesem Zusammenhang konnte ein neuer Stoffwechselweg der Kynurensäure-Synthese aus Kynurenin identifiziert werden: Eine für den Wasserstoffdonor unspezifische Hämoperoxidase vermag in Gegenwart von H_2O_2 Kynurensäure zu bilden; mit geringerer Rate ist eine solche Reaktion bereits mit H_2O_2 in Abwesenheit vom Enzym möglich, also energetisch begünstigt.

Analog zu der Bildung von Kynurensäure aus Kynurenin wurde der Umsatz von 3-Hydroxykynurenin zu Xanthurensäure bei *L. polyedrum* untersucht. Auch ohne Inkubation mit der Vorstufe waren diese wie auch die Xanthurensäure durch HPLC mit ECD nachweisbar. Die Zellen zeigten eine hohe Kapazität zur Aufnahme und zum Umsatz der Vorstufe. Auch hier war der Umsatz lichtabhängig, doch nicht in dem starken Maße wie bei der Kynurensäure. Neben Xanthurensäure traten in den HPLC-Chromatogrammen mindestens ein, manchmal auch zwei weitere Produkte auf, was mit dem an dieser Stelle üblicherweise verzweigenden Stoffwechsel in Einklang steht.

3-Hydroxykynurenin und/oder Folgeprodukte können bei *L. polyedrum* oxidativen Stress erzeugen jedoch erst bei hohen Konzentrationen. Anhand des Biolumineszenzverhaltens des Dinoflagellaten ließen sich Dosierungen für moderaten und hohen, subletalen oxidativen Stress bestimmen sowie die Phasen ihres Auftretens.

Eigenschaften und Spezifität des Fangens freier Radikale wurden anhand folgender Systeme untersucht: (1) einem Kompetitionstest mit ABTS, der das Fangen von Hydroxylradikalen wiedergibt; (2) einem ABTS-Kationradikal-Reduktionstest, der Einelektronentransferreaktionen mit mesomeriestabilisierten organischen Radikalen reflektiert, (3) einem Hämatoxylinautoxidationstest, der das Fangen von Superoxidanionen mißt, (4) einem schwach alkalischen H_2O_2 -System, das in Gegenwart und Abwesenheit von Hämin als Katalysator eingesetzt wurde und sich sowohl für Messungen der radikalabhängigen Chemilumineszenz wie auch nachfolgender Produktanalyse eignet; die Chemilumineszenz wurde des weiteren dafür herangezogen, Kompetitionstudien mit Radikalfängern bekannter Spezifität durchzuführen.

Die Kynurensäure-Vorstufe Indol-3-pyruvat besitzt eine hinreichend hohe Reaktivität, um nicht nur Hydroxyl- und ABTS-Kationradikale, sondern auch Superoxidanionen ohne zusätzliche Katalyse zu fangen. Die Chemilumineszenz in Gegenwart der kompetierenden Radikalfänger DMSO und Tiron zeigt, daß zwei Reaktionen nebeneinander ablaufen, die zur Bildung lumineszenter Emitter führen; einer von diesen ist abhängig von Hydroxylradikalen, der andere, von diesen unabhängige, beruht auf der Hämin-katalysierten Interaktion mit Superoxidanionen. In diesem System ließ sich das Produkt Kynurensäure nachweisen.

Kynurensäure erwies sich als Hydroxylradikalfänger, jedoch ohne besonders auffällige Reaktivität. ABTS-Kationradikale vermochte die Kynurensäure nur wenig effizient zu fangen, desgleichen Superoxidanionen in Abwesenheit eines Katalysators. Die Chemilumineszenzstudien zeigten, daß die Emitterbildung weitgehend von der Interaktion mit Hydroxylradikalen abhängig ist, daß anschließend jedoch von einem Intermediat Superoxidanionen gefangen werden können.

Vergleiche mit den Strukturanaloga 4-Hydroxychinolin und Chinaldinsäure ergaben, daß sowohl die Carboxylgruppe als auch der 4-Hydroxylrest für die Eigenschaften als Radikalfänger und als Luminophoren entscheidend sind. Überraschenderweise besaß Chinaldinsäure jedoch die Fähigkeit, ABTS-Kationradikale zu reduzieren, obwohl sie als Hydroxylradikalfänger ineffizient war. Das weitere Struktur Analogon Xanthurensäure zeigte aufgrund der zusätzlichen Hydroxylgruppe eine vergleichsweise höhere Reaktivität als Kynurensäure. Sie erwies sich als ein potenter Fänger von Hydroxyl- und ABTS-Kationradikalen sowie von Superoxidanionen. Die Chemilumineszenz bei der Oxidation von Kynurensäure, 4-Hydroxychinolin, aber mehr noch von Xanthurensäure fiel durch ungewöhnlich lange Dauer, verbunden mit langsamen Anstiegen, auf, die die Bildung stabiler Zwischenprodukte nahelegen. Bei den verwendeten Konzentrationen war im Falle der Xanthurensäure der Anstieg der Lichtemission nach einem Tag Reaktionszeit noch nicht abgeschlossen, ein Befund ohne vergleichbare Parallele in der Literatur.

Für die Bildung eines isolierten und weiteranalytierten Hauptprodukts aus der Kynurensäure-Oxidation wird ein Mechanismus vorgeschlagen, bei dem zwei Hydroxylradikale und ein Superoxidanion gefangen sowie ein Stickstoffmonoxid freigesetzt werden.

Das Produkt wäre ein 2-Hydroxychromanon bzw. dessen Tautomer 2,4-Dihydroxychromen.

Die antioxidative Wirkung von Kynurensäure wurde, im Vergleich zum indolischen Radikalfänger Melatonin, anhand der Hemmung der 2-Desoxyribose-Destruktion in einem System nachgewiesen, das auf der kontinuierlichen Generierung von Hydroxylradikalen durch Belichtung von N-Hydroxy-2-pyridinthion beruht. Xanthurensäure erwies sich in diesem System als noch wesentlich potenter.

In einem entsprechenden photokatalytischen System auf der Basis von δ -Aminolävulinsäure (ALA) verhielt sich Kynurensäure jedoch stark prooxidativ, ein Effekt, der in geringerem Maße bereits im Dunkeln auftrat und mit den einzelnen Substanzen bei diesem Reaktionsansatz nicht gefunden wurde. Das prooxidative Verhalten der Kombination von Kynurensäure und ALA ist von potentieller Bedeutung bei Porphyrien.

6. Literaturverzeichnis

Alberati-Giani, D., Ricciardi-Castagnoli, P., Köhler, C. & Cesura, A.M. (1996): Regulation of the kynurenine pathway by IFN- γ in murine cloned macrophages and microglial cells. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*, Vol. 398 'Recent Advances in Tryptophan Research. Tryptophan and Serotonin Pathways' (ed. by Allegri Filippini, G., Costa, C.V.L. & Bertazzo, A.), Plenum, N.Y.-Lond., pp. 171-175.

Antolín, I. & Hardeland, R. (1997): Suppression of the *Gonyaulax* glow peak by paraquat and its restoration by melatonin. In: *Biological Rhythms and Antioxidative Protection* (ed. by Hardeland, R.), 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.

Atsumi, S. & Hayashi, T. (1979): Examination of the pronounced increase in auxin content of senescent leaves. *Plant Cell Physiol.*, 20:861-865.

Balzer, I. & Hardeland, R. (1991a): Circadian variations in the effects of epinephrine, kynuramine and potential MAO inhibitors on bioluminescence of *Gonyaulax*. In: *Chronobiology & Chronomedicine* (ed. by Surowiak, J. & Lewandowski, M.H.), Lang, Frankf./M. - Bern - N.Y. - Paris, pp. 16-22.

Balzer, I. & Hardeland, R. (1991b): Stimulation of bioluminescence by 5-methoxylated indoleamines in the dinoflagellate, *Gonyaulax polyedra*. *Comp. Biochem. Physiol.* 98C:395-397.

Beckman, J.S., Beckman, T.W., Chen, J., Marshall, P.A. & Freeman, B.A. (1990): Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: Implications of endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:1620-1624.

Behrmann, G. & Hardeland, R. (1996): Kynuric metabolism in *Gonyaulax polyedra*. In: Metabolism and Cellular Dynamics of Indoles (ed. by Hardeland, R.), Univ. of Göttingen, Göttingen, pp. 81-84.

Blanchard, B., Pompon, D. & Ducrocq C. (2000): Nitrosation of melatonin by nitric oxide and peroxyxynitrite. *J. Pineal Res.*, 29:184-192.

Boivin, J., Crepon, E. & Zard, S.Z. (1990): N-Hydroxy-2-pyridinethione: a mild and convenient source of hydroxyl radicals. *Tetrahedron Lett.*, 31:6869-6872.

Bucknall, T., Edwards, H.E., Kemsley, K.G., Moore, J.S. & Phillips, G.O. (1978): The formation of malonaldehyde in irradiated carbohydrates. *Carbohydr. Res.*, 62:49-59.

Burkhardt, S., Antolín, I., Hardeland, R., Fuhrberg, B. & Poeggeler, B. (1998): 5-Methoxytryptamin is required for the *Gonyaulax glow maximum*. *J. Biolum. Chemilum.*13, 204.

Burkhardt, S., Coto-Montes, A. & Hardeland, R. (1999): The catalase inhibitor 3-amino-1,2,4-triazole has side effects as a scavenger of superoxide anions. In: Studies on Antioxidants and their Metabolites (ed. by Hardeland, R.), Cuvillier, Göttingen, pp. 127-128.

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., Hardeland, R. & Balzer, I. (1995): Effects of 5-hydroxytryptophan on bioluminescence in *Gonyaulax polyedra*. In: Cellular Rhythms and Indolamines (ed. by Hardeland, R.), Univ. of Göttingen, Göttingen, pp. 28-32.

Burkhardt, S., Sommer, M.-N. & Hardeland, R. (1997): Protective enzymes in *Gonyualax polyedra*: Demonstration of glutathion S-transferase and measurements of superoxide dismutase by a procedure not affected by cytochrome oxidase. In: Biological Rhythms and Antioxidative Protection (ed. by Hardeland, R.), Cuvillier, Göttingen, pp. 19-22.

Ceballos-Picot, I., Nicole, A. & Sinet, P.-M. (1992): Cellular clones and transgenic mice overexpressing copper-zinc superoxide dismutase: Models for the study of free radicals metabolism and aging. In Free Radicals and Aging. (ed. by Emerit, I. & Chance, B.), Birkhaeuser Verlag, Basel, pp. 89-98.

Chance, B. & Maehly, A.C. (1968): Plant peroxidase. In: Biochemists' Handbook (ed. by Long, C., King, E.J. & Sperry, W.M.), E. & F. N. Spon Ltd., London, pp. 384-385.

Christen, H. R. & Vögtle, F. (1989): Grundlagen der organischen Chemie. Otto Salle Verlag, Frankf./M. - Hamburg.

Cini, M., Bormetti, R., Marconi, M., Molinari, A., Veneroni, O., Varasi, M., Schwarcz, R & Speciale, C. (1996): 28833, a selective kynurenine 3-hydroxylase inhibitor. Effects on the kynurenine pathway metabolites in the gerbil. In: Advances in Experimental Medicine and Biology, Vol. 398 'Recent Advances in Tryptophan Research. Tryptophan and Serotonin Pathways' (ed. by Allegri Filippini, G., Costa, C.V.L. & Bertazzo, A.), Plenum, N.Y.-Lond., pp. 535-538.

Cooper, W.J. & Zika, R.G. (1983): Photochemical formation of hydrogen peroxide in surface and ground waters exposed to sunlight. Science, 220:711-712.

Costantino, G., Mattoli, L., Moroni, F., Natalini, B. & Pellicciari, R. (1996): Kynurenine-3-hydroxylase and its selective inhibitors. Molecular modeling studies. In: Advances in Experimental Medicine and Biology, Vol. 398 'Recent Advances in Tryptophan Research. Tryptophan and Serotonin Pathways' (ed. by Allegri Filippini, G., Costa, C.V.L. & Bertazzo, A.), Plenum, N.Y.-Lond., pp. 493-497.

Douki, T., Medeiros, M.H.G., Bechara, E.J.H., Cadet, J. & Di Mascio, P. (1998): hydroxyl radicals are involved in the oxidation of isolated and cellular DNA bases by 5-aminolevulinic acid. *FEBS Lett.*, 428:93-96.

Elstner, E.F. (1990):

Der Sauerstoff: Biochemie, Biologie, Medizin. Bi-Wissenschaftsverlag, Mannheim.

Ferrario, R.G., Barattè, S., Speciale, C. & Salvati, P. (1996): Kynurenine enzymatic pathway in human monocytes-macrophages. Effect of interferon- γ activation. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*, Vol. 398 'Recent Advances in Tryptophan Research. Tryptophan and Serotonin Pathways' (ed. by Allegri Filippini, G., Costa, C.V.L. & Bertazzo, A.), Plenum, N.Y.-Lond., pp. 167-170.

Fischer-Nielsen, A., Poulsen, H.E. & Loft, S. (1992): 8-Hydroxydeoxyguanosine in vitro: Effects of glutathione, ascorbate, and 5-aminosalicylic acid. *Free Radic. Biol. Med.*, 13:121-126.

Fuhrberg, B. & Hardeland, R. (1994a): Oxidation of melatonin by free radicals: Catalysis by hemin. In: *Cell Biological Problems in Chronobiology* (ed. by Hardeland, R.), Univ. of Göttingen, Göttingen, pp. 75-81.

Fuhrberg, B. & Hardeland, R. (1994b): The non-enzymatic cleavage of the pyrrole ring of indols. In: *Cell Biological Problems in Chronobiology* (ed. by Hardeland, R.), Univ. of Göttingen, Göttingen, pp. 82-88.

Giordani, A., Corti, L., Cini, M., Marconi, M., Pillan, A., Ferrario, R., Schwarcz, R., Guidetti, P., Speciale, C. & Varasi, M. (1996): Benzoylalanine analogues as inhibitors of rat brain kynureninase and kynurenine 3-hydroxylase. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*, Vol. 398 'Recent Advances in Tryptophan Research. Tryptophan and Serotonin Pathways' (ed. by Allegri Filippini, G., Costa, C.V.L. & Bertazzo, A.), Plenum, N.Y.-Lond., pp. 499-505.

Giusti, P., Franceschini, D., Petrone, M., Manev, H. & Floreani, M. (1996): *In vitro* and *in vivo* protection against kainate-induced excitotoxicity by melatonin. *J. Pineal Res.*, 20:226-231.

Goda, K., Hamane, Y., Kishimoto, R. & Ogishi, Y. (1999): Radical scavenging properties of tryptophan metabolites. Estimation of their radical reactivity. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*, Vol 467 'Tryptophan, Serotonin and Melatonin. Basic Aspects and Applications' (ed. by Huether, G., Kochen, W., Simat, T.J. & Steinhart, H.), Plenum, New York, pp. 397-402.

Goda, K., Kishimoto, R., Shimizu, S., Hamane, Y. & Ueda, M. (1996): Quinolinic acid and reactive oxygen species. Possible contribution of active oxygens during cell death in the brain. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*, Vol. 398 'Recent Advances in Tryptophan Research. Tryptophan and Serotonin Pathways' (ed. by Allegri Filippini, G., Costa, C.V.L. & Bertazzo, A.), Plenum, N.Y.-Lond., pp. 247-254.

Groß, I., Hardeland, R. & Wolf, R. (1994): Circadian rhythm of tyrosine aminotransferase activity in *Gonyaulax polyedra*. *Biol. Rhythm Res.* 25:51-58.

Guidetti, P., Okuno, E. & Schwarcz, R. (1997): Characterization of rat brain kynurenine aminotransferases I and II. *J. Neurosci. Res.*, 50:457-465.

Gutteridge, J.M.C. (1981): Thiobarbituric acid-reactivity following iron-dependent free-radical damage to amino acids and carbohydrates. *FEBS Lett.*, 128:343-346.

Gutteridge, J.M.C. (1987): Ferrous-salt-promoted damage to deoxyribose and benzoate. *Biochem. J.*, 243:709-714.

Haldar, C., Hardeland, R. & Böker, J. (1999): Oxidation of 5-methoxytryptophol by free radicals: Scavenger competition and chemiluminescence studies. In: *Studies on Antioxidants and their Metabolites* (ed. by Hardeland, R.), Cuvillier, Göttingen, pp. 99-109.

Hall, E.D., Andrus, P.K., Yonkers, P.A., Smith, S.L., Zhang, J.-R., Taylor, B.M. & Sun, F.F. (1994): Generation and detection of hydroxyl radical following experimental head injury. *The Neurobiology of NO \cdot and \cdot OH* (ed. by Chiueh, C.C., Gilbert, D.L. & Colton, C.A.). The New York Academy of Sciences, New York, pp. 15-24.

Halliwell, B. & Gutteridge, J.M.C. (1981): Formation of a thiobarbituric-acid-reactive substance from deoxyribose in the presence of iron salts. The role of superoxide and hydroxyl radicals. *FEBS Lett.*, 128:347-352.

Halliwell, B. & Gutteridge, J.M.C. (1999): *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3rd Edition. Oxford University Press, New York – Oxford.

Hardeland, R. (1969): Circadiane Rhythmik und Regulation von Enzymen des Tryptophan-Stoffwechsels in Rattenleber und -niere. *Z. Vergl. Physiol.*, 63:119-136.

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 unicellulars. *Experientia*, 49:614-622.

Hardeland, R. & Balzer, I. (1993): Chronobiology in unicells: Multiplicity of frequencies, non-oscillatory states, photoperiodism and effects of biogenic amines. In: *Trends in Comparative Biochemistry and Physiology*, Vol. 1, Research Trends, Trivandrum, pp. 71-87.

Hardeland, R., Coto-Montes, A., Burkhardt, S. & Zsizsik, B.K. (2000): Circadian rhythms and oxidative stress in non-vertebrate organisms. In: *The Redox State and Circadian Rhythms* (ed. by Vanden Driessche, Th., Guisset, J.-L. & Petiau-de Vries, Gh., eds.), Kluwer, Dordrecht – Boston – Lond., pp. 121-140.

Hardeland, R., Burkhardt, S., Antolín, I., Fuhrberg, B. & Coto-Montes, A. (1999a): Melatonin and 5-methoxytryptamine in the bioluminescent dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*. Restoration of the circadian glow peak after suppression of indolamine biosynthesis or oxidative stress. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*, Vol. 460: 'Melatonin after four decades. An Assessment of Its Potential.' (ed. by Olcese, J.), Plenum, New York, pp. 387-390.

Hardeland, R. & Fuhrberg, B. (1996): Ubiquitous melatonin – Presence and effects in unicells, plants and animals. In: *Trends in Comparative Biochemistry and Physiology*, Vol. 7, Research Trends, Trivandrum, pp. 25-45.

Hardeland, R., Fuhrberg, B., Burkhardt, S., Poeggeler, B. & Lax, P. (1997a): Aryl acylamidase and tryptophan hydroxylase, two key enzymes of 5-methoxytryptamine formation in the dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*, are regulated by a circadian oscillator, by melatonin and by temperature. In: *Biometeorology 14, Pt. 2., Vol. 2* (ed. by Hocevar, A., Crepinsek, Z & Kajfez-Bogataj, L.), Int. Soc. Biometeorol., Ljubljana, pp. 278-285.

Hardeland, R., Fuhrberg, B., Zsizsik, B.K. & Poeggeler, B. (1997b): Chemiluminescence as a tool for monitoring the oxidation of indolic and quinaldic radical scavengers. *Eur. J. Clin. Chem. Biochem.*, 35:A108.

Hardeland, R., Pöggeler, B., Behrmann, G. & Fuhrberg, B. (1996): Enzymatic and non-enzymatic metabolism of methoxyindoles. In: *Metabolism and Cellular Dynamics of Methoxyindoles* (ed. by Hardeland, R.), Univ. of Göttingen, Göttingen, pp. 6-22.

Hardeland, R., Reiter, R.J., 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. Wendler, J., Holst, S. & Zsizsik, B.K. (1999b): On the use of 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) [ABTS] in studies on free radicals: Limitations of test systems for inhibition of cation radical formation and for cation radical reduction. In: *Studies on Antioxidants and their Metabolites* (ed. by Hardeland, R.), Cuvillier, Göttingen, pp. 35-37.

Hardeland, R. & Zsizsik, B.K. (1997a): Formation of two free radical scavengers, indole-3-pyruvic acid and kynurenic acid, in *Gonyaulax polyedra*. In: *Biological Rhythms and Antioxidative Protection* (ed. by Hardeland, R.), Cuvillier, Göttingen, pp. 23-27.

Hardeland, R. & Zsizsik, B.K. (1997b): Kynurenic acid as a free radical scavenger: measurements of educt and product fluorescence and of light emission from an excited intermediate state. In: *Biological Rhythms and Antioxidative Protection* (ed. by Hardeland, R.), Cuvillier, Göttingen, pp. 153-160.

Hardeland, R., Zsizsik, B.K., Poeggeler, B., Fuhrberg, B., Holst, S. & Coto-Montes, A. (1999c): Indole-3-pyruvic and -propionic acids, kynurenic acid and related metabolites as luminophores and free-radical scavengers. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology, Vol 467 'Tryptophan, Serotonin and Melatonin. Basic Aspects and Applications'* (ed. by Huether, G., Kochen, W., Simat, T.J. & Steinhart, H.), Plenum, New York, pp. 389-395.

Harding, L.W., Meeson, B.W., Prézelin, B.B. & Sweeney, B.M. (1981): Diel periodicity of photosynthesis in marine phytoplankton. *Mar. Biol.*, 61:95-105.

Hastings, J.W.JR., Astrachan, L. & Sweeney, B.M. (1961): A persistent daily rhythm in photosynthesis. *J. Gen. Physiol.*, 45:69-76.

Hayaishi, O. (1976): Properties and function of indoleamine 2,3-dioxygenase. *J. Biochem.*, 79:13-21.

Hayaishi, O. & Yoshida, R. (1979): Rhythms and physiological significance of indoleamine 2,3-dioxygenase. In: *Biological Rhythms and their Central Mechanism* (ed. by Suda, M., Hayaishi, O. & Nakagawa, H.), Elsevier/North Holland, Amsterd. – N.Y. – Oxford, pp. 133-141.

Hayakawa, M., Hattori, K., Sugiyama, S. & Ozawa, T. (1992): Age-associated oxygen damage and mutations in mitochondrial DNA in human hearts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 189:979-985.

Hermes-Lima, M. (1995): How do Ca^{2+} and 5-aminolevulinic acid-derived oxyradicals promote injury to isolated mitochondria? *Free Radic. Biol. Med.*, 19:381-390.

Hermes-Lima, M., Castilho, R.F., Valle, V.G.R., Bechara, E.J.H. & Vercesi, A.E. (1992): Calcium-dependent mitochondrial oxidative damage promoted by δ -aminolevulinic acid. *Biochim. Biophys. Acta* 1180:201-206.

Hermes-Lima, M., Valle, V.G.R., Vercesi, A.E. & Bechara, E.J.H. (1991): Damage to the rat liver mitochondria promoted by δ -aminolevulinic acid-generated reactive oxygen species: connections with acute intermittent porphyria and lead-poisoning. *Biochim. Biophys. Acta*, 1056:57-63.

Hess, K.M. & Dix, T.A. (1992): Evaluation of N-hydroxy-2-thiopyridone as a nonmetal dependent source of the hydroxyl radical in aqueous systems. *Anal. Biochem.*, 206:309-314.

Hiraku, Y & Kawanishi, S. (1996): Mechanism of oxidative DNA damage induced by delta-aminolevulinic acid in the presence of cooper ion. *Cancer. Res.*, 56:1786-1793.

Hoffmann, B. & Hardeland, R. (1985): Membrane fluidization by propanolol, tetracaine, and 1-aminoadamantane in the dinoflagellate, *Gonyaulax polyedra*. Comp. Biochem. Physiol., 81C:39-43.

Huang, H., Jemal, A., David, C., Barker, S.A., Swenson, D.H. & Means, J.C. (1998): Analysis of DNA adduct, S-[2- (N7-guanyl) ethyl] glutathione, by liquid chromatography / tandem mass spectrometry. Anal. Biochem., 265:139-150.

Kaur, H., Whiteman, M. & Halliwell, B. (1997): Peroxynitrite-dependent aromatic hydroxylation and nitration of salicylate and phenylalanine. Is hydroxyl radical involved? Free Rad. Res., 26:71-82.

Kelly, R.W., Amato, F. & Seamark, R.F. (1984): N-Acetyl-5-methoxy kynurenamine, a brain metabolite of melatonin, is a potent inhibitor of prostaglandin biosynthesis. Biochem. Biophys. Res. Commun. 121:372-379.

Krasnow, R., Dunlap, J., Taylor, W., Vetterling, W. & Haas, E. (1981): Measurement of *Gonyaulax* bioluminescence including that of single cells. In: Bioluminescence – Current Perspectives (ed. by Nealson, K.H.) Burgess, Minneapolis, MN, pp. 52-63.

Land, E.J. & Swallow, A.J. (1971): One-electron reactions in biochemical systems as studied by pulse radiolysis. IV. Oxidation of dihydronicotinamide-adenine dinucleotide. Biochim. Biophys. Acta, 234:34-42.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193:265-275.

MacKenzie, C.R., González, R.G., Kniep, E., Roch, S. & Däubener, W. (1999): Cytokine mediated regulation of interferon-gamma-induced IDO activation. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*, Vol 467 'Tryptophan, Serotonin and Melatonin. Basic Aspects and Applications' (ed. by Huether, G., Kochen, W., Simat, T.J. & Steinhart, H.), Plenum, New York, pp. 533-539.

Marler, J.E. (1966): Occurrence of hydrogen peroxide in seawater. *Nature*, 211:951.

Martin, J.P., Dailey, M. & Sugarman, E. (1987): Negative and positive assays of superoxide dismutase based on hematoxylin autoxidation. *Arch. Biochem. Biophys.*, 255:329-336.

Medeiros, M.H.G., Marchiori, P.E. & Bechara, E.J.H. (1982): Superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase activities in the erythrocytes of patients with intermittent acute porphyria. *Clin. Chem.*, 28:242-243.

Messner, K.R. & Imlay, J.A. (1999): The identification of primary sites of superoxide and hydrogen peroxide formation in the aerobic respiratory chain and sulfite reductase complex of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 274:10119-10128.

Monterio, H.P., Abdalla, D.S., Augusto, O. & Bechara E.J.H. (1989): Free radical generation during delta-aminolevulinic acid autoxidation: induction by hemoglobin and connections with porphyriopathies. *Arch. Biochem. Biophys.*, 271:206-216.

Moroni, F., Carpenedo, R. & Chiarugi, A. (1996): Kynurenine hydroxylase and kynureninase inhibitors as tool to study the role of kynurenine metabolites in the central nervous system. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*, Vol. 398 'Recent Advances in Tryptophan Research. Tryptophan and Serotonin Pathways' (ed. by Allegri Filippini, G., Costa, C.V.L. & Bertazzo, A.), Plenum, New York, pp. 203-210.

Moroni, F., Cozzi, A., Peruginelli, F., Carpenedo, R. & Pellegrini-Giampietro, E. (1999): Neuroprotective effects of kynurenine-3-hydroxylase inhibitors in models of brain ischemia. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*, Vol 467 'Tryptophan, Serotonin and Melatonin. Basic Aspects and Applications' (ed. by Huether, G., Kochen, W., Simat, T.J. & Steinhart, H.), Plenum, New York, pp. 199-206.

Mueller, U. & Hardeland, R. (1999a): Transient accumulations of exogenous melatonin indicate binding sites in the dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*. In: *Studies on Antioxidants and their Metabolites* (ed. by Hardeland, R.), Cuvillier, Göttingen, pp. 140-147.

Mueller, U. & Hardeland, R. (1999b): Methoxyindoles in *Gonyaulax*: Marked intracellular accumulations of exogenous 5-methoxytryptamine and *N,N*-dimethyl-5-methoxytryptamine, formation and release of 5-methoxyindole-3-acetic acid. Implications for previous interpretations. In: *Studies on Antioxidants and their Metabolites* (ed. by Hardeland, R.), Cuvillier, Göttingen, pp. 148-161.

Mueller, U. & Hardeland, R., Fuhrberg, B. & Poeggeler, B. (2000): Accumulation and metabolism of 5-methoxylated indoleamines in the dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*. *Eur. J. Cell. Biol.* 79, Suppl. 50, 98.

Nery, A.L.P., Catalani, L.H., Röpke, S., Nunes, G.I.P. & Baader, W.J. (1999): Intramolecular electron transfer catalyzed 1,2-dioxetane decomposition. In: *Bioluminescence and Chemiluminescence* (ed. by Roda, A., Pazzagli, M., Kricka, L.J. & Stanley, P.E.). John Wiley & Sons, Chichester – New York – Weinheim – Brisbane – Singapore – Toronto, pp. 45-48.

Ogasawara, N. (1962): Studies on kynurenine transaminase, kynureninase, and the increase of xanthurenic acid excretion. *J. Biochem (Tokyo)*, 52:162-166.

Okuno, E., Nakamura, M. & Schwarcz, R. (1991): Two kynurenine aminotransferases in human brain. *Brain Res.*, 542:307-312.

Pape, C. & Hardeland, R. (1999a): Detoxification of hydrogen peroxide in *Gonyaulax polyedra*: Remarkable capacity for elimination of exogenous H₂O₂ and differences between cells kept in constant light and constant darkness. In: Studies on Antioxidants and their Metabolites (ed. by Hardeland, R.), Cuvillier, Göttingen, pp. 28-34.

Pape, C. & Hardeland, R. (1999b): Diurnal rhythm of hydrogen peroxide release by *Gonyaulax polyedra*. In: Studies on Antioxidants and their Metabolites (ed. by Hardeland, R.), Cuvillier, Göttingen, pp. 14-22.

Pellegrini-Giampietro, D.E., Cherici, E.G., Alesiani, M., Carla, V. & Moroni, F. (1990): Excitatory amino acid release and free radical formation may cooperate in the genesis of ischemia-induced neuronal damage. *J. Neurosci.*, 10:1035-1042.

Perkins, M.N. & Stone, T.W. (1982): An iontophoretic investigation of the actions of convulsant kynurenines and their interaction with the endogenous excitant quinolinic acid. *Brain Res.*, 247:184.

Pöggeler, B. (1992): Vergleichende Untersuchungen über Melatonin und strukturverwandte Tryptophanmetabolite. Zur Rolle von Melatonin und 5-Methoxytryptamin bei einem Dinoflagellaten, *Gonyaulax polyedra*, sowie pinealen und extrapinealen 5-methoxylierten Indolaminen bei Vertebraten. Dissertation, 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., Reiter, R.J., Hardeland, R., Tan, D.-X. & Barlow-Walden, L.R. (1996): Melatonin and structurally-related, endogenous indoles act as potent electron donors and radical scavengers in vitro. *Redox Rep.*, 2:179-184.

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

Politi, V., D' Alessio, S., Di Stazio, G. & De Luca, G. (1996): Antioxidant properties of indole-3-pyruvic acid. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*, Vol. 398 'Recent Advances in Tryptophan Research. Tryptophan and Serotonin Pathways' (ed. by Allegri Filippini, G., Costa, C.V.L. & Bertazzo, A.), Plenum, New York, pp. 291-298.

Politi, V., Lavaggi, M.V., Di Stazio, G. & Margonelli, A. (1991): Indole-3-pyruvic acid as a direct precursor of kynurenic acid. In: 'Kynurenine and Serotonin Pathways. Progress in Tryptophan Research' (ed. by Schwarcz, R., Young, S.N. & Brown R.R.), Plenum, New York, pp. 515-518.

Prézelin, B.B. Meeson, B.W. & Sweeney, B.M. (1997): Characterization of photosynthetic rhythms in marine dinoflagellates; I Pigmentation, photosynthetic capacity and respiration. *Plant Physiol.*, 60:384-387.

Prézelin, B.B. & Sweeney, B.M. (1997): Characterization of photosynthetic rhythms in marine dinoflagellates; II. Photosynthesis-irradiance curves and *in vivo* chlorophyll a fluorescence. *Plant Physiol.*, 60:388-392.

Princ, F.G., Maxit, A.G., Cardalda, C., Batlle, A. & Juknat, A.A. (1998): In vivo protection by melatonin against δ -aminolevulinic acid-induced oxidative damage and its antioxidant effect on the activity of haem enzymes. *J. Pineal Res.*, 24:1-8.

Puttfarcken, P.S., Getz, R.L. & Coyle, J.T. (1993): Kainic acid induced lipid peroxidation. Protection with butylated hydroxy-toluene U7851F in primary cultures of cerebellar granule cells. *Brain Res.*, 642:223-232.

Rao, D.N. & Cederbaum, A.I. (1997): A comparative study of the redox-cycling of a quinone (rifamycin S) and a quinonimine (rifabutin) antibiotic by rat liver microsomes. *Free Radic. Biol. Med.*, 22:439-446.

Reinhard, J.F., Flanagan, E.M. & Flanagan, Jr. (1996): The neurotoxin quinolinic acid is increased in spinal cords of mice with herpes simplex virus encephalitis. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*, Vol. 398 'Recent Advances in Tryptophan Research. Tryptophan and Serotonin Pathways' (ed. by Allegri Filippini, G., Costa, C.V.L. & Bertazzo, A.), Plenum, N.Y.-Lond., pp. 241-246.

Reiter, R.J. (1998): Oxidative damage in the central nervous system: Protection by melatonin. *Prog. Neurobiol.* 56:359-384.

Reiter, R.J., Poeggeler, B., Tan, D.-X., Chen, L.-D., Manchester, L.C. & Guerrero, J.M. (1993): Antioxidant capacity of melatonin: a novel action not requiring a receptor. *Neuroendocrinol. Lett.*, 15:193-116.

Richardson, J.S., Zhou, Y. & Kumar, U. (1996): Free radicals in the neurotoxic actions of β -amyloid. In: *The Neurobiology of Alzheimer's Disease* (ed. by Wurtman, R.J., Corkin, S., Growdon, J.H. & Nitsch, R.M.), *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 777:362-367.

Roenneberg, T. & Rehman, J. (1996): Nitrate, a nonphotic signal for the circadian system. *FASEB J.*, 10:1443-7.

Russi, P., Carla, V. & Moroni, F. (1989): Indolepyruvic acid administration increases the brain content of kynurenic acid. Is this a new avenue to modulate excitatory aminoacid receptors in vivo? *Biochem. Pharmacol.*, 38:2405-2409.

Saito, K. & Heyes, M.P. (1996): Kynurenine pathway enzymes in brain. Properties of enzymes and regulation of quinolinic acid synthesis. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*, Vol. 398 'Recent Advances in Tryptophan Research. Tryptophan and Serotonin Pathways' (ed. by Allegri Filippini, G., Costa, C.V.L. & Bertazzo, A.), Plenum, N.Y.-Lond., pp. 485-492.

Saito, K., Seishima, M., Noma, A., Markey, S.P. & Heyes, M.P. (1996): Cytokine and drug modulation of kynurenine pathway metabolism by blood mononuclear cells. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*, Vol. 398 'Recent Advances in Tryptophan Research. Tryptophan and Serotonin Pathways' (ed. by Allegri Filippini, G., Costa, C.V.L. & Bertazzo, A.), Plenum, N.Y.-Lond., pp. 161-165.

Schröder-Lorenz, A. & Rensing, L. (1987): Circadian changes in protein-synthesis rate and protein phosphorylation in cell-free extracts of *Gonyaulax polyedra*. *Planta*, 170:7-13.

Shibata, K. (1988): Fluorimetric micro-determination of kynurenic acid, an endogenous blocker of neurotoxicity, by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 430:376-380.

Simic, M.G. (1992): The rate of DNA damage and aging. In: *Free Radicals and Aging* (ed. by Emerit, I. & Chance, B.), Birkhaeuser Verlag, pp. 20-30.

Smith, C.D., Carney, J.M., Tatsumo, T., Stadtman, E.R., Floyd, R.A. & Markesbery, W.R. (1992): Protein oxidation in aging brain. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 663:110-119.

Spear, N. & Aust, S.D. (1995): Hydroxylation of deoxyguanosine in DNA by copper and thiols. *Arch. Biochem. Biophys.*, 317:142-148.

Stone, T.W. (1993): Neuropharmacology of quinolinic and kynurenic acids. *Pharmacol. Rev.*, 45:309-379.

Schwarcz, R., Ceresoli-Borroni, G. & Guidetti, P. (1996): Kynurenine metabolism in the rat brain in vivo. Effect of acute excitotoxic insults. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*, Vol. 398 'Recent Advances in Tryptophan Research. Tryptophan and Serotonin Pathways' (ed. by Allegri Filippini, G., Costa, C.V.L. & Bertazzo, A.), Plenum, New York, pp. 211-219.

Schwarcz, R., Ceresoli-Borroni, G., Wu, H.-Q., Rassoulpour, A., Poeggeler, B., Hodgkins, P.S. & Guidetti, P. (1999): Modulation and function of kynurenic acid in the immature rat brain. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*, Vol 467 'Tryptophan, Serotonin and Melatonin. Basic Aspects and Applications' (ed. by Huether, G., Kochen, W., Simat, T.J. & Steinhart, H.), Plenum, New York, pp. 113-123.

Speciale, C., Cini, M., Wu, H.-Q., Salvati, P., Schwarcz, R., Molinari, A., Calabresi, M. & Varasi, M. (1996): Kynurenic acid-enhancing and anti-ischemic effects of the potent kynurenine 3-hydroxylase inhibitor FCE 28833 in rodents. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*, Vol. 398 'Recent Advances in Tryptophan Research. Tryptophan and Serotonin Pathways' (ed. by Allegri Filippini, G., Costa, C.V.L. & Bertazzo, A.), Plenum, New York, pp. 221-227.

Swartz, K.J., Matson, W.R., MacGarvey, U., Ryan, E.A. & Beal, M.F. (1990): Measurement of kynurenic acid in mammalian brain extracts and cerebrospinal fluid by high-performance liquid chromatography with fluorometric and coulometric electrode array detection. *Anal. Biochem.*, 185:363-376.

Sweeney, B.M. (1960): The photosynthetic rhythm in single cells of *Gonyaulax polyedra*. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 25:145-148.

Sweeney, B.M. (1979): Bright light does not immediately stop the circadian clock of *Gonyaulax*. *Plant Physiol.*, 64:341-344.

Sweeney, B.M. (1986): The loss of the circadian rhythm in photosynthesis in an old strain of *Gonyaulax polyedra*. *Plant Physiol.*, 80:978-981.

Taylor, M.W., Konan, V.K. & Yu, D. (1996): Tryptophan starvation is involved in human interferon-gamma mediated apoptosis. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*, Vol. 398 'Recent Advances in Tryptophan Research. Tryptophan and Serotonin Pathways' (ed. by Allegri Filippini, G., Costa, C.V.L. & Bertazzo, A.), Plenum, N.Y.-Lond., pp. 155-159.

Vercesi, A.E., Castilho, R.F., Meinicke, A.R., Valle, V.G.R., Hermes-Lima, M. & Bechara E.J.H. (1994): Oxidative damage of mitochondria induced by 5-aminolevulinic acid: role of Ca^{2+} and membrane protein thiols. *Biochim. Biophys. Acta*, 1188:86-92.

Wiss, O. (1953): Der enzymatische Abbau des Kynurenins und 3-Oxykynurenins im tierischen Organismus. *Hoppe-Seyler Z. physiol. Chem.*, 293:106.

Zinner, K., Casadei de Baptista, R. & Cilento, G. (1974): Indole-3-pyruvic acid as a potential luciferin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 61:889-898.

Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. R. Hardeland möchte ich mich für die intensive Betreuung und die vielfältigen Anregungen und zahlreichen Diskussionen bei der Anfertigung dieser Arbeit bedanken.

Herrn Prof. Dr. N. Elsner danke ich für die Übernahme des Korreferates.

Bei Frau J. Böker bedanke ich mich für ihre freundliche Unterstützung bei allen mit der Laborarbeit verbundenen Fragen und Problemen.

Für die freundliche Zusammenarbeit danke ich allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe, Ana Coto-Montes, Birgit Fuhrberg, Burkhard Pöggeler, Sandra Thürmann und Andreas Dose. Ein besonderer Dank gilt dabei Susanne Burkhardt und Markus Schönke für ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung.

Meinem Freund, Robert Grath, danke ich für seine Geduld und Unterstützung während der Anfertigung dieser Arbeit. Ein besonderer Dank geht an meine Familie, die mir das Studium ermöglicht und mich jederzeit unterstützt haben.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Familienname: Zsizsik
Vorname: Beate
Geboren am/in: 15. 08. 1969 in Szeged / Ungarn
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

1975-1983: Grundschule Moritz Zsigmond in Szeged
1983-1987: Allgemeinbildendes Gymnasium Tömörkeny Istvan in Szeged
1989-1990: Sonderlehrgang für Spätaussiedler in Göttingen
Juni 1990: Erhalt des Abiturs

Berufliche Ausbildung

1991-1998: Studium der Biologie an der Georg-August-Universität in Göttingen
Juli 1998: Erhalt des Diploms
1998-2001: Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Institut für Zoologie und Anthropologie der Universität Göttingen und Anfertigung der hier vorliegenden Dissertation