Rüdiger Hardeland

Melatonin, eine ubiquitäre Substanz. Vorkommen, Wirkungen und Metabolismus außerhalb seiner klassischen Rolle

Einleitung

Seit der Entdeckung von Melatonin als Hormon des Pinealorgans, seiner Wirkung der Aufhellung der Froschhaut durch Pigment-Konzentrierung in deren Melanocyten und seiner Strukturaufklärung (Lerner et al., 1958a,b, 1959) hat sich unsere Sicht von der Funktion dieser Substanz mehrfach beträchtlich gewandelt und vor allem erweitert. Eine substanzielle Rolle, die über die Pigmentierungseffekte weit hinaus ging, konnte dem Melatonin bald als Mediator der Information Dunkelheit zugewiesen werden: Seine circadiane Rhythmik von bemerkenswert hoher Amplitude in Pinealorgan und Zirkulation zeigt sowohl bei nachtaktiven als auch tagaktiven Wirbeltieren immer nur nächtliche Maxima. Vor allem bei Tieren mit ausgeprägter Saisonalität hängen Dauer und Höhe der nächtlichen hohen Spiegel von der Tageslänge ab (Arendt, 1985, 1986; Reiter, 1989, 1991a,b, 1993; Binkley, 1993). Vom Melatonin beeinflusst werden sowohl der circadiane Schrittmacher SCN (Suprachiasmatischer Nucleus; Liu et al., 1997; Reppert, 1997; Jin et al., 2003; Stehle et al., 2003) als auch weitere zentralnervöse Orte (Poirel et al., 2003) und viele periphere Organe, in denen Rezeptoren und andere Bindungsstellen für Melatonin zu finden sind (Zusf.: Hardeland, 1996a, 1997a; Poirel et al., 2003). Saisonal variierende Funktionen, z. B. solche der Reproduktion, des Winterschlafs und des Fellwechsels, sind zumindest bei einigen Säugern direkt vom Melatonin gesteuert (Arendt, 1986; Reiter, 1991c, 1993; Lerchl und Schlatt, 1993; Gauer et al., 1994; Hoffman und Reiter, 1965; Recio et al., 1998). Das Pinealhormon hat sich somit als Vermittler sowohl tages- als auch jahreszeitlicher Dunkelsignale erwiesen (Reiter, 1993).

Diese klassische Vorstellung von der Rolle des Melatonins erfuhr durch die Entdeckung extrapinealer Bildungsorte eine beträchtliche Erweiterung und es offenbarten sich zum Teil völlig neue Zusammenhänge. Ein Teil dieser Befunde mag noch als Variation desselben Themas erscheinen, insbesondere soweit die Rhythmen dieses Indolamins in Parietalorgan und Retina betroffen sind; in beiden Organen, ebenso wie das Pineal Ausstülpungen des Zwischenhirns, zeigt das Melatonin prominente nächtliche Maxima (Pang et al., 1980; Yu et al., 1981; Cahill und Besharse, 1990; Cahill, 1996; Iuvone, 1996; Iigo et al., 1997; Tosini und Menaker, 1998; Iuvone et al., 1999, 2002; Tosini, 2000; Tosini und Fukuhara, 2003; Falcon et al., 2003; Green, 2003; Ivanova und Iuvone, 2003); gleichwohl trägt offenbar nur bei Amphibien und manchen Fischen das retinale Melatonin nennenswert zu den zirkulierenden Spiegeln bei.

Weitere extrapineale Quellen des Melatonins fügen sich jedoch keineswegs zwanglos in dieses Bild ein. Für diverse Zellen, Organe oder Teile von diesen wurde die Bildung von Melatonin entweder nachgewiesen oder wenigstens begründet angenommen (Zusf.: Huether, 1993; Hardeland und Rodríguez, 1995; Hardeland, 1996a, 1997b). Nicht auf alle diese soll hier im Detail eingegangen werden, und es ist auch die Möglichkeit der unregulierten Melatonin-Synthese durch unspezifische *N*-Acetyl- und *O*-Methyltransferasen bei hinreichender Verfügbarkeit von Serotonin in Betracht zu ziehen, dies insbesondere im Falle von Thrombocyten und Erythrocyten. Drei der extrapinealen Bildungsorte verdienen jedoch besondere Aufmerksamkeit, als sie zwingend auf Funktionen verweisen, die nicht zum Spektrum der klassischen Wirkungen gehören. Zunächst zu erwähnen wäre der Gastrointestinaltrakt (Raikhlin et al., 1975; Raikhlin und Kvetnoy, 1976; Bubenik, 1980, 2001, 2002; Huether et al., 1992; Poeggeler, 1992; Huether, 1993; Hardeland, 1996a, 1997b; Bubenik et al., 1999). Eine Involvierung in die Vermittlung von Dunkelsignalen dürfte in einem solchen Organsystem wohl kaum anzunehmen sein. Eine circadiane Rhythmik ist, je nach Spezies, entweder mit weitaus geringerer Amplitude als in Pineal, Retina oder Zirkulation vorhanden oder aber im Einzelfall nicht sicher nachweisbar. Die Konzentrationen des gastrointestinalen Melatonins bleiben zwar mit einigen hundert Pikogramm je Gramm Frischgewicht moderat, angesichts der weitaus größeren Gewebemasse sind die Gesamtmengen dieser Substanz jedoch um Größenordnungen höher als jene des Pineals. Diese Befunde müssen auf dem Hintergrund multipler Melatonin-Quellen gesehen werden: Teils findet eine Synthese in den Enterochromaffinen Zellen statt, teils wird das Gewebe mit zirkulierendem Melatonin beladen, was zu der mit geringer Amplitude schwingenden Rhythmik beitragen oder für diese ursächlich sein sollte. Eine hohe Beladungskapazität für zirkulierendes Melatonin wurde gezeigt (Messner et al., 1998, 1999) und auch eine Verteilung über den enterohepatischen Kreislauf ist beteiligt (Messner et al., 2001); die Melatonin-Konzentration in der Gallenflüssigkeit weist eine Rhythmik mit hoher Amplitude auf (Tan et al., 1999) und könnte zu jener

im Darm beitragen. Darüber hinaus ist eine Aufnahme von Melatonin aus der Nahrung und aus Mikroorganismen des Darms möglich (Tan et al., 2003b; Hardeland und Poeggeler, 2003) – eine zwischenzeitliche Präsenz resorbierten Melatonins im Darm wäre demnach nicht unplausibel. Erhebliche Melatonin-Mengen wurden in Bakterien (Zusf. Hardeland und Poeggeler, 2003) einschließlich *Escherichia coli* (Balzer et al., 2000) gefunden. Tryptophan führt zur Freisetzung von Melatonin aus dem Darm in die Zirkulation (Huether et al., 1992). Postprandiale Melatonin-Sekretion aus dem Darm wurde ebenfalls beobachtet (Bubenik, 2001, 2002). Das Erscheinen erheblicher Konzentrationen von Melatonin in der luminalen Flüssigkeit des Verdauungstrakts wurde als Hinweis für Kommunikation über das Lumen diskutiert (Bubenik et al., 1999). Wie auch immer die genaue Funktion des gastrointestinalen Melatonins sein mag, sie ist in jedem Fall von der klassischen Rolle verschieden. Nur kurz sei hier angedeutet, dass eine Freisetzung aus dem Verdauungstrakt in die Zirkulation nicht zwangsläufig mit der Wirkung als Mediator des Signals Dunkelheit interferiert: Erhöhungen während des Tages fallen in neutrale Bereiche der Phasen-Response-Kurve der circadianen Oszillatoren, so dass die phasenverschiebende Wirkung vernachlässigbar bleibt.

Ein anderes Beispiel für nichtklassische Wirkungen des Melatonins liefert die HARDERsche Drüse von Nagern (Balemans et al., 1980; Hoffman et al., 1985; Reiter, 1989; Menéndez-Peláez, 1990; Rodríguez-Colunga et al., 1991; Menéndez-Peláez et al., 1993; Guerrero et al., 1994b; Djeridane et al., 1998, 2001, 2003; Tomás-Zapico et al., 2002a,b; Zusf.: Payne, 1994; Chieffi et al., 1996). Diese Nebenaugendrüse produziert in jener Tiergruppe erhebliche Mengen an Melatonin, welches nur in moderatem Umfang freigesetzt wird, ohne damit nennenswert zu den zirkulierenden Spiegeln beizutragen. Eine circadiane Rhythmik des Melatonins ist hier nahezu inexistent, so dass die Funktion der Vermittlung von Dunkelsignalen auch in diesem Fall nicht in Frage kommen kann. Melatonin steht in der HARDERschen Drüse jedoch in einer bemerkenswerten Beziehung zum Gehalt an Porphyrinen (vor allem Protoporphyrin IX, daneben auch Harderoporphyrin, Kupfer-Porphyrine etc.) und der Synthesevorstufe 5-Aminolävulinsäure. Es sei vermerkt, dass diese Drüse dasjenige Organ mit der weitaus höchsten bekannten Porphyrogenese-Rate darstellt. Abgesehen von akuten Effekten von exogenem Melatonin auf die Porphyrin-Synthese besteht vor allem eine augenfällige positive Korrelation zwischen Porphyrin- und Melatonin-Spiegeln; dies wird sowohl im interspezifischen Vergleich deutlich als auch, insbesondere beim Goldhamster, in Form eines Sexualdimorphismus: Bei dieser Spezies weisen Weibchen in der HARDERschen Drüse weitaus höhere Protoporphyrin- und Melatonin-Konzentrationen auf als Männchen.

Ein dritter Bereich, in dem bei Wirbeltieren nichtklassische Funktionen des Melatonins offenkundig werden, bei dem aber die Rolle des zirkulierenden Hormons funktionell beiträgt, betrifft das Immunsystem. Zum einen sind mononucleäre Leukocyten wie auch Knochenmarkszellen zur Melatonin-Synthese befähigt (Finocchiaro et al., 1988a; Conti et al., 2000), zum anderen existieren bei Lymphocyten, Neutrophilen und Thymocyten sowohl hoch- als auch niederaffine Bindungsstellen für Melatonin (López-González et al., 1992, 1993a,b; Guerrero et al., 1994a; Maestroni, 1999). Diverse Effekte von Melatonin auf Leukocyten sind beschrieben, von der Stimulation von Monocyten zur Freisetzung von Oxidantien (Morrey et al., 1994) über Freisetzung diverser Cytokine und Immunoopioide (Maestroni, 1995, 1999, 2001; Maestroni und Conti, 1990, 1991; Maestroni et al., 1994; Hardeland, 1996a, 1997a,b) sowie der Hemmung der NO-Synthase (Gilad et al., 1998).

Bereits an diesen Beispielen wird deutlich, dass die Funktionen des Melatonins erheblich vielfältiger sein müssen, als die klassische Rolle erwarten lässt. Noch stärker jedoch hat sich unsere Sichtweise dadurch verändert, dass, wie im Folgenden auszuführen sein wird, das Melatonin auch außerhalb der Wirbeltiere vorkommt, ja außerhalb der Tiere überhaupt, dass ein die Vielzahl von Organismengruppen umfassendes allgemeineres Thema der Protektion vor oxidativen Schäden existiert und dass aus dem Melatonin interessante Metabolite hervorgehen, die an protektiven Effekten partizipieren, aber deren Wirkungsspektrum bislang nur andeutungsweise bekannt ist.

Ubiquität des Melatonins

Melatonin wurde außerhalb der Vertebraten zunächst nur bei anderen Metazoen gesucht und auch regelmäßig in den verschiedensten Tiergruppen gefunden, von Cnidariern über Plathelminthen, Nemathelminthen (Balzer et al., 2000), Nemertinen und Mollusken bis hin zu diversen Taxa von Arthropoden (Zusf.: Vivien-Roels und Pévet, 1993; Hardeland und Fuhrberg, 1996a; Hardeland et al., 1996a). Nach der Entdeckung von Melatonin in einem phototrophen Organismus, dem Dinoflagellaten *Lingulodinium polyedrum* (Syn. *Gonyaulax polyedra*) (Poeggeler et al., 1989, 1991), setzte eine Suche nach diesem Indolamin bei anderen ein- und vielzelligen Algen, bei Gefäßpflanzen, aber auch bei weiteren Einzellern, bei Pilzen und Bakterien ein. Diese Ergebnisse sind in der Vergangenheit mehrfach, zum Teil auch nur auf höhere Pflanzen bezogen, zusammengefasst worden (Balzer und Hardeland, 1995, 1996a; Hardeland und Fuhrberg, 1996a; Hardeland et al., 1996a; Hardeland, 1999; Reiter et al., 2001; Hardeland und Poeggeler, 2003), was hier nicht in voller Breite wiederholt werden soll. Statt dessen sind die Grenzen unseres Wissens, die Probleme der quantitativen Erfassung und die potentielle Bedeutung von Melatonin außerhalb der Metazoen anzusprechen.

Die Breite des Vorkommens von Melatonin rechtfertigt sicher den Begriff „Ubiquität“, auch wenn noch einige Lücken im Spektrum der Taxa existieren. Während dieses Indolamin bei drei Bakterien gefunden wurde, den zur Photosynthese befähigten *Rhodospirillum rubrum* (Manchester et al., 1995) und *Erythrobacter longus* (Tilden et al., 1997) sowie der heterotrophen *Escherichia coli* (Balzer et al., 2000), existieren noch keine Nachweise bei den Archaea. Hinsichtlich des Vorkommens bei eukaryotischen Einzellern ist deren taxonomische Vielfalt zu bedenken; diese repräsentieren nicht einfach eine in sich homogene, monophyletische Gruppe von „Protozoen“, sondern sind Mitglieder äußerst verschiedener Taxa. Unter den „Flagellaten“ i. e. S. sind hier vor allem die photo-/mixotrophe Euglenoide *Euglena gracilis* (Balzer und Fuhrberg, 1996; Balzer et al., 1996a; Hardeland et al., 1996a; Hardeland und Fuhrberg, 1996a; Hardeland, 1999) und die parasitische Trypanosomide *Trypanosoma cruzi* (Rodríguez-Cabezas et al., 1996; Macías et al., 1999) zu nennen. Während *Euglena* einen Tagesrhythmus des Melatonins mit nächtlichem Maximum und hoher Amplitude zeigt, ist die Situation bei *Trypanosoma* komplizierter: Bildung und Freisetzung des Indolamins hängen vom Entwicklungsstadium ab und Tagesrhythmen von Konzentration und Freisetzung können *in vitro* zweigipfelig sein, im Dauerdunkel (DD) mit Maxima am subjektiven Morgen und in der subjektiven Mitte des Tages.

Relativ viel ist bekannt über Vorkommen, Konzentrationen und Metabolismus des Melatonins bei Dinoflagellaten. Diese stehen taxonomisch keineswegs den oben erwähnten Flagellaten nahe, sondern den Ciliaten und den sogenannten Apicomplexa („Sporozoen“), mit denen gemeinsam sie die Organismengruppe der Alveolata bilden. Da bei Dinoflagellaten vergleichsweise umfangreiche Erfahrungen existieren, was die physiologischen Änderungen von Melatonin, seine Effekte und die seiner Metabolite angeht, wird diesen Einzellern weiter unten ein eigenes Kapitel gewidmet. Was deren nächste Verwandtschaftsgruppe, die Ciliaten, anbetrifft, so wurde Melatonin bei zwei Gattungen gefunden, *Tetrahymena* und *Eufolliculina* (Balzer et al., 2000).

Melatonin wurde ferner bei einfachen Vielzellern nachgewiesen, so innerhalb der Phaeophyceen (Braunalgen) in den Gattungen *Pterygophora* (Fuhrberg et al., 1996a; Fuhrberg, 1997; Werner und Lüning, 1998), *Laminaria* (G. Gassmann und K. Lüning, pers. Mitt., zitiert nach Hardeland und Fuhrberg, 1996a) und *Petalonia* (Lüning et al., 1999), innerhalb der Rhodophyceen (Rotalgen) bei *Gracilaria* (Balzer et al., 1996b), *Palmaria* (Bartsch et al., 1999; Lorenz und Lüning, 1999), *Porphyra* (Balzer et al., 1996b; Lorenz und Lüning, 1999) und *Chondrus* (Lüning et al., 1999). Die physiologische Rolle von Melatonin ist bei den untersuchten Arten von Braun- und Rotalgen bislang ungeklärt. Tagesperiodische Variationen wurden entweder nicht gesehen oder zeigten keine sicher reproduzierbaren Muster; auch bestehen zum Teil Unsicherheiten über die Konzentrationen und deren Abhängigkeit von Umweltbedingungen. Eine Vermittlung von Dunkelsignalen erscheint bei diesen Organismen nach gegenwärtigem Kenntnisstand eher unwahrscheinlich. Inhibitorische Effekte von Melatonin auf das Wachstum, wie sie bei *Pterygophora* beschrieben wurden (Fuhrberg et al., 1996a), mögen mit Einflüssen auf das Cytoskelett im Zusammenhang stehen. Hierbei handelt es sich um Wirkungen, die bei verwandtschaftlich weit voneinander stehenden Arten und Zelltypen gefunden wurden (Zusf.: Benítez-King und Antón-Tay, 1993; Hardeland, 1997a), so bei dem Ciliaten *Stentor* (Banerjee et al., 1972), der Zwiebelschuppe (Banerjee und Margulis, 1973), Endosperm-Zellen der Monocotyle *Scadoxus* (syn. *Haemanthus*; Amaryllidaceae; Jackson, 1969) und kultivierten Säugerzellen (Benítez-King und Antón-Tay, 1993, 1996). Diese Effekte, die oft bereits im Bereich von 10^{-9} M gesehen wurden, beruhen teils auf der Bindung von Melatonin an Calmodulin (CaM; Benítez-King und Antón-Tay, 1993, 1996; Huerto-Delgadillo et al., 1994) einschließlich der hiervon ausgehenden Änderung der subzellulären CaM-Verteilung (Antón-Tay et al., 1998a) und Hemmung von CaM-Kinase II (Benítez-King et al., 1996) und/oder – zumindest bei Säugerzellen – der Stimulation von Proteinkinae C-α (Benítez-King und Antón-Tay, 1996; Antón-Tay et al., 1998b; Benítez-King, 2000; Benítez-King et al., 2001). Obwohl diese Mechanismen bei Braun- und Rotalgen nicht studiert wurden, ist mindestens für die Wirkung über das hochkonservierte CaM ein phylogenetisch alter Wirkungsmodus anzunehmen, der auch bei diesen Organismen zum Tragen kommen sollte.

Melatonin wurde ferner in einer weiteren Organismengruppe nachgewiesen, die Einzeller wie auch Vielzeller umfasst, den Chlorophyten i. w. S. Zu nennen wären hier einige einzellige Chlorophyceen (Grünalgen), und zwar mehrere *Chlamydomonas*-Arten, die mit diesen weitläufig verwandte *Dunaliella* sowie die Dasycladacee *Acetabularia* (Balzer et al., 2000). Wichtig erscheint das Vorkommen von Melatonin bei solchen Organismen, weil sie an der Basis eines Taxons stehen, welches die Landpflanzen hervorgebracht hat. Während hinreichende Informationen zu Moosen, Farnen und Gymnospermen noch weitgehend ausstehen, existiert eine Vielzahl von Befunden über die Existenz von Melatonin bei Angiospermen – Dicotyledonen wie Monocotyledonen – und zwar in den verschiedensten Pflanzenteilen, wie Blättern, Spross, Wurzeln, vor allem aber auch Früchten oder Samen. Gerade in Samen, manchmal auch in Früchten sind die Konzentrationen dieser Substanz oftmals besonders hoch. Listen diverser Arten aus inzwischen ca. 20 Pflanzenfamilien wurden zusammengestellt und sind großenteils, in Teilen auch mehrfach, publiziert (Hattori et al., 1995; Balzer und Hardeland, 1995, 1996a; Hardeland und Fuhrberg, 1996a; Reiter et al., 2001; Reiter und Tan, 2002a; Jametti-Tettamanti und Conti, 2002; Conti et al., 2002).

Das Vorkommen von Melatonin bei Blütenpflanzen verdient Betrachtungen unter mehreren, völlig unterschiedlichen Aspekten, solchen der Methodik und ihrer kritischen, unzureichend geklärten Punkte, ferner denen nach denkbaren physiologischen Funktionen und schließlich jenen nach der Bedeutung für tierische und menschliche Ernährung bis hin zur etwaigen Nutzung in Heilpflanzen.

Unter methodischen Gesichtspunkten steht nicht in Frage, ob Melatonin in höheren Pflanzen überhaupt vorkommt, wohl aber in welchen Konzentrationen und in welcher Verteilung, subzellulär wie auch zwischen Symplast und Apoplast. Die Probleme der Konzentrationsmessung beginnen mit einer effizienten Extraktion, die eine nichtenzymatische Zerstörung von Melatonin durch Oxidantien minimiert und die zugleich Ausbeutebestimmungen bei unterschiedlichen Konzentrationen voraussetzt. Diese Probleme sind bei phototrophen Organismen wegen ihrer viel höheren Radikalgenerierung als bei heterotrophen, des Vorhandenseins höherer Spiegel von H_2O_2, welches beim Homogenisieren leicht weiter reagiert, sowie der Präsenz photokatalytisch oder pseudoenzymatisch aktiver Pigmente gravierend. Bei Dinoflagellaten als den ersten phototrophen Organismen, in denen Melatonin gefunden wurde, sind diese technischen Schwierigkeiten in umfangreichen Versuchsserien überwunden (Poeggeler et al., 1991; Poeggeler, 1992; Poeggeler und Hardeland, 1994a,b). Vergleichbare Bemühungen sind bei höheren Pflanzen nur in Einzelfällen unternommen worden. Ferner ist bei den Bestimmungen der Ausbeute zu bedenken, dass diese von der Konzentration und ggf. auch von der vorangegangenen photosynthetischen Aktivität abhängt; wenn man eine durch die chemische Zusammensetzung der Zellen und das physiologisch variable Vorhandensein von Oxidantien gegebene Destruktionskapazität für Melatonin voraussetzt, sind die relativen Verluste – auch bei Anwendung protektiver Maßnahmen wie präservierender Puffer, Schockgefrieren etc. – bei niedrigen Melatonin-Kontrationen größer als bei hohen. Beim Kalibrieren mit externem, dem Zellmaterial zugegebenen Melatonin verhalten sich die mit Zellwänden versehenen Pflanzengewebe anders als Suspensionen von Einzellern. Von einer gleichmäßigen Vermischung mit dem Melatonin-Standard, wie bei Einzellern, ist bei Gefäßpflanzen nicht ohne weiteres auszugehen. Auch das Zerschneiden in sehr kleine Gewebestücke führt zu keiner Lösung des Problems, weil der Anteil verletzter Zellen zunimmt und an den Schnittflächen Melatonin vor der Extraktion destruiert wird. Am ehesten kommt man den Idealbedingungen nahe, wenn man sehr kleine Pflanzen verwendet, z. B. *Chenopodium*-Sämlinge, die bereits physiologische Reaktionen wie etwa Blühinduktion zeigen. Allem Anschein nach ist auch die Extraktion aus ruhenden Samen effizienter und nicht durch hohe Destruktionsraten belastet. Vielleicht ist dies ein Grund dafür, dass oftmals besonders hohe Melatonin-Spiegel in Samen gemessen wurden (Hattori et al., 1995; Balzer und Hardeland, 1996a; Hardeland und Fuhrberg, 1996a; Reiter und Tan, 2002a).

Das nächste ernste methodische Problem besteht in der Verifizierung des Nachweises durch mindestens eine technisch grundsätzlich verschiedene Prozedur. Immunologische Nachweise (RIA oder ELISA) sollten durch eine chromatographische Bestimmung abgesichert werden (HPLC, am besten mit verschiedenen Detektionssystemen; LC-MS; GC-MS). Aufgrund möglicher Kreuzreaktionen erfordern immunologische Bestimmungen unbedingt Messungen unter serieller Dilution und Prüfung auf Parallelität. Chromatographische Verfahren besitzen die Fehlerquelle der Koelution mit anderen Substanzen. Auch hier sind umfangreiche Kontrollversuche und Variationen unabdingbar. Bevor Aussagen über das Vorhandensein von Melatonin und seine Spiegel getroffen werden können, müssen die voneinander unabhängigen Techniken gleich hohe Konzentrationen ergeben. Bei den allermeisten Arbeiten über Melatonin in höheren Pflanzen sind diese Anforderungen nicht erfüllt. Das Problem der oft weit divergierenden Melatonin-Werte bei Anwendung unterschiedlicher Methoden ist vor Kurzem erneut adressiert worden (Van Tassel et al., 2001; Van Tassel und O'Neill, 2001; Hardeland und Poeggeler, 2003). Die publizierten Konzentrationen von Melatonin, ihre Verteilung innerhalb des Pflanzenkörpers und etwaige circadiane Änderungen müssen also bei vielen höheren Pflanzen noch mit sehr großer Vorsicht gesehen werden.

Die Beurteilung der Rolle von Melatonin bei Gewebepflanzen (Makroalgen und Landpflanzen) sowie auch bei einigen Pilzen wird durch den Umstand erschwert, dass die Verteilung zwischen Cytoplast und Vakuole unbekannt ist (Hardeland, 1999; Hardeland und Poeggeler, 2003). Die üblicherweise im Vergleich zum Cytoplasma saurere und meist viel größere Vakuole könnte sehr wohl ein membrangängiges Amin wie das Melatonin akkumulieren, so dass dessen physiologisch effektive Menge viel niedriger sein mag, als Gesamtbestimmungen vermuten lassen. Andererseits wäre auch eine langsame Rückladung von der Vakuole in das Cytoplasma bei Absinken der dortigen Konzentration denkbar. Ein weiteres Verteilungsproblem (s. o.) betrifft das mögliche Vorkommen von Melatonin im Apoplasten (Hardeland, 1999; Hardeland und Poeggeler, 2003). Angesichts seiner Membrangängigkeit könnte Melatonin sehr wohl im Apoplasten erscheinen. Ob dies tatsächlich so ist, ob sich die Substanz im Apoplasten mit dem Wasser bewegt, ist unbekannt, wäre aber hinsichtlich etwaiger Funktionen als Phytohormon der Aufklärung wert.

Die Möglichkeiten physiologischer Wirkungen bei Pflanzen, entweder als Antioxidans oder als Phytohormon, sind bereits vor einigen Jahren angesprochen worden (Balzer und Hardeland, 1996a). Nur wenige Labors haben indessen diese Fragen verfolgt. Für Protektion gegenüber oxidativem Stress und Antagonisierung von Se-

neszenz existieren initiale Untersuchungen, die für eine solche Rolle bei Di- und Monokotylen sprechen (Fletcher und Sopher, 1997). Da die beobachteten Wirkungen zum Teil jenen von Cytokininen entsprachen, wäre auch die Funktion eines Phytohormons nahe liegend. Leider sind derartige Daten aber bislang nicht im Detail publiziert worden. Weitere Hinweise auf eine antioxidative Rolle von Melatonin auch bei Pflanzen hatten sich aus dem Vergleich von Tomaten-Kultivaren unterschiedlicher Sensitivität gegenüber Ozon ergeben (Dubbels et al., 1995), doch auch hier existieren keine direkten Untersuchungen zu dieser Frage.

Weitere, methodisch sorgfältige Experimente an der Tomate ergaben keinen Hinweis auf einen Tagesrhythmus des Melatonins, wohl aber eine Zunahme im Zusammenhang mit der Fruchtreifung (Van Tassel et al., 2001). Diese Resultate liegen auf der Linie früherer Vermutungen, dass das Melatonin protektive und/oder die Fruchtdifferenzierung begünstigende Effekte besitzen könne (Balzer und Hardeland, 1996a).

Eine circadiane Rhythmik ließ sich hingegen bei einem Ökotyp von *Chenopodium rubrum* nachweisen, der als Kurztagpflanze schon auf eine lange Nacht mit Blühinduktion reagiert (Kolář et al., 1995, 1997, 1999). Auch hier handelt es sich um methodisch sorgfältige Untersuchungen, die RIA und intern kalibrierte Messungen durch LC-MS/MS beinhalten. Die beobachtete Rhythmik mit einem prominenten nächtlichen Maximum sollte daher als verlässlich gelten. Eine Voraussetzung für Involvierung in photoperiodische Antworten wäre somit gegeben. Dennoch wurde keine Blühinduktion durch Melatonin ausgelöst, sondern es unterdrückte diese bei Gabe in bestimmten circadianen Phasen (Kolář et al., 1999). Ähnliche Effekte wurde mit GCP 52608 gefunden (Kolář et al., 1999), einer Substanz, die als Agonist eines putativen nukleären Melatonin-Rezeptors angesehen wird. Abgesehen von der generellen Diskussion über nukleäre Rezeptoren bliebe die Frage nach deren Existenz und Pharmakologie bei Pflanzen ohnehin offen. Sollten die beobachteten Wirkungen bei *Chenopodium* spezifischer und zugleich photoperiodischer Natur sein, so bliebe nur die Interpretation im Sinne eines permanenten Dunkelsignals, denn im Gegensatz zu moderaten Kurztagen führen auch bei Kurztagpflanzen extrem lange Scotophasen oder Dauerdunkel oftmals zu einer verminderten Blühinduktion. In diesem Zusammenhang sei auch vermerkt, dass Melatonin – desgleichen sein Metabolit 5-Methoxytryptamin – keine Blühinduktion bei anderen Kurztagpflanzen auslöste, weder bei *Kalanchoë tubiflora* (Hardeland und Poeggeler, 2003) noch bei drei hierauf untersuchten Lemnaceen (Hardeland, 1994).

Trotz der ungeklärten Physiologie des Melatonins bei Pflanzen ist dessen dortige Existenz in mehrfacher Hinsicht von Interesse. Zum einen konnte gezeigt werden, dass Melatonin aus pflanzlicher Nahrung von Wirbeltieren aufgenommen wird und zu den zirkulierenden Spiegeln beitragen kann. Zunächst war dies in der Weise untersucht worden, dass Nager pflanzliche Nahrung unterschiedlichen Melatonin-Gehalts erhielten, was sich auf die Plasmaspiegel auswirkte (Hattori et al., 1995). Hiergegen konnte man noch den Einwand erheben, dass Melatonin in hohem Maße ohnehin im Darm vorhanden sei, postprandiale Melatonin-Freisetzungen (s. o.) aus dem Darm in die Zirkulation erfolgen (Bubenik, 1980, 2001, 2002; Huether, 1993; Bubenik et al., 1999) und dass auch bestimmte Nahrungskomponenten wie z. B. Tryptophan selbiges auslösen können (Huether et al., 1992). Ein neuerer experimenteller Ansatz (Tan et al., 2003b) entkräftete jedoch dieses Argument: Eine Abreicherung des Futters durch Extraktion von Melatonin führte bei Hühnern zu erniedrigten Blutwerten. Melatonin mag somit, abgesehen von seiner Rolle als Hormon, zusätzlich als ein Mikronährstoff oder Vitamin angesehen werden (Tan et al., 2003b).

Dieser Gesichtspunkt der Melatonin-Aufnahme im Darm mag über die pflanzliche Nahrung hinausgehen, doch sind wesentliche Fragen hierzu noch unbeantwortet. Bildung von Melatonin durch Bakterien wurde mehrfach gezeigt (s. o.), aber für Darmbakterien bedürfte es weiterer diesbezüglicher Untersuchungen. Immerhin wird Melatonin auch von *Escherichia coli* synthetisiert und auf diesem Bakterium gehaltene *Caenorhabditis elegans* zeigt ähnliche Konzentrationen und teils auch ähnliche zeitliche Verlaufsmuster (Balzer et al., 2000), so dass eine Aufnahme aus der Nahrung bei dem Nematoden nahe liegt. Allerdings spielt im Säugerdarm *E. coli* keine quantitativ bedeutende Rolle und für die die Hauptmasse der Darmbakterien ausmachenden strikten Anaerobier ist das Vorhandensein von Melatonin noch nicht untersucht. Bislang werden als Hauptquellen des gastrointestinalen Melatonins die Synthese durch Enterochromaffine Zellen sowie zusätzliche Beladung aus der Zirkulation angenommen, ferner ein Anteil aus dem Enterohepatischen Kreislauf, doch ist auch ein Beitrag bakterieller Herkunft im Bereich des Möglichen (Hardeland und Poeggeler, 2003).

Die Aufnahme von Melatonin aus pflanzlichen Quellen ist auch insofern von Interesse, als es in hohen Konzentrationen in verschiedenen Heilpflanzen gefunden wurde (Murch et al., 1997; Reiter et al., 2001; Reiter und Tan, 2002a; Conti et al., 2002; Hardeland und Poeggeler, 2003). Die pharmakologische Bedeutung des Melatonins in diesen Pflanzen ist allerdings noch keineswegs klar. Außerdem ist zu bedenken, dass solches Material weitere bioaktive Substanzen enthält, die entweder unabhängig vom Melatonin wirken oder auch mit ihm interagieren könnten. Die unter dem Namen Huang-qin bekannt gewordene, in der chinesischen Volksmedizin verwendete Helmkrautart *Scutellaria baicalensis* enthält z. B. das Phenylethanoid-Glykosid Acteosid sowie diverse Flavonoide wie Baicalein, Baicalin, Wogonin und Ganhuangenin. Allen diesen werden pharmakologische Effekte zugeschrieben, wie Entzündungshemmung, antioxidative

Protektion, Einflüsse auf den Glutathion-Spiegel, die NO-Synthase und P_{450}-Monooxygenasen, Interferenz mit Steroidrezeptoren bis hin zur chemischen funktionellen Kastration, Immunmodulation und proapoptotische Wirkungen (cf. Hardeland und Poeggeler, 2003).

Auf die Rolle von Melatonin bei Pilzen und wirbellosen Tieren soll im Rahmen dieses Kapitels nur wenig eingegangen werden, da bestimmte Aspekte Gegenstand nachfolgender Betrachtungen sein werden (für weitere Details siehe: Vivien-Roels und Pévet, 1993; Hardeland et al., 1996a; Hardeland und Fuhrberg, 1996a). Auch hier ist festzustellen, dass die Funktionen des Melatonins weitgehend unbekannt geblieben sind, auch wenn sporadisch einige Effekte beschrieben wurden. Die Federkoralle *Renilla koellikeri* reagierte auf Melatonin mit Kontraktionen, die cGMP-vermittelt waren (Anctil et al., 1991). Bei den Plathelminthen *Dugesia dorotocephala* und *D. japonica* wurden circadiane Rhythmen des Melatonins mit nächtlichen Maxima gefunden, ferner Effekte des Indolamins auf die Regenerierung von Körperteilen, Hemmung der asexuellen Vermehrung sowie Depigmentierung (Morita et al., 1987; Yoshizawa et al., 1991; Morita und Best, 1993; Csaba, 1993). Für *Drosophila melanogaster* wurden verminderte Rezeptivität der Weibchen sowie niedrigere Raten der Eiablage beschrieben (Finocchiaro et al., 1988b). Die Grenzen zwischen pharmakologischen und physiologischen Effekten sind nicht immer leicht zu erkennen. Der Fall *Drosophila* mag hierbei besonders erhellend sein. Was auf den ersten Blick, auch angesichts eines Melatonin-Rhythmus mit nächtlichem Maximum (Callebert et al., 1991), nur wie eine Variation des von saisonalen Säugern bekannten Themas der photoperiodischen Reproduktionskontrolle erscheinen mag, erweist sich bei näherem Hinsehen als problematisch. Keine der bekannten Isoformen der Arylalkyl-*N*-acetyltransferase zeigt eine circadiane Expression (Brodbeck et al., 1998; Amherd et al., 2000; weitere Details siehe Hardeland und Poeggeler, 2003). Die Melatonin-Rhythmik geht indessen auf die Hydroxyindol-*O*-methyltransferase zurück, die logischerweise auch ratenlimitierend ist. Als Konsequenz liegen bei *Drosophila* die Konzentrationen von Melatonin deutlich niedriger als die seiner Vorstufe *N*-Acetylserotonin, und zwar um drei Größenordnungen (Callebert et al., 1991). Jede Verabreichung von Melatonin in pharmakologischer Dosis führt potentiell zur Interferenz mit *N*-Acetylserotonin im Gehirn, dessen volles Wirkungsspektrum jedoch noch nicht hinreichend geklärt ist. Der einzige sicher bekannte Effekt von *N*-Acetylserotonin betrifft eine sehr effektive Hemmung der Sepiapterin-Reductase und damit des Tetrahydrobiopterin-abhängigen Weges der Serotonin- und Melatonin-Biosynthese. In höherer Dosierung geht eine solche Wirkung aber ebenfalls von Melatonin aus (Primus und Brown, 1994; Seong et al., 1998), so dass eine Verabreichung von Melatonin bei den Fliegen zu einem Mangel insbesondere an Serotonin und *N*-Acetylserotonin führen kann.

Melatonin, nicht nur ein „Troll“

Das bemerkenswerte Faktum, dass pineales und zirkulierendes Melatonin bei allen daraufhin untersuchten Wirbeltieren – sowohl tag- wie nachtaktiven Arten – nächtliche Maxima aufweisen, gab Anlass zu seiner Bezeichnung als „Troll“ unter den Hormonen. Diese Assoziation von Melatonin und Dunkelheit zieht sich durch die Betrachtungen einer Vielzahl von Arbeiten, und bei Entdeckung der Substanz in extrapinealen Quellen und neu daraufhin untersuchten Organismen kommt regelmäßig die Frage auf, ob auch in diesen Fällen eine Vermittlung der Information „Dunkelheit“ vorliegen könne. Dass dies nicht grundsätzlich so ist, soll im Folgenden belegt werden. Weder zeigt das Melatonin durchgängig in allen Systemen nächtliche Maxima noch ist es in jedem Falle überhaupt rhythmisch.

Schon bei Wirbeltieren ist das Melatonin nicht ausschließlich mit Dunkelheit assoziiert. In der HARDERschen Drüse von Nagern unterliegt seine Konzentration fast gar keinen tagesperiodischen Schwankungen; allein eine kurzzeitige Erniedrigung direkt nach Licht-an ist festzustellen (Menéndez-Peláez, 1990), welche vermutlich einen exogenen Lichteffekt darstellt, nicht aber Ausdruck circadianer Schwankungen. Auch die Rhythmik des gastrointestinalen Melatonins kann sehr schwach ausgeprägt sein (s. o.). Wie schon in der Einleitung dargelegt, weisen diese Befunde auf Funktionen des Melatonins hin, welche nicht in der Vermittlung der Information Dunkelheit bestehen.

Außerhalb der Wirbeltiere finden sich weitere, zum Teil markante Beispiele für entweder arrhythmische oder diurnal erhöhte Melatonin-Spiegel (Zusf.: Vivien-Roels und Pévet, 1993; Hardeland und Fuhrberg, 1996a; Hardeland et al., 1996a; Hardeland und Poeggeler, 2003). Fast verwirrend erscheinen Befunde über die Verteilung dieser Substanz im Körper von Grillen: In Antennen, Hinterbeinen, Cerci und Ovipositor wurden höhere Werte am Tage gemessen, während Hirn und Komplexauge nächtliche Gipfel zeigen (Itoh et al., 1995). Hier mag eine zeitlich variierende periphere Geweberetention von Bedeutung sein, die zentralnervöse Synthese aber dem „üblichen“ nächtlichen Muster folgen.

Anders ist die Situation offenkundig in den nächsten beiden Fällen. Bei der marinen Schnecke *Aplysia californica* ist zwar ebenfalls das Melatonin der Cerebralganglien nachts am höchsten – und hier eine Beziehung zur Messung der Scotophase denkbar –, aber es erreicht am Tage sein Maximum in den Augen (Abran et al., 1994). Ein diurnaler Melatonin-Gipfel wurde ebenfalls in den optischen Loben des Süßwasserkrebses *Macrobrachium rosenbergii* gefunden, ferner Lichtinduzierbarkeit der Arylalkylamin-*N*-acetyltransferase (Withyachumnarnkul et al., 1992a,b). Solche Befunde mögen sich im Sinne von Photoprotektion interpretieren lassen (Hardeland und Poeggeler, 2003). Besonders in lichtexponierten Organen

und bei Vorhandensein photooxidierbarer Pigmente können photochemisch erzeugte reaktive Sauerstoffe sowie organische Radikale Schäden erzeugen, die nur zum Teil enzymatisch beherrschbar sind, wohl aber antagonisierbar durch niedermolekulare Radikalfänger wie Melatonin, welche sehr leicht von Photokatalysatoren gebildete Oxidantien abfangen (Uría et al., 1994a,b, 1995; Hardeland et al., 1995, 1996b; Behrmann et al., 1995, 1997; Hardeland und Fuhrberg, 1996a). Eine entsprechende Deutung ist auch für die HARDERsche Drüse der Nager gegeben worden, die als Nebenaugendrüse lichtexponiert ist, zudem photokatalytisch aktive Protoporphyrine und 5-Aminolaevulinsäure enthält, auf exzessives Licht mit morphologischen Schäden bis hin zu Neoplasien reagiert und bei der die Konzentration des Melatonins interspezifisch und geschlechtsabhängig mit jener von Protoporphyrin IX korreliert (Uría et al., 1994a; Hardeland und Uría, 1995; Behrmann et al., 1997; Tomás-Zapico et al., 2002a,b).

Ein völlig anderes Beispiel für Abweichungen von der Beziehung zur Dunkelheit liefert die Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. In diesem Organismus wurden hohe Konzentrationen von Melatonin gemessen, jedoch keine Beziehung zur Tagesphase festgestellt; stattdessen hing die Konzentration des Indolamins von Wachstumsbedingungen und insbesondere der Verfügbarkeit von Tryptophan bzw. anderen geeigneten Vorstufen ab (Fuhrberg et al., 1996b; Fuhrberg, 1997; Sprenger et al., 1997, 1999; Hardeland, 1998; Sprenger und Hardeland, 1999). Diese Unabhängigkeit von der Tagesphase hat inzwischen ihre molekularbiologische Erklärung gefunden: Der Arylalkylamin-*N*-acetyltransferase von *Saccharomyces* fehlen die entscheidenden C- und N-terminalen Kontrollregionen, die für eine Antwort auf photische Signale erforderlich sind (Ganguly et al., 2001). Die Existenz von Melatonin in Abwesenheit einer circadianen oder auch exogen getriebenen diurnalen Rhythmik weist auch hier auf eine von der Vermittlung von Dunkelsignalen verschiedene Funktion hin.

Enzymatischer und nichtenzymatischer Metabolismus des Melatonins

Die meisten Arbeiten zum Melatonin-Stoffwechsel haben sich auf die Bildung von 6-Hydroxymelatonin in der Leber und dessen nachfolgende Konjugation zum Zwecke der renalen Eliminierung beschränkt. Nicht gerade selten liest man die Feststellung, dass das Melatonin nahezu quantitativ in Form dieser Konjugate über den Urin ausgeschieden werde. Diese Aussagen finden ihre Berechtigung dann, wenn zirkulierendes Melatonin in einem gewissen Konzentrationsbereich gemeint ist, auch nach dessen Verabreichung. Doch gilt dies nach heutiger Kenntnis nicht ohne weiteres, wenn Melatonin über den Darm ausgeschieden wird, wenn bestimmte Dosierungen überschritten werden, wenn Gewebemelatonin – insbesondere jenes des Zentralnervensystems – betroffen ist oder wenn es um den Stoffwechsel von Organismen außerhalb der Wirbeltiere geht.

Das Erscheinen unverstoffwechselten Melatonins in der Gallenflüssigkeit und dessen Zirkulieren im Enterohepatischen Kreislauf (Tan et al., 1999; Messner et al., 2001) zeigt bereits an, dass Melatonin auch anders als über Konjugierung ausgeschieden werden kann. Kontinuierliche Infusion von Melatonin mit der Zielsetzung, in der Zirkulation von Ratten am Tage Spiegel von der Höhe der Nachtwerte zu erzeugen (Huether et al., 1998), zeigten zum einen eine beträchtliche Geweberetention, zum anderen das Erscheinen erheblicher Mengen der Radioaktivität des zum Verfolgen verwendeten Tracers in den Faeces (Messner et al., 1998, 1999). Dies muss nicht nur unverstoffwechseltes Melatonin beinhalten, sondern schließt auch dessen Metabolite ein, doch wird hier die grundsätzliche Frage aufgeworfen, welches das Schicksal des Melatonins in Geweben außerhalb von Leber und Niere ist. Dass es sich nicht allein um die Bildung von 6-Hydroxymelatonin und seinen Konjugaten handeln kann, zeigt in den Beladungsexperimenten das Erscheinen von Radioaktivität in einer Fraktion, die weder in Chloroform noch in Wasser löslich ist, sondern, nicht extrahierbar, in einer Interphase verbleibt (Messner et al., 1998, 1999). Offensichtlich handelt es sich dabei um einen kovalent an Protein gebundenen Metaboliten, der noch unidentifiziert ist. Angesichts vergleichbarer Reaktionen von anderen Indolmetaboliten könnte man hier an eine Rolle von Indolinonen denken, welche offenbar auch aus Melatonin durch oxidative Prozesse entstehen (Mueller et al., 2001). Bloße Inkubation von Proteinfraktionen mit Melatonin in Abwesenheit katalytischer Aktivitäten führte zu keiner Vernetzung mit Proteinen. Proteinmodifikation durch Melatonin ist ein noch völlig unerforschtes Feld, mag jedoch von erheblicher Bedeutung sein (Hardeland und Poeggeler, 2002), insbesondere mit Blick auf die *in vitro* ebenso wie *in vivo* beobachtete antifibrillogene Wirkung von Melatonin gegenüber Amyloid-β des Morbus Alzheimer, welche nicht in gleicher Weise von anderen Antioxidantien ausgeht (Pappolla et al., 2000; Poeggeler et al., 2001; Matsubara et al., 2003), wohl aber vom Strukturanalog Indol-3-propionsäure (Chyan et al., 1999). Diese Effekte werden nicht von den bekannten membranständigen Melatonin-Rezeptoren vermittelt (Pappolla et al., 2002).

Die ausschließlich auf 6-Hydroxymelatonin fokussierende Bilanzierung des Melatonin-Katabolismus mag ins Wanken geraten, wenn man bedenkt, dass die Mengen dieser Substanz im Gastrointestinaltrakt um mehr als zwei Zehnerpotenzen höher liegen als im Pinealorgan (Huether, 1993; Bubenik et al., 1999). Da offenbar ein Großteil dieses Melatonins nicht in die Zirkulation übertritt, deswegen nicht in der Leber hydroxyliert wird und somit nicht in den Konjugaten des Harns gefunden wird, sollte der Metabolismus im Gastrointestinaltrakt verschie-

den sein. In gleicher Weise ist diese Frage für andere Gewebe zu stellen. Ein in der Retina, aber auch im Gehirn, im Pinealorgan und weiteren Organen identifizierter Abbauweg führt zum 5-Methoxytryptamin (5-MT) und dessen möglichen Folgeprodukten 5-Methoxyindol-3-acetaldehyd, 5-Methoxyindol-3-essigsäure und 5-Methoxytryptophol (Abb. 1). Obwohl diese Substanzen auf verschiedenen Routen entstehen können (Hardeland et al., 1993d, 1996c), spielt die Bildung von 5-MT durch Deacetylierung von Melatonin eine vermutlich funktionell wichtige Rolle. Außer durch mehrere Arylacylamidasen breiterer Substratspezifität (Zusf.: Hardeland et al., 1996d) kann diese Reaktion von einer spezifischen Melatonin-Deacetylase katalysiert werden, was zunächst in der Froschretina entdeckt wurde (Grace et al., 1991; Grace und Besharse, 1993), später auch bei anderen Organismen (Grace und Besharse, 1994; Li et al., 1997). Da 5-MT in der Retina des Huhns eine cAMP-Absenkung bewirkt, welche unabhängig von Melatonin-Rezeptoren ist (Iuvone et al., 1995), verdient dieser Weg besondere Aufmerksamkeit. Melatonin kann ferner bei Säugern einschließlich des Menschen und bei Vögeln durch *O*-Demethylasen in seine Vorstufe *N*-Acetylserotonin rückverwandelt werden (Leone und Silman, 1984, 1985; Young et al., 1985; Allen et al., 1991; Hardeland et al., 1993d), ein Weg, der in jüngerer Zeit kaum Beachtung gefunden hat, aber hinsichtlich des Schicksals von Gewebemelatonin weiter untersucht werden müsste.

Außerhalb der Metazoen sollte der Stoffwechsel des Melatonins ohnehin Abweichungen zeigen, insbesondere soweit das 6-Hydroxymelatonin betroffen ist. Für einen Einzeller, eine Pflanze, einen Pilz, auch selbst für kleine aquatische Tiere besteht nicht von vornherein eine Notwendigkeit, das Melatonin für Zwecke späterer Konjugation zu hydroxylieren, da dieser Weg als Voraussetzung für einen Exkretionsmechanismus zu sehen ist, der diesen Organismen fehlt. Genauer untersucht ist der Stoffwechsel des Melatonins bei dem Dinoflagellaten *Lingulodinium polyedrum*. 6-Hydroxymelatonin wurde bei keiner der Untersuchungen an diesem Organismus gefunden. Der Hauptabbauweg verläuft hier über Deacetylierung zum 5-MT. Schon die Substratspezifitäten von Arylalkylamin-*N*-acetyltransferase und Hydroxyindol-*O*-methyltransferase weisen aus, dass Melatonin im Wesentlichen die Vorstufe von 5-MT darstellt und nicht sein Produkt (Balzer und Hardeland, 1993a). Eine deacetylierende Arylacylamidase wurde gefunden und erwies sich als induzierbar durch hohe Melatonin-Konzentrationen (Hardeland und Fuhrberg, 1996b,c,d; Hardeland et al., 1996c, 1997a, 1999a, 2001a). Dies steht bei diesem Organismus im Einklang mit dem nächtlichen Kurvenverlauf des Melatonins, dessen Konzentrationsabnahme mit einer Zunahme von 5-MT einhergeht (Poeggeler, 1992; Balzer et al., 1993; Hardeland et al., 1995, 1997a; Fuhrberg, 1997). Auch eine starke, temperaturbedingte Steigerung des Melatonins (s. u.) wird von Erhöhungen der Arylacylamidase und der 5-MT-Konzentration gefolgt (Hardeland und Fuhrberg, 1996c,d; Fuhrberg, 1997; Fuhrberg und Hardeland, 1997; Fuhrberg et al., 1997). Der Abbau von 5-MT geschieht über eine Monoaminoxidase, deren Hemmung zu erheblichen Steigerungen des 5-MT führt (Fuhrberg, 1997). Der resultierende 5-Methoxyindol-3-acetaldehyd kann sodann entweder über die Alcoholdehydrogenase in 5-Methoxytryptophol überführt werden oder durch die Aldehyddehydrogenase in 5-Methoxyindol-3-essigsäure (5-MIAA). Normalerweise sind diese beiden Endprodukte in den Extrakten von *Lingulodinium* kaum zu finden (Poeggeler, 1992). 5-Methoxytryptophol erscheint immer dann in größeren Quantitäten, wenn zuvor die Konzentrationen von Melatonin und 5-MT sehr hoch gewesen sind (Fuhrberg und Hardeland, 1995c; Fuhrberg et al., 1996c; Fuhrberg, 1997; Hardeland et al., 2001). Dennoch stellt diese Substanz nicht den Hauptmetaboliten dar. Beladungsexperimente zeigten, dass das 5-MT zum allergrößten Teil in 5-MIAA übergeht, welche aber die Zellen verlässt und dann im Medium ercheint (Mueller und Hardeland, 1999b; Mueller et al., 2000, 2001). Folglich sind bei basalen Spiegeln von Melatonin und 5-MT die Freisetzungsraten von 5-MIAA hoch genug, um diese Substanz in der Zelle sehr niedrig zu halten. Sie wird erst bei hohen Konzentrationen der Vorläufer im Cytoplasma nachweisbar. 5-Methoxytryptophol hingegen akkumuliert erst dann, wenn die Umwandlungskapazität der Aldehyddehydrogenase limitierend wird, so dass der 5-Methoxyindol-3-acetaldehyd verstärkt in den konkurrierenden Weg der Alcoholdehydrognase abfließt. Biologische Effekte von 5-Methoxytryptophol und 5-MIAA wurden bei *Lingulodinium* bislang nicht gefunden.

5-Methoxyindole, die entweder als Abbauprodukte von Melatonin in Frage kommen oder aber auf parallelen Wegen aufgrund breiter Substratspezifitäten von *O*-Methyltransferasen entstehen können, wurden außerhalb der Metazoen verschiedentlich gefunden (Zusf.: Hardeland et al., 1996a; Hardeland, 1999). Die genauen Stoffwechselrouten sind in den meisten Fällen jedoch unklar geblieben. Ein Beispiel für die Beziehung zwischen Melatonin und 5-MT findet sich bei *Saccharomyces*. Beide Substanzen ebenso wie 5-Methoxytryptophol können in den Hefezellen nachgewiesen werden, sind in ihrer Konzentration aber ernährungsabhängig (Fuhrberg et al., 1996b; Fuhrberg, 1997; Sprenger et al., 1997). Die Frage nach der Entstehung von Melatonin aus *N*-Acetylserotonin oder 5-MT konnte durch Depletion der Vorstufen und gezielte Substitution einzelner Metabolite des Stoffwechselweges beantwortet werden. Der Hauptweg der Melatonin-Biosynthese verläuft über *N*-Acetylserotonin, während das 5-MT als ein Metabolit des Melatonins gebildet wird; ist jedoch der gesamte Indolamin-Weg depletiert und es wird 5-MT gegeben, so entsteht hieraus ebenfalls Melatonin (Sprenger und Hardeland, 1999). Hefe verfügt demnach über Arylacylamidase, aber auch über 5-MT akzeptierende *N*-Acetyltransferase(n).

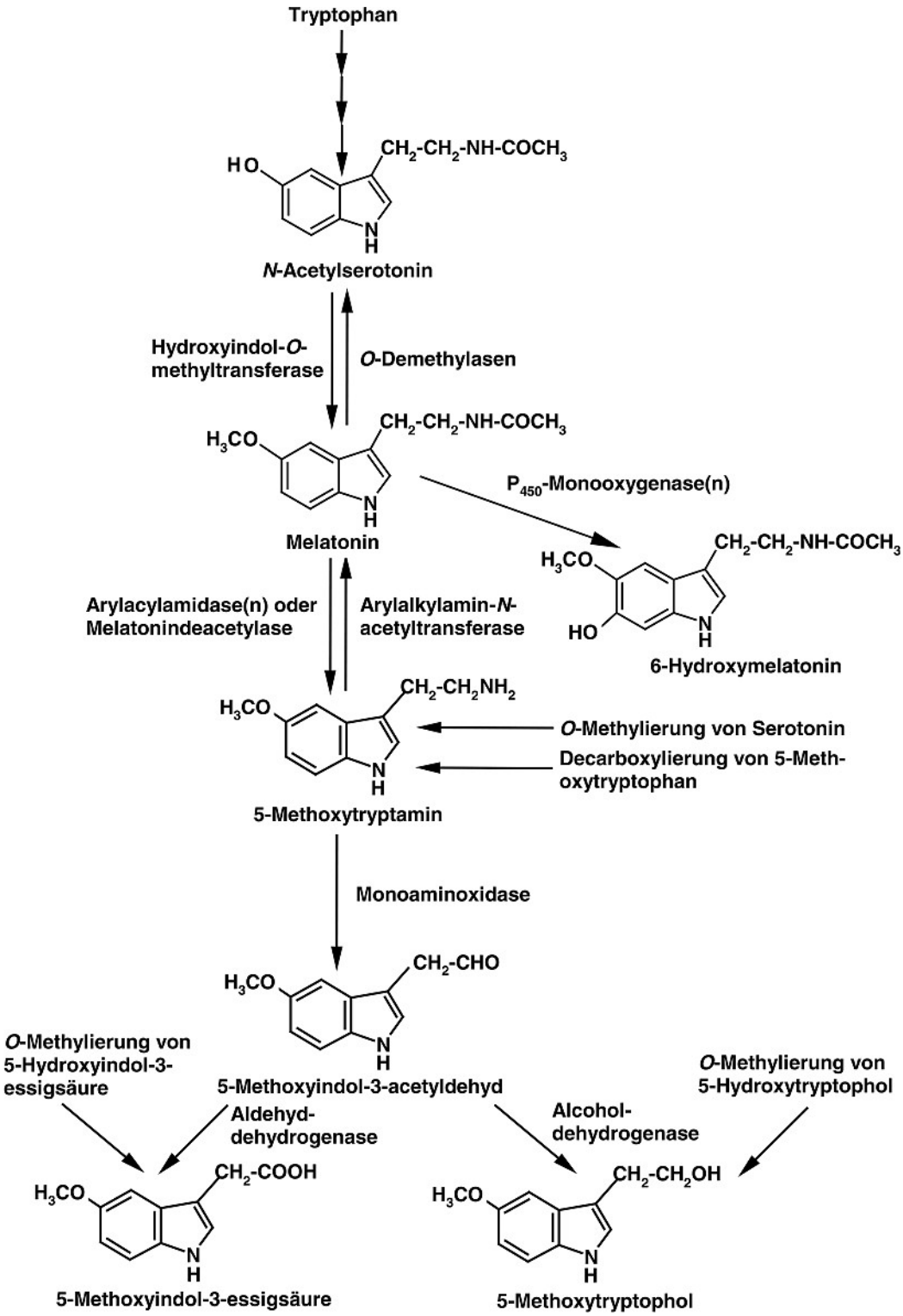

Abb. 1: Der indolische Metabolismus des Melatonins einschließlich der Nebenwege, die zu denselben Produkten führen

Im Gehirn von Wirbeltieren hat das Schicksal des Melatonins neuerliches Interesse auf sich gezogen, nachdem gezeigt wurde, dass das Pinealorgan sein Hormon nicht nur in die Zirkulation entlässt, sondern auch über den Recessus pinealis direkt in den dritten Ventrikel, und zwar in Konzentrationen, die etwa zwei Größenordnungen über jenen des Blutplasmas liegen (Tricoire et al., 2002; Reiter und Tan, 2002b). Interessanterweise liegen die Spiegel in der cerebrospinalen Flüssigkeit, die aus Rückenmarkspunktaten gewonnen wird, etwa im selben Bereich wie

in der Zirkulation. Es muss daher das Melatonin noch vor Erreichen des Rückenmarks weitgehend von Hirngewebe aufgenommen werden. Da das ins Gehirn entlassene Melatonin offenbar nicht wesentlich zum 6-Hydroxymelatonin beiträgt, es ja auch angesichts der großen über den Recessus pinealis abgegebenen Mengen in der Bilanz der urinären Konjugate gesehen worden sein müsste, ist die Annahme einer völlig anderen Verstoffwechselung nahe liegend. Ein Teil des Abbaus mag über Deacetylierung und Demethylierung erfolgen, aber es ist zusätzlich ein weiterer Weg in Betracht zu ziehen, der schon seit langem bekannt ist, aber von vielen ignoriert wurde. Bereits im Jahre 1974 zeigten Hirata et al., dass in die Cisterna magna injiziertes Melatonin zu mehr als einem Drittel in Form von substituierten Kynuraminen wiedergefunden wurde. Hierbei handelt es sich um das durch oxidative Pyrrolringöffnung aus Melatonin entstehende N^1-Acetyl-N^2-formyl-5-methoxykynuramin (AFMK) sowie das aus diesem durch Deformylierung hervorgehende N^1-Acetyl-5-methoxykynuramin (AMK) (Abb. 2). Diese beiden Substanzen sind offenbar wesentliche Metabolite des Melatonins im Gehirn.

Zunächst war die Bildung von AFMK nur auf die Aktivität eines Enzyms zurückgeführt, welches in partieller Analogie zur Tryptophan-2,3-dioxygenase der Leber die Öffnung des Pyrrolringes bewirkt, aber auch Indolamine umzusetzen vermag. Diese Indolamin-2,3-dioxygenase (IDO) ließ sich in diversen Geweben außerhalb der Leber nachweisen (Hayaishi, 1976; Hayaishi und Yoshida, 1979). Angesichts ihrer breiten Substratspezifität vermag IDO auch Melatonin umzusetzen (Hardeland et al., 1993d, 1996c; Hardeland und Fuhrberg, 1996a). Allerdings stellte sich bald heraus, dass das physiologisch wichtigste IDO-Substrat letztlich doch das Tryptophan

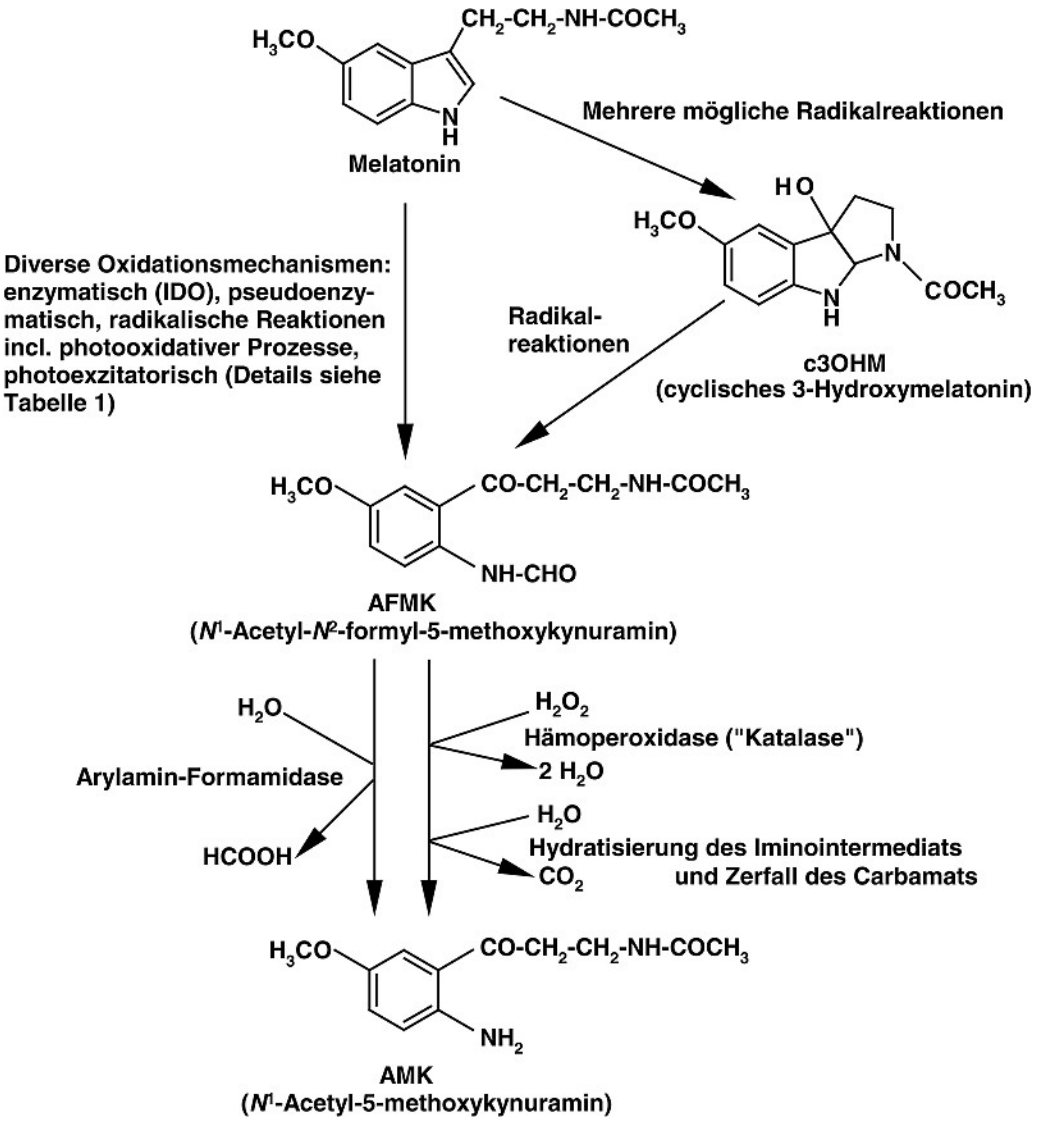

Abb. 2: Der kynurische Metabolismus des Melatonins

ist, ferner, dass im Gehirn die Aktivitäten dieses Enzyms normalerweise sehr niedrig liegen (Hardeland et al., 1996c). Erst bei Stimulation der Mikroglia im Zuge hirnentzündlicher Prozesse kommt es zur Induktion der IDO und damit zu nennenswerten Aktivitäten (Alberati-Giani et al., 1996; Reinhard und Flanagan, 1996; Saito und Heyes, 1996; MacKenzie et al., 1999). Die Herkunft der Kynuramine AFMK und AMK war hiermit also nicht ausreichend erklärt. Allerdings gab der Wirkmechanismus der IDO, welche ein Superoxidanion als Cosubstrat verwendet (statt molekularen Sauerstoffs wie die Tryptophan-2,3-dioxygenase) (Hayaishi, 1976; Hayaishi und Yoshida, 1979) den Anstoß für das Verständnis der nichtenzymatischen Pyrrolringspaltung (s. u.) von Melatonin (Hardeland et al., 1993c), welche nach derzeitiger Einschätzung die Erklärungslücke schließt.

Die Deformylierung von AFMK war zunächst auf die Wirkung einer unspezifischen, relativ weitverbeiteten Arylamin-Formamidase (früher auch Kynurenin-Formamidase) zurückgeführt worden (Hardeland et al., 1993d, 2003a, 2004). Tan et al. (2000b) konnten zeigen, dass die Deformylierung zum AMK auch über Hämoperoxidase möglich ist, durch Dehydrierung zum Imid, Hydratisierung zum Carbamat und dessen Zerfall. Dieser Stoffwechselweg ist insofern von Interesse, als er in Situationen stärkeren oxidativen Stresses bei erhöhten H_2O_2-Konzentrationen begünstigt sein könnte. Da AMK ein erheblich besserer Radikalfänger ist als AFMK (Ressmeyer et al., 2003) und da AMK als ein um Vielfaches potenterer Inhibitor der Cyclooxygenase als Acetylsalicylsäure (Kelly et al., 1984) u. a. antiinflammatorische Aktivitäten besitzt, mag diese Route der Deformylierung Bedeutung bei der lokalen Dämpfung von Entzündungsreaktionen besitzen, was jedoch noch im Einzelnen studiert werden müsste.

Die Bedeutung der genannten Kynuramine, auch des AFMK, mag nicht nur in der Verstoffwechselung und damit in der Eliminierung von Melatonin gesehen werden, ebenfalls nicht im Radikalfangen allein, sondern bedürfte zukünftiger weiterer Untersuchungen über ihre Funktionen als Signalsubstanzen. Immerhin stellen die Kynuramine eine eigene Klasse von biogenen Aminen dar, die diverse biologische Aktivitäten besitzen, von denen jedoch die Abgrenzung zu pharmakologischen Effekten nicht immer klar ist (Zusf.: Balzer und Hardeland, 1989; Hardeland und Fuhrberg, 1994). Für AFMK wurde gezeigt, dass dieses bei der Ratte die Resynchronisation des Melatonin-Rhythmus zu beschleunigen vermochte (Kennaway et al., 1989). Die Bedeutung dieses Befundes ist unklar geblieben und sein Hintergrund niemals weiter untersucht worden. Gleichwohl mag man hierin einen starken Hinweis auf eine Signalfunktion sehen.

Eine neue Richtung nahmen die Arbeiten zum Melatonin-Stoffwechsel durch die Entdeckung der nichtenzymatischen Bildung von AFMK. Ausgangspunkt hierfür waren Experimente über die Indolamin-2,3-dioxygenase bei dem marinen, biolumineszenten Dinoflagellaten *Lingulodinium polyedrum* (syn. *Gonyaulax polyedra*). Zwar ließ sich das Enzym anhand von Serotonin als Substrat nachweisen (Behrmann, 1989; Behrmann und Hardeland, 1996), jedoch nicht mit Melatonin. Allerdings reichten bereits moderate Lichtintensitäten aus, um in Gegenwart von niedermolekularen Extrakten des Einzellers Melatonin photokatalytisch zu AFMK umzusetzen (Behrmann, 1989; Hardeland et al., 1991, 1992, 1993c, 1995, 1996b; Behrmann et al., 1997; Gawron et al., 1997; Mueller und Hardeland, 1999c). Auch eine oxidative Zerstörung von Melatonin bei der Extraktion aus diesem Dinoflagellaten (Poeggeler et al., 1989, 1991; Poeggeler, 1992) wies auf nichtenzymatische Mechanismen hin. Als hilfreich für das Verständnis dieser Vorgänge erwies sich der Befund, dass bei Inkubation von Melatonin in einem Superoxidanionen-generierenden Xanthin/Xanthinoxidase-System Chemilumineszenz emittiert wird (Uemura und Kadota, 1984). In Analogie zu anderen chemi- und biolumineszenten Reaktionsmechanismen lag daher eine Pyrrolringspaltung über ein Dioxetan-Intermediat nahe. Da Melatonin ohne besondere Katalyse mit Superoxidanionen nur sehr mäßig reagiert (Fuhrberg und Hardeland, 1994; Hardeland und Fuhrberg, 1996a; Hardeland, 1997b; Poeggeler et al., 2002), erzeugen andere Oxidationssysteme eine wesentlich stärkere Chemilumineszenz, z. B. ein Hämin-katalysiertes schwach alkalisches H_2O_2-System (Fuhrberg, 1993; Fuhrberg und Hardeland, 1994; Hardeland et al., 1997b, 1998; Thuermann et al., 2001; Poeggeler et al., 2002). Das Hauptprodukt dieser Reaktion ist wiederum AFMK (Fuhrberg, 1993; Hardeland et al., 1993b; Burkhardt et al., 2001; Schoenke et al., 2001; Poeggeler et al., 2002). H_2O_2 ohne Katalysator oder ein Hämin-freies Xanthin/Xanthinoxidase-System haben sich hingegen als ziemlich ineffizient erwiesen (Fuhrberg, 1993; Fuhrberg und Hardeland, 1994), so dass die mit Lichtemission einhergehende AFMK-Bildung auf zweierlei andere Weise zustande kommt, zum einen über eine initiierende Interaktion mit höher reaktiven Radikalen und nachfolgender Kombination eines Indolylradikals mit Superoxidanionen, zum anderen auch durch pseudoenzymatische Reaktionen des Hämins. Beide dieser Möglichkeiten laufen offenbar im selben System nebeneinander ab (Hardeland et al., 1997b, 1998, 1999b; Thuermann et al., 2001; Poeggeler et al., 2002). Die durch die hochreaktiven Hydroxylradikale eingeleitete Komponente ist durch DMSO hemmbar, die pseudoenzymatische Komponente hingegen nicht. Ferner haben bereits die frühen Experimente gezeigt, dass Melatonin kein direkter Fänger von H_2O_2 ist, wie später angenommen (Tan et al., 2000a,b), was sich schließlich auch als falsch herausgestellt hat (Fowler et al., 2003).

Inzwischen sind diverse Mechanismen der radikalischen Melatoninoxidation entdeckt worden, die zum AFMK führen, einschließlich photooxidativer Prozesse (Tabelle 1). Auch Extrakte aus Geweben anderer Organismen als Dinoflagellaten, soweit sie photokatalytische Pig-

Tabelle 1: Diverse chemische Reaktionen führen zur Bildung von AFMK aus Melatonin

Katalysatoren und Reaktanten	Referenzen
(A) Enzymatische Mechanismen	
Indoleamin-2,3-dioxygenase; $O_2^{\cdot -}$ als Cosubstrat	Hayaishi, 1976; Hardeland et al., 1993c; Hardeland und Fuhrberg, 1996a
Hämoperoxidase (Meerrettich)/Compound III, Involvierung von $O_2^{\cdot -}$	Ximenes et al., 2001
Myeloperoxidase; H_2O_2	Ximenes et al., 2001; Rodrigues et al., 2003
(B) Pseudoenzymatische Mechanismen	
Hämin; $O_2^{\cdot -}$	Fuhrberg und Hardeland, 1994; Hardeland und Fuhrberg, 1996a; Hardeland et al., 1993a,c; Poeggeler et al., 2002; Hardeland und Poeggeler, 2002
Oxoferryl-Hämoglobin (aus Methämoglobin und H_2O_2)	Tesoriere et al., 2001
(C) Photocatalytische Mechanismen	
Protoporphyrinyl-Kationradikale; $O_2^{\cdot -}$	Uría et al., 1994a,b, 1995; Hardeland et al., 1995, 1996c; Hardeland und Fuhrberg, 1996a; Burkhardt et al., 2001
Anthranilyl-Radikale; $O_2^{\cdot -}$	Tomás-Zapico et al., 2001
Extrakte aus Dinoflagellaten; $O_2^{\cdot -}$	Behrmann, 1989; Hardeland et al., 1991, 1993b, 1995, 1996c; Hardeland und Poeggeler 1995; Gawron et al., 1997
Extrakte aus Phaeophyceen; $O_2^{\cdot -}$?	Hardeland, 1996c
Chlorophyll a (unter vorzugsweiser Bildung anderer Produkte)	Gawron und Hardeland, 1999
Singulett-Sauerstoff (mit geringer Effizienz)	Uría et al., 1994b
(D) Photoexzitations-Mechanismen	
Sichtbares Licht; O_2	Burkhardt et al., 2001; Tan et al., 2001; Tan, 2002
UV (in wässriger Lösung oder auf Trockensubstanz); O_2?	Behrmann et al., 1995; Burkhardt et al., 2001
(E) Ozonolyse	
Ozon	Hardeland und Fuhrberg, 1996a; Hardeland et al., 1997b
(F) Radikal-Mechanismen (soweit nicht enzymatisch, pseudoenzymatisch oder photokatalytisch)	
Elektronen-Abstraktion durch $^{\cdot}OH$ und nachfolgende Kombination mit $O_2^{\cdot -}$	Hardeland et al., 1993c; Behrmann et al., 1995; Hardeland und Fuhrberg, 1996; Tan et al., 2001, 2002; Burkhardt et al., 2001; Poeggeler et al., 2002
Elektronen-Abstraktion durch $CO_3^{\cdot -}$ und nachfolgende Kombination mit $O_2^{\cdot -}$	Hardeland et al., 2001b, 2003
(G) Radikalische Reaktionen des cyclischen 3-Hydroxymelatonins (c3OHM)	
Oxidation von c3OHM durch Elektronen-abstrahierende Radikale in Gegenwart von Wasser	Tan, 2002; Tan et al., 2003a

mente enthalten, bewirken Melatonindestruktion und AFMK-Bildung, von Braunalgen über Schnecken bis hin zu den HARDERschen Drüsen von Hamstern (Uría et al., 1994a, 1995; Hardeland, 1996c; Behrmann et al., 1997). Relativ gut verstanden sind die von Protoporphyrin IX vermittelten photooxidativen Prozesse (Uría et al., 1994a,b; Hardeland et al., 1995; Hardeland und Fuhrberg, 1996a; Burkhardt et al., 2001): Die Reaktionen verlaufen quantitativ vor allem über Elektronentransferreaktionen zwischen Protoporphyrinyl-Kationradikalen und Melatonin, gefolgt von Kombination des Melatonyl-Kationradikals mit einem Superoxidanion. Der alternative Weg einer Addition von Singulettsauerstoff spielt dagegen eine geringere Rolle. Autoxidation und höher reaktive Radikale sind nicht eingeschaltet, denn diese Prozesse laufen auch in reinem DMSO oder Ethanol ab. Bemerkenswerterweise führt der photokatalytische Umsatz von Melatonin mit Protoporphyrin IX in solchen wasserfreien oder -armen Systemen nahezu ausschließlich zum AFMK, während andere Produkte in nennenswertem Umfang erst nach vie-

len Stunden entstehen. Ebenfalls beachtenswert ist der Befund, dass eine derartige, nahezu ausschließlich auf das kynurische Produkt hinauslaufende Reaktion für Strukturanaloge des Melatonins wie 5-MT, *N*-Acetylserotonin, Serotonin, *N*-Acetyltryptamin oder Tryptamin nicht zutrifft; bei allen diesen werden, selbst in einem ethanolischen System, immer mehrere verschiedene Produkte gebildet (J. Rosen und R. Hardeland, unveröff. Daten). Eine Präferenz des kynurischen Wegs im Falle von Melatonin im Vergleich zu seinen Strukturanalogen wurde auch bei anderen radikalischen Reaktionen gesehen (Poeggeler et al., 2002).

Der photokalatylische Umsatz von Melatonin zu AFMK sollte als ein nichtenzymatischer physiologischer Stoffwechselvorgang angesehen werden, welcher zumindest bei lichtexponierten Organismen oder Organen vorkommt, soweit diese ausreichend hohe Melatonin-Konzentrationen am Tage aufweisen, was zumindest für Dinoflagellaten, wahrscheinlich auch viele Pflanzen sowie Organe der Lichtperzeption gewisser Mollusken und Crustaceen (s. o.) und die HARDERsche Drüse der Nager gilt. Auch andere radikalische Wege der AFMK-Bildung sollten prinzipiell als physiologisch angesehen werden, wenn auch deren Raten noch zu bestimmen bleiben, denn im Labor gesehene Reaktionen freier Radikale sind grundsätzlich auch Species-unspezifisch in den Organismen möglich. Wichtig erscheint die Feststellung, dass mit der Entstehung von AFMK radikalische Reaktionsketten terminiert werden (Hardeland et al., 1995; Behrmann et al., 1995; Hardeland und Fuhrberg, 1996a; Hardeland und Poeggeler, 2002; Poeggeler et al., 2002; Hardeland et al., 2003b). Dies mag eine von mehreren grundlegenden Voraussetzungen für die vielfältig beobachteten protektiven Effekte des Melatonins sein. Auch in dieser Hinsicht ist der präferentiell kynurische Oxidationsweg des Melatonins von potentieller Bedeutung.

An dieser Stelle ist eine Bemerkung zu den sonstigen aus Melatonin hervorgehenden Produkten angebracht, die in verschiedenen chemischen Oxidationssystemen entstehen. Die Intention etwa eines Chemikers, eine Substanz wie Melatonin ausschließlich – in einem so „reinen" System wie möglich – mit einer einzigen Radikalspecies reagieren zu lassen, führt leicht zu unbiologischen Schlussfolgerungen. Selbstverständlich erhält man bei quantitativer Dominanz höchstreaktiver Radikale wie etwa Hydroxylradikalen vorzugsweise hydroxylierte Produkte, einschließlich des 6-Hydroxymelatonins, aber auch weitere mit Substituenten an allen freien Positionen einschließlich der sich daraus ergebenden Umlagerungs- und Dimerisierungsprodukte. Auch wir haben in solchen Reaktionssystemen eine Vielzahl von Produkten des Melatonins gefunden (Burkhardt et al., 2001). In biologischem Material ist eine solche Dominanz höchstreaktiver Radikale aber üblicherweise nicht gegeben. Das bei weitem abundanteste Radikal ist dort, abgesehen vielleicht von eher unbiologischen Eingriffen wie Exposition gegenüber radikalgenerierenden Toxinen oder hochdosierter Röntgenstrahlung, das Superoxidanion. Nachdem also ein hochreaktives Radikal wie z. B. ein Hydroxylradikal eine Reaktion mit einem organischen Molekül eingegangen ist und Letzteres in ein organisches Radikal verwandelt hat, ist es bei weitem wahrscheinlicher, dass dieses mit einem Superoxidanion als einem zweiten Hydroxylradikal kombiniert. Die Bildung von AFMK statt eines hydroxylierten Melatonin-Metaboliten erscheint somit als die biologisch wahrscheinlichere Variante des nichtenzymatischen Umsatzes.

Das Fangen von Hydroxylradikalen durch Melatonin (Tan et al., 1993, 2002) hat der Forschung über die Bedeutung dieser Substanz erhebliche Impulse gegeben. Dies war der Ausgangspunkt für eine Vielzahl von Untersuchungen über die protektive Rolle des Melatonins, die hier aber nicht in voller Breite zum Gegenstand gemacht werden soll. Experimente zum Fangen von Hydroxylradikalen führten ferner zur Entdeckung eines neuen Metaboliten, des cyclischen 3-Hydroxymelatonins (c3OHM; Abb. 2) (Tan et al., 1998). Diese Substanz ist insbesondere bei hohen Raten der Hydroxylradikal-Generierung zu finden und lässt sich bei hohem oxidativem Stress auch im Urin nachweisen. Dies steht im Einklang mit der ursprünglichen Annahme, dass Melatonin bei der Bildung dieser Substanz mit zwei Hydroxylradikalen reagiert. Inzwischen hat sich herausgestellt, dass c3OHM auch auf andere Weise, in Abwesenheit hochreaktiver Radikale, entstehen kann. Allerdings handelt es sich in diesem Fall um Reaktionen mit einem unphysiologischen, chemisch produzierten Radikal, dem resonanzstabilisierten und daher niederreaktiven ABTS-Kationradikal (Tan, 2002; Tan et al., 2003a). Gleichwohl deuten sich durch diese Befunde weitere Möglichkeiten auch der physiologischen c3OHM-Entstehung an, die durch andere organische Radikale katalysiert werden könnten. Auch c3OHM vermag Radikale zu fangen. Überraschenderweise kann hierbei ebenfalls AFMK entstehen (Tan, 2002; Tan et al., 2003a). Der Weg über das c3OHM ist jedoch für die AFMK-Entstehung keineswegs obligatorisch, denn hierfür wird Wasser benötigt (Tan, 2002; Tan et al., 2003) und AFMK-Bildung wurde auch in wasserfreien, aprotischen Systemen festgestellt (Uría et al., 1994b; Hardeland et al., 1995; Burkhardt et al., 2001). Auch ist bei manchen Wegen der Entstehung von AFMK kein c3OHM nachweisbar (Burkhardt et al., 2001).

Der nichtenzymatische Metabolismus des Melatonins stellt, wie die geschilderten Befunde zeigen, ein facettenreiches Gebiet dar, welches einige Überraschungen zu Tage gebracht hat und noch bei weitem nicht zum Abschluss gekommen ist.

Methoxyindole bei Dinoflagellaten

Außerhalb der Wirbeltiere liegen die meisten Informationen über Melatonin, seine Biosynthese, seinen Metabolismus, über Tagesrhythmik und andere dynamische Ände-

rungen sowie die Rolle seines Folgeprodukts 5-MT bei Dinoflagellaten vor. Dies betrifft in erster Linie *Lingulodinium polyedrum*, aber darüber hinaus sind auch diverse andere Arten unterschiedlicher Gattungen studiert worden (Hardeland, 1999). Bei *L. polyedrum* zeigt das Melatonin einen ausgeprägten circadianen Rhythmus mit einem steilen Anstieg zu Beginn der Dunkelzeit und einem darauf folgenden kontinuierlichen Absinken bis zum Morgen (Poeggeler et al., 1991; Poeggeler, 1992; Hardeland et al., 1995) (Abb. 3). Der Rhythmus des Melatonins persistiert im Dauerdunkel (Balzer et al., 1993). Während des Abfalls von Melatonin im Verlaufe der Nacht nimmt die Konzentration von 5-MT zu und erreicht ein Maximum wenige Stunden vor Ende der Dunkelphase (Poeggeler, 1992; Balzer et al., 1993; Hardeland et al., 1995, 1997a, 1999a). Nächtlicher Verlauf und Maximum von 5-MT finden ihre Entsprechung in der Dynamik der Arylacylamidase-Aktivität (Hardeland und Fuhrberg, 1996b; Hardeland et al., 1997a, 1999a). Ferner koinzidiert der Gipfel des 5-MT mit jenem der spontanen Lichtemission bei diesem biolumineszenten Organismus (Hardeland et al., 1999a). Die Messungen von Melatonin haben mit immunologischen Verfahren (zwei RIA-Varianten: konventioneller RIA und fluorescence proximity assay; ferner Nachweis von Parallelität bei serieller Verdünnung) und diversen Varianten von HPLC mit elektrochemischer und mit Fluoreszenzdetektion sowie unter verschiedenen Laufbedingungen (bez. Flussraten, Säulen, Eluenten) (Poeggeler et al., 1991; Poeggeler, 1992; Fuhrberg, 1997) identische Werte ergeben. Die Wiederfindungsraten wurden in einer Vielzahl von Variationen bestimmt (Poeggeler, 1992; Poeggeler und Hardeland, 1994a,b). Die für Pflanzen angeführten methodischen Probleme (s. o.) sind demnach bei dem Dinoflagellaten ausgeräumt. 5-MT wurde durch entsprechende HPLC-Varianten identifiziert, in seiner Wiederfindung bestimmt und konnte üblicherweise gemeinsam mit Melatonin und – sofern ausreichend gebildet – 5-Methoxytryptophol im selben Lauf quantifiziert werden (Fuhrberg et al., 1996c, 1997; Fuhrberg, 1997). Die zellulären Konzentrationen von Melatonin und 5-MT sind erheblich. Unter unstimulierten Bedingungen liegen die Maxima im mikromolaren Bereich, die Minima zwischen 10^{-8} und 10^{-7} M. In Reaktion auf Temperaturreize können die Spiegel hingegen um Größenordnungen steigen (s. u.).

Effekte des Melatonins wurden bei *L. polyedrum* gefunden, doch ist die Abgrenzung von jenen des 5-MT nur in wenigen Fällen möglich. In erster Linie wären hier zu nennen eine Induktion der Arylacylamidase, welche aber erst bei hohen Konzentrationen auftritt (Hardeland und Fuhrberg, 1996c; Hardeland et al., 1997a), und eine Unterdrückung der Tryptophan-Hydroxylase (Hardeland

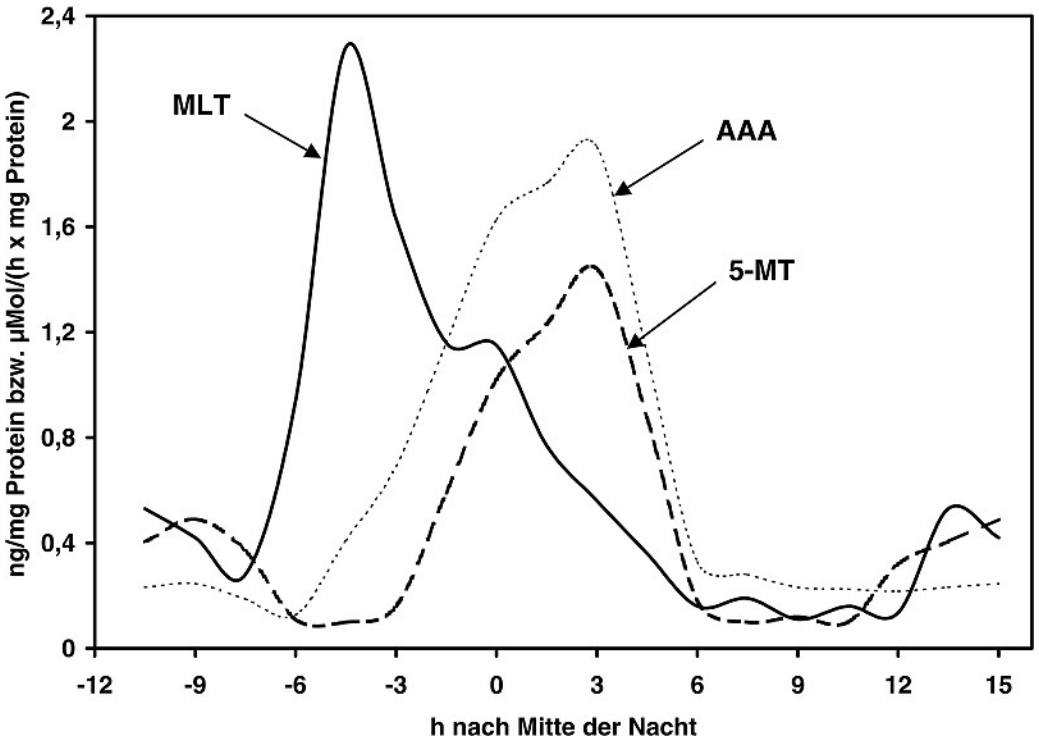

Abb. 3: Die circadianen Rhythmen der Konzentrationen von Melatonin (MLT) und 5-Methoxytryptamin (5-MT) sowie der Aktivität der Arylacylamidase (AAA) bei dem marinen, biolumineszenten Dinoflagellaten *Lingulodinium polyedrum* (schematisierte Zusammenfassung von Daten aus: Poeggeler et al., 1991; Poeggeler, 1992; Hardeland et al., 1997a). Dargestellt sind Ergebnisse aus einem Hell-Dunkel-Wechsel von 12 : 12 h.

et al., 1997a). In letzterer Hinsicht erinnert der Melatonin-Effekt funktionell an die Rückkopplung auf die Indolaminsynthese bei *Drosophila* (Primus und Brown, 1994; Seong et al., 1998), auch wenn sich das Enzym von *Lingulodinium* in Bezug auf den Pterin-Cofaktor von jenem der Wirbeltiere und Insekten unterscheidet (Burkhardt und Hardeland, 1995). Ferner wurde – im Kontrast zu Befunden bei Säugern und Vögeln – eine Herunterregulierung der Superoxiddismutase (SOD) durch Melatonin gefunden, sofern das Indolamin während der Photophase gegeben wurde, in der das Enzym sein Maximum erreicht (Burkhardt und Hardeland, 1997; Antolín et al., 1997). Dieser Effekt eines für die Nachtphase typischen Signalmoleküls auf ein diurnal erhöhtes Enzym mag als rein chronobiologisch begründet angesehen werden und ist von der – stimulatorischen – Regulation der SOD bei Wirbeltieren zu unterscheiden. In einem protektiven Kontext wie bei Säugern und Vögeln wird die SOD bei Dinoflagellaten durch Melatonin nicht heraufreguliert.

Ob derartige Effekte von spezifischen Melatonin-Rezeptoren vermittelt werden, bedarf noch des direkten Beweises. Bindung von 2-(^{125}I)-Iodomelatonin ließ sich mit den für membrangebundene Rezeptoren der Wirbeltiere üblichen Prozeduren weder am Tage noch in der Nacht zeigen (Masson-Pévet et al., 1997). Andererseits lassen sich transiente intrazelluläre Akkumulationen von exogen gegebenem unmarkierten Melatonin nur im Sinne von existierenden Bindungsstellen interpretieren (Mueller und Hardeland, 1999a; Mueller et al., 2000).

Sehr viel mehr als über direkte Melatonin-Effekte ist bei Dinoflagellen über die Wirkungen seines Metaboliten 5-MT bekannt. 5-MT stellt insbesondere einen starken Stimulator der Biolumineszenz dar (Balzer und Hardeland, 1991a,b; Balzer et al., 1991; Hardeland und Balzer, 1993; Hardeland et al., 1995; Burkhardt et al., 1997b). Unter den Indolaminen des Melatonin/5-MT-Synthesewegs ist 5-MT die einzige Substanz, die einen solchen Effekt bereits in niedrigen Konzentrationen hervorruft. Allein das außerhalb dieses Weges stehende Analog *N,N*-Dimethyl-5-MT, über dessen eventuelle Existenz bei Dinoflagellaten zu wenig bekannt ist, erwies sich als ähnlich wirksam (Balzer und Hardeland, 1991a; Balzer et al., 1991; Hardeland und Balzer, 1993). Indolalkohole wie 5-Hydroxytryptophol und 5-Methoxytryptophol als Abbauprodukte der Indolamine zeigten keine nennenswerten Stimulationen. Metabolite des Indolamin-Biosynthesewegs einschließlich Melatonin stimulierten die Biolumineszenz nur dann, wenn sie in hohen Konzentrationen gegeben wurden, die ein Ansteigen des 5-MT-Spiegels erwarten ließen (Hardeland und Balzer, 1993; Burkhardt et al., 1997b).

5-MT ist im Übrigen auch bei anderen biolumineszenten Dinoflagellaten in entsprechender Weise wirksam (Mbachu und Hardeland, 1997; Hardeland, 1999), mit Ausnahme von *Pyrocystis*-Arten, die durch eine Coccoidhülle vor dem raschen Eindringen des 5-MT geschützt sind (R. Hardeland, unveröff. Daten).

Da die Gipfel der 5-MT-Konzentration und der spontanen Biolumineszenz am Ende der Nacht koinzidieren, stellte sich die Frage, ob 5-MT dieses sehr auffällige Maximum, das für viele chronobiologische Fragen als interne Zeitmarke verwendet worden ist, direkt auslöst. Die Antwort hierauf ergab sich aus Studien, in denen der Stoffwechselweg der Indolamin-Synthese blockiert wurde (Tabelle 2). Drei verschiedene Inhibitoren der Tryptophan-Hydroxylase, *p*-Chlorophenylalanin, *p*-Fluorophenylalanin und 5-Fluorotryptophan vermochten den Gipfel der spontanen Biolumineszenz zu unterdrücken. Das Maximum ließ sich jedoch restituieren, wenn nach der Blockade ein Metabolit des Synthesewegs gegeben wurde, der die Bildung von 5-MT erlaubt, vom 5-Hydroxytryptophan bis hin zum Melatonin, nicht hingegen substituierte Tryptophole, welche nicht zum 5-MT führen (Burkhardt und Hardeland, 1996; Burkhardt et al., 1997a,b; Hardeland und Burkhardt, 1997; Burkhardt, 1998; Hardeland et al., 1999a). 5-MT als direkter Stimulator der Biolumineszenz ist unter diesen Bedingungen ebenfalls wirksam. Für die Ausbildung des Biolumineszenz-Maximums ist 5-MT daher offenbar erforderlich.

Der Gipfel der spontanen Biolumineszenz wird ferner durch Oxidantien unterdückt, wenn diese so dosiert werden, dass sie ausschließlich subletalen oxidativen Stress auslösen. Dies wurde zunächst dosisabhängig für Paraquat demonstriert (Antolín und Hardeland, 1997; Hardeland und Coto-Montes, 2000), später aber auch für andere Oxidotoxine gefunden (Burkhardt, 1998; Hardeland et al. 1999a; Ressmeyer et al., 2003). Die Unterdrückung beruht offenbar auf dem oxidativen Verbrauch von Melatonin, welches mit den generierten freien Radikalen reagiert, und der daraus resultierenden Depletion von 5-MT (Burkhardt, 1998; Hardeland et al., 2000, 2003a). Nebenher mag auch 5-MT oxidativ zerstört werden, doch ist dieses weniger reaktiv als Melatonin (Poeggeler et al., 1996, 2002). Als eine generelle Konsequenz seiner leichten Oxidierbarkeit wird Melatonin unter Bedingungen oxidativen Stresses verbraucht; Folgeeffekte der Beeinträchtigung Melatonin-abhängiger physiologischer Funktionen sind auch bei anderen Organismen einschließlich der Wirbeltiere zu vermuten (Hardeland et al., 2000, 2003a). Bei *Lingulodinium* kann ein durch Paraquat oder Buthioninsulfoximin in subletaler Dosierung unterdrückter Gipfel der spontanen Biolumineszenz durch exogenes Melatonin restituiert werden, und zwar in Konzentrationen, die bei alleiniger Gabe von Melatonin die Lichtemission noch nicht stimulieren (Abb. 4) (Antolín und Hardeland, 1997; Burkhardt, 1998; Hardeland et al., 1999a; Hardeland und Coto-Montes, 2000).

Der Mechanismus, über den 5-MT die Stimulation der Biolumineszenz bewirkt, ist in einem wesentlichen Grundzug verstanden, doch hat sich noch kein Bindungsprotein identifizieren lassen. Die Ansteuerung der Lichtemission erfolgt über fortgeleitete intrazelluläre Protonenpotentiale, welche sich an der Membran eines

Tabelle 2: Unterdrückung des circadianen Maximums der spontanen Biolumineszenz von *Lingulodinium polyedrum* durch Hemmung der Tryptophanhydroxylase und dessen Restitution durch die Metabolite des Melatonin/5-MT-Wegs

Inhibitor	**Indolmetabolit**	**Biolumineszenz** (% der Kontrolle)
–	–	100
p-Chlorophenylalanin 100 µM	–	30,7
p-Fluorophenylalanin 100 µM	–	26,7
5-Fluorotryptophan 1 mM	–	36,1
5-Fluorotryptophan 3 mM	–	12,6
p-Chlorophenylalanin 100 µM	5-Hydroxytryptophan 20 µM	69,0
p-Fluorophenylalanin 100 µM	5-Hydroxytryptophan 20 µM	59,8
5-Fluorotryptophan 3 mM	5-Hydroxytryptophan 20 µM	56,6
p-Chlorophenylalanin 100 µM	Serotonin 20 µM	79,4
–	*N*-Acetylserotonin 100 µM	109,9
p-Chlorophenylalanin 100 µM	*N*-Acetylserotonin 100 µM	102,5
–	Melatonin 100 µM	136,4
p-Chlorophenylalanin 100 µM	Melatonin 100 µM	104,6
–	5-Methoxytryptamin 1 µM	125,0
–	5-Methoxytryptamin 20 µM	320,5
p-Chlorophenylalanin 100 µM	5-Methoxytryptamin 1 µM	110,0
p-Chlorophenylalanin 100 µM	5-Methoxytryptamin 20 µM	291,5
p-Chlorophenylalanin 100 µM	5-Hydroxytryptophol 100 µM	34,2
p-Chlorophenylalanin 100 µM	5-Methoxytryptophol 100 µM	30,8

Die Inhibitoren der Tryptophanhydroxylase wurden zu Beginn der Dunkelphase (Zeitgeber-Zeit 12 h) zugegeben, die Indolverbindungen 5 h später (Zeitgeber-Zeit 17 h). Die Biolumineszenz wurde zum Zeitpunkt des circadianen Maximums ausgewertet. (Zusammenfassung nach Hardeland und Burkhardt, 1997; für Kurven und weitere Details s. Burkhardt et al., 1997a,b; Burkhardt, 1998; Hardeland et al., 1999a.)

Systems von sauren Vakuolen ausbreiten. Der Übertritt von Protonen in die cytoplasmatisch gelegenen Mikroquellen der Biolumineszenz, die sogenannten Szintillons, bewirkt dort eine lokale Ansäuerung und hierdurch eine Freisetzung des Dinoflagellaten-Luciferins aus einem Luciferin-bindenden Protein (Morse et al., 1990). Jede Stimulation der Biolumineszenz reflektiert also Protonentransfer auf die cytoplasmatische Seite. Bei höherer Dosierung des 5-MT kann die cytoplasmatische Acidifizierung durch pH-abhängige Fluoreszenz nachgewiesen werden (Hardeland et al., 1995). Diese Beobachtung gewann besondere Bedeutung für das Verständnis eines weiteren Effekts, der u. U. von Melatonin, sehr leicht aber durch 5-MT ausgelöst werden kann, der Induktion asexueller Cysten. Diese sogenannten Pellikelcysten stellen Ruhestadien dar, welche unter ungünstigen Umgebungsbedingungen gebildet werden. Nach der Entdeckung von Melatonin bei *Lingulodinium* hatte sich die Frage gestellt, ob diese Substanz als Mediator der Dunkelheit fungieren und gegebenenfalls photoperiodische Effekte auslösen könne. In der Tat waren asexuelle Cysten durch Kurztage induzierbar, dies aber nur bei leicht abgesenkter Temperatur (15 °C statt 20 °C) (Balzer und Hardeland, 1991c, 1992, 1993b; Hardeland und Balzer, 1993; Hardeland, 1993; Hardeland et al., 1995). Diese Effekte ließen sich durch Melatonin nachmachen, wenn dieses, ebenfalls bei 15 °C, unter photoperiodisch gerade noch nicht cysteninduzierenden Bedingungen vor Beginn der Scotophase gegeben wurde. Solche Befunde legten eine subjektive Verlängerung der Scotophase durch das vor „Licht-aus“ verabreichte Melatonin nahe. Auch der Umstand, dass eine zeitweilige Überführung des circadianen Oszillatorsystems in einen arrhythmischen Zustand die Zellen gegenüber methoxylierten Indolaminen desensitisierte, sprach für eine Interpretation im Sinne der circadianen Zeitmessung (Hardeland et al., 1993a; Hardeland und Behrmann, 1994). Im Gegensatz zur konditionalen Wirkung des Melatonins wird hingegen die Cystenbildung durch 5-MT weitgehend unabhängig von Temperatur und Photoperiode ausgelöst (Balzer und Hardeland, 1991c, 1992, 1993a,b,c, 1996b). Die Schlussfolgerung eines Melatonin-Effekts über seinen Metaboliten war daher nahe liegend und hat sich auch bestätigt. Hierbei lässt sich eine Wirkungskette identifizieren, die die cytoplasmatische Ansäuerung unter dem Einfluss von 5-MT einschließt. Dies gründet sich nicht allein auf die gemessene Absen-

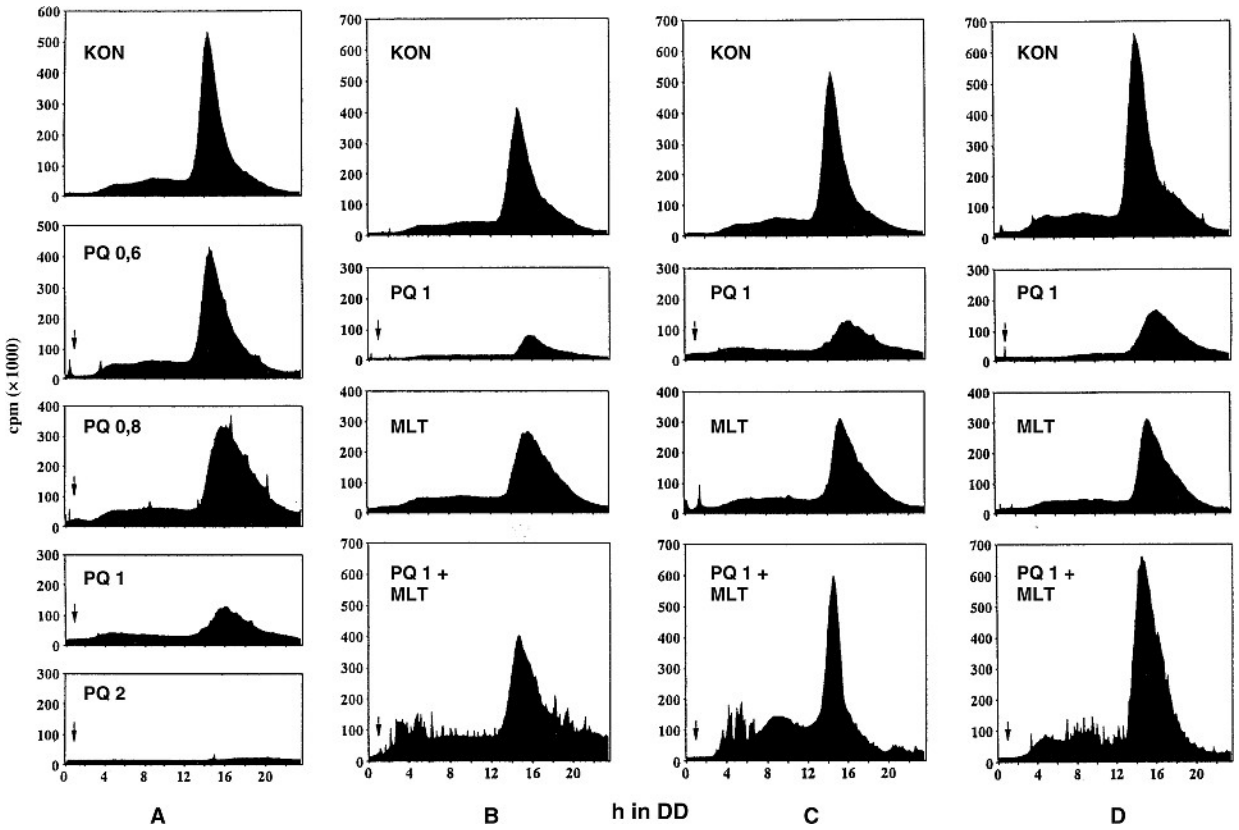

Abb. 4: Inhibition des circadianen Maximums der spontanen Biolumineszenz bei *Lingulodinium polyedrum* durch subletalen oxidativen Stress unter dem Einfluss von Paraquat und Restitution durch Melatonin in einer für die Lichtemission nichtstimulatorischen Konzentration. A: Dosisabhängigkeit der Wirkung von Paraquat (PQ; nachfolgende Zahlen: Konzentration [mM]); B, C, D: drei unabhängige Serien zur Restitution des Maximums in unterschiedlichen Kulturen (KON: Kontrolle; PQ 1: Paraquat 1 mM; MLT: Melatonin 250 µM). Die Zellen waren um ZT 6 (Zeitgeber-Zeit 6 h) in Dauerdunkel (DD) überführt worden. Paraquat wurde 1 h nach Transfer in DD zugegeben (Pfeile), Melatonin zum Zeitpunkt des Transfers. (Zusammenfassung von Daten aus Antolín und Hardeland, 1997)

kung des cytoplasmatischen pH-Wertes, sondern auch darauf, dass alle Behandlungen, die die Protonentranslokation in erheblichem Maße stimulieren, nicht nur starke Erhöhungen der Biolumineszenz bewirken, sondern auch die Encystierung auslösen. Dies schließt so unterschiedliche Einflüsse wie Behandlung mit Adrenalin, mit Protonophoren und intensiven mechanischen Stress ein (Balzer und Hardeland, 1991d, 1993b; Hardeland und Balzer, 1993; Hardeland et al., 1995). Auch Inhibitoren der Monoamin-Oxidase, die die Konzentration von 5-MT erhöhen (Fuhrberg, 1997), steigern die Lichtemission und bewirken Encystierung (Balzer und Hardeland, 1991b,e; Hardeland und Balzer, 1993; Hardeland et al., 1995). Da ein erniedrigter pH charakteristisch für Ruhestadien vieler Organismen ist, von Sporen über unbefruchtete Eier bis zu Eiern im Entwicklungsarrest (vgl. Hardeland und Balzer, 1993), ist das beobachtete Absinken des cytoplasmatischen pH im Kontext der Cysteninduktion nicht unplausibel. Die photoperiodisch oder durch 5-MT ausgelöste Encystierung stellt im Übrigen, vielleicht wegen der pH-Änderung, einen die Zelle geradezu dominierenden Prozess dar, der andere Vorgänge überrennt. So konnte bei mitotischen Zellen von *Lingulodinium* Encystierung erzwungen werden, bevor die Zellteilung abgeschlossen war, mit dem Ergebnis von Doppelcysten, deren Zellen noch über eine Cytoplasmabrücke verbunden waren (Behrmann et al., 1994; Behrmann und Hardeland, 1995).

Kritisch für die Encystierung unter dem Einfluss von Kurztagen oder Melatonin, beides in Verbindung mit leicht abgesenkter Temperatur, erscheint somit die Bildung von 5-MT in cysteninduzierenden Konzentrationen zu sein (Balzer und Hardeland, 1993c). Die ursprüngliche Idee, dass es nur zu einer erhöhten Metabolisierung von Melatonin kommen müsse, wurde durch Messungen der Indolamine in überraschender Weise korrigiert. Allein eine Absenkung der Temperatur von 20 °C auf 15 °C bewirkte eine Steigerung des Melatonins um Größenordnungen. Dieser Effekt tritt binnen weniger Stunden ein und findet auch im Licht statt (Fuhrberg und Hardeland, 1995b, 1997; Fuhrberg et al., 1996c, 1997; Fuhrberg, 1997). Das Melatonin wird jedoch nicht tonisch heraufreguliert, sondern unterliegt weiterhin einer ausgeprägten circadianen Dynamik, so dass photoperiodische und Temperatursignale miteinander integriert werden (Fuhrberg

und Hardeland, 1995a; Fuhrberg, 1997). Am Beginn der Scotophasen erscheinen sehr steile, aber kurzzeitige Gipfel, die über die Induktion der Arylacylamidase (s. o.) zur raschen Bildung hoher Konzentrationen von 5-MT führen, welche für die Cystenbildung überschwellig sind (Fuhrberg et al., 1996c, 1997; Fuhrberg, 1997).

Die geschilderte Dynamik der methoxylierten Indolamine führt offenbar nur dann zu cysteninduzierenden Quantitäten von 5-MT, wenn die Scotophase lang genug ist (vgl. Abb. 4). Eine Cysteninduktion durch exogenes Melatonin wäre nach den geschilderten Befunden so zu interpretieren, dass eine temperaturbedingte, aber noch unzureichende Akkumulation von Melatonin so weit erhöht wird, dass es zu nachfolgenden überschwelligen 5-MT-Spiegeln kommt. Die kritische Photoperiode lässt sich also durch eine subkritische mit zusätzlichem, exogenem Melatonin ersetzen.

Es ist der besonderen Betonung wert, dass die beobachteten Temperatureffekte auf den Melatonin-Spiegel bei weitem die stärksten sind, die bislang bei Organismen gefunden wurden. Grundsätzlich ist aber ein Zusammenwirken von niedriger Temperatur und Kurztag unter natürlichen Bedingungen plausibel und durch eine Vielzahl von Daten belegt – auch unter dem Stichwort des Thermophotoperiodismus (Balzer und Hardeland, 1996b); nur wurde dies nie zuvor in einem solchen Ausmaß auf der Melatonin-Ebene gezeigt. Bringt man bei *Lingulodinium polyedrum* die Einflüsse von Temperatur und Photoperiode in einen autökologischen und zugleich chronobiologischen Kontext, so ist noch ein weiterer Parameter zu berücksichtigen, die Konzentration des Nitrats im Seewasser. Dieser Dinoflagellat unternimmt im Tageszyklus ausgeprägte Vertikalwanderungen, bei denen er für Zwecke der Photosynthese tags in der Nähe der Wasseroberfläche erscheint, nachts in das Tiefenwasser absinkt, um dort Nitrat als Stickstoffquelle aufzunehmen (Roenneberg, 1996; Rehman et al., 1996; Roenneberg und Rehman, 1996). Nitrat zeigt jedoch nicht nur, wie von jenen Autoren beschrieben, Effekte auf die circadiane Rhythmik, sondern erniedrigt dosisabhängig die nächtlichen Maxima von Melatonin und 5-MT (Fuhrberg und Hardeland, 1996a; Fuhrberg, 1997). Damit ergibt sich für die Zellen das folgende Bifurkationsschema der saisonalen Entscheidung zwischen Verbleib im aktiven Zustand und dem Übergang in das Ruhestadium einer Cyste (Hardeland et al., 2001a), welche adverse Bedingungen zu überdauern vermag, aber aus der Produktion von Biomasse und damit der Vermehrung der Art vorübergehend aussteigt (Abb. 5): Ist die Temperatur nicht erniedrigt, so verbleiben die Zellen unter Kurztag- wie Langtagbedingungen im aktiven Zustand. Niedrige Temperatur (z. B. 15 °C) führt zur Melatonin- und nachfolgenden 5-MT-Erhöhung, die aber nur im Kurztag überschwellig werden kann. Findet sich im Tiefenwasser viel Nitrat, also eine abundante Stickstoffquelle, so scheint es für die Zellen (die Population der Species) lohnender, produktiv zu bleiben: Die Erhöhung von Melatonin und 5-MT wird antagonisiert, Encystierung verhindert. Erst bei Kombination von niedriger Temperatur, Kurztag und Nitratmangel wird für die Zellen eine Encystierung vorteilhaft und über die methoxylierten Indolamine eingeleitet.

Das Bewusstsein der ökophysiologischen Basis derartiger Entscheidungswege führt auch zu der Erkenntnis, dass der für *L. polyedrum* geschilderte Mechanismus für andere Dinoflagellaten-Species oder auch deren geographische Ökotypen keineswegs gelten muss. Bei einer tropischen, aus indonesischen Gewässern isolierten Zell-Linie von *Amphidinium carterae* führt nicht die Erniedrigung, sondern die Erhöhung der Temperatur (30 °C) zur Akkumulation von Melatonin und 5-MT, desgleichen von 5-Methoxytryptophol (Fuhrberg und Hardeland, 1996b; Fuhrberg, 1997). Hohe Temperaturen werden von Dinoflagellaten generell schlecht vertragen, wie auch das Ausbleichen der „Zooxanthellen“ (Dinoflagellaten als Symbionten) beim Korallensterben zeigt, und es mag für tropische Arten eine größere Gefahr hiervon ausgehen als von einer Temperaturerniedrigung.

Cysteninduktion durch 5-MT – und gelegentlich auch durch Melatonin – wurde auch bei diversen anderen Dinoflagellaten gezeigt, ist aber keineswegs bei allen Arten möglich (Wong und Wong, 1994; Hardeland, 1996b, 1999; Tsim et al., 1997, 1998). Bei einer Reihe von Species und Stämmen, insbesondere aus den Gattungen *Prorocentrum* und *Gymnodinium*, bewirkte 5-MT eine Immobilisierung der Zellen, aber keine Ausbildung von Cystenhüllen. Auch hier mag es sich um Ruhestadien handeln. Bei dem Korallensymbionten *Symbiodinium* wurde die Bildung coccoidaler, cystenähnlicher Stadien unter dem Einfluss von 5-MT beobachtet (Reece und Wong, 1995); die ökologische Bedeutung dieser Reaktion ist unbekannt.

Bei Arten der Gattungen *Alexandrium* und *Crypthecodinium* wurde ferner versucht, Signalwege der Methoxyindole auszuklären. Die Ergebnisse deuteten teils auf eine Rolle von cAMP hin (Tsim et al., 1996a), teils auf eine solche von Phospholipase C, Inositol-*tris*-phosphat und Calcium (Tsim et al., 1997, 1998). Ein Problem dieser Studien liegt jedoch in den von jenen Autoren verwendeten extrem hohen Dosierungen der Indolamine, welche bei den von uns studierten Dinoflagellaten bereits toxisch sind (Hardeland und Balzer, 1993). Die beobachteten Erhöhungen zweier sehr unterschiedlich regulierter *second-messenger*-Systeme, für sich genommen schon ungewöhnlich, müssten daher gegenüber Folgen von Membranschädigungen abgegrenzt werden. Auf die Einschaltung von G-Proteinen in die Indolamin-Wirkungen wurde auf der Basis ADP-ribosylierender Toxine und der Verabreichung von Mastoparanen geschlossen (Tsim et al., 1996a,b). Cysteninduktion durch Mastoparan wurde bei zwei *Lingulodinium*-Arten bestätigt (Fuhrberg, 1997; Mbachu und Hardeland, 1999), doch besteht angesichts diverser Auslöser der Encystierungsreaktion, z. B. über

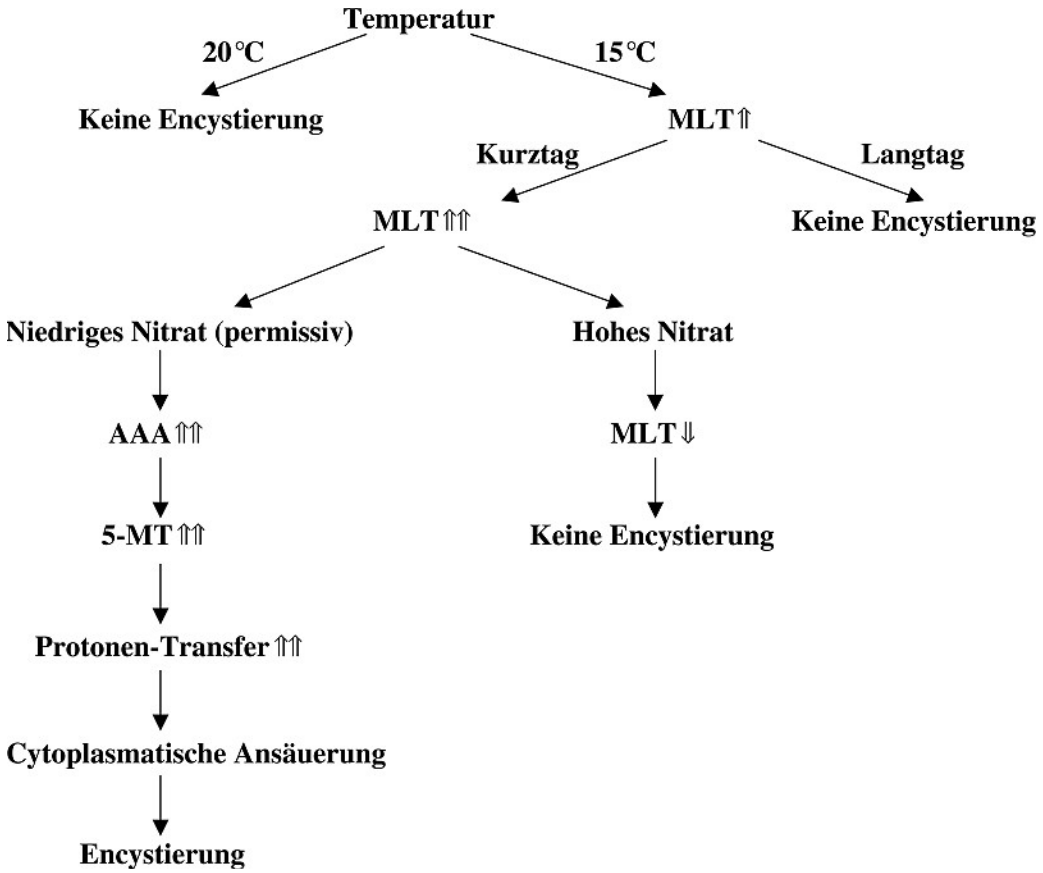

Abb. 5: Interaktionen von Temperatur, Photoperiode und Nitratkonzentration entscheiden bei *Lingulodinium polyedrum* zwischen Encystierung und Fortsetzung der aktiven Lebensphase. (MLT: Melatonin; 5-MT: 5-Methoxytryptamin; AAA: Arylacylamidase-Aktivität; ⇑ Steigerung; ⇑⇑ starke Steigerung; ⇓ Erniedrigung)

Catecholamine oder über Kynuramin (Hardeland und Balzer, 1993), die Möglichkeit, dass die G-Proteine zu anderen Signalwegen gehören. Auch waren bei *L. spiniferum* die Effekte von Mastoparan auf die Biolumineszenz viel geringer als jene von 5-MT, so dass eine Vermittlung von 5-MT-Effekten nur schwer vorstellbar ist (Mbachu und Hardeland, 1999).

Protektion durch Melatonin: Pharmakologie oder Physiologie?

Antioxidative Protektion durch Melatonin ist in zahllosen Publikationen untersucht worden, vorwiegend unter medizinischen, zellbiologischen, chemischen, zum Teil auch gerontologischen Gesichtspunkten (Zusf.: Reiter, 1998, 2002; Tan et al., 2002; Reiter et al., 2002a,b,c,d). Obwohl kein Zweifel daran besteht, dass Melatonin unter rein chemischen Gesichtspunkten ein potenter Radikalfänger ist (Tan et al., 1993, 2002, 2003a; Poeggeler et al., 1996, 2002; Reiter, 1998, 2002; Blanchard et al., 2000; Brömme et al., 2000, 2002; Brömme und Peschke, 2003; Hardeland et al., 2003b), bleibt jedoch eine Erklärungslücke von prinzipieller Bedeutung, was eine mögliche physiologische Protektion angeht. Zunächst muss ein *in vivo* beobachteter protektiver Effekt nicht von vornherein mit antioxidativen Mechanismen zu tun haben. Im Zentralnervensystem werden beispielsweise sekundäre oxidative Schäden auch durch antiexzitatorische Mechanismen vermindert (Hardeland et al., 2003a). Solche Wirkungen sind auch für Melatonin bekannt. Ein grundsätzlicher Kritikpunkt, der wiederholt angebracht wird, betrifft die verfügbaren Quantitäten von Melatonin. Es ist zwar sicher falsch, ausschließlich von den Konzentrationen im Blutplasma auszugehen, denn die Spiegel im Gewebe können höher liegen. Auch sei hier an die Sekretion in den dritten Ventrikel erinnnert (s. o.). Selbst bei der Annahme einer Kaskade von radikalfangenden Reaktionen, die von Melatonin und seinen Folgeprodukten ausgeht (Tan, 2002; Tan et al., 2003a; Ressmeyer et al., 2003), und auch unter der Voraussetzung von lokaler Akkumulation in bestimmten Geweben, Zellen oder Kompartimenten wird man doch nur ausnahmsweise von Protektion auf der Basis einer stöchiometrischen Radikaleliminierung durch Melatonin und seine Metabolite ausgehen können (Hardeland et al., 2003a). Vielleicht ist eine solche Ausnahme bei der Har-

DERschen Drüse der Nager gegeben (s. o.). Auch die Induktion bestimmter antioxidativer Enzyme wie z. B. Glutathion-Peroxidase, ggf. auch Superoxiddismutase oder das Herunterregulieren von NO-Synthasen vermögen die Erklärungslücke noch nicht befriedigend zu schließen, vor allem nicht unter chronobiologischen Gesichtspunkten: Das zirkulierende Melatonin ist bei tag- wie nachtaktiven Wirbeltieren nur nachts hoch, die Melatonin-abhängigen Induktionen müssen dies folglich auch sein – bei fehlender oder schwacher Rhythmik in den Geweben werden Induktionsmechanismen durch intrinsisches Melatonin ohnehin irrelevant. Andererseits ist Radikalgenerierung zumindest in Muskulatur, Gehirn und Zirkulation mit der Aktivitätsphase verbunden (Zusf.: Hardeland et al., 2003a). Im Zentralnervensystem gilt dies übrigens auch für die NO-abhängige Radikalbildung. Es ist nur schwer vorstellbar, dass Melatonin bei tag- und nachtaktiven Organismen eine unterschiedliche Rolle als protektive Substanz einnehmen sollte.

Vor diesem Hintergrund erscheint es zunächst wichtig, die experimentellen Konzepte zu beachten, unter denen Protektionsexperimente durchgeführt worden sind. Die Mehrzahl von diesen, vor allem solche in Zell- oder Gewebekulturen, weist profunde antioxidative Wirkungen nur bei sehr hohen Konzentrationen aus, welche in der Regel nicht physiologisch sein können, auch nicht unter der Annahme lokaler Anreicherung. Außerhalb der Wirbeltiere mag man allerdings solche Konzentrationen antreffen, z. B. bei *Lingulodinium*, bei dem Protektion vor letalem oxidativen Stress durch H_2O_2 mit hoher, aber physiologisch noch möglicher Melatonin-Konzentration erreicht werden konnte (Antolín et al., 1997).

Die Notwendigkeit phamakologischer Quantitäten von Melatonin ergibt sich allerdings in einer Reihe von Fällen schon aus dem experimentellen Ansatz: Wenn ein oxidativer Schaden demonstriert werden soll, so müssen die physiologischen Protektionsmechanismen überwunden werden. Das schädigende Agens wird demnach oft in so hohen Dosierungen eingesetzt, dass Melatonin auch prinzipiell nur in pharmakologischer Konzentration entgegenwirken kann (Hardeland, 1997a).

Der Anwendungswert von Melatonin kann auch dann immer noch hoch sein, wenn die Substanz nur in pharmakologischer Verabreichung wirksam ist. Nicht ohne Grund wird die Wirksamkeit von Melatonin z. B. bei neurodegenerativen Erkrankungen derzeit intensiv geprüft, so bei Morbus Alzheimer (Chyan et al., 1999; Pappolla et al., 2000, 2002; Poeggeler et al., 2001; Cardinali et al., 2002; Matsubara et al., 2003) und Amyotropher Lateralsklerose (ALS) (Jacob et al., 2002, 2003).

Nichtsdestoweniger bleibt die Frage nach einer etwaigen physiologischen Protektion durch Melatonin bestehen. Auch existieren Befunde, die auf einen Schutz im nanomolaren Bereich hinweisen (Martín et al., 2002). Ferner wird Melatonin auch dann oftmals wirksam, wenn es mit dem Trinkwasser verabreicht wird, was den erzielbaren Blutkonzentrationen Grenzen setzt (Zusf.: Hardeland et al., 2003a). Die Suche nach physiologisch vom Melatonin abhängigen Protektionsmechanismen ist also weiterer Anstrengungen wert.

Neuere Aspekte des Redox-Verhaltens: Chinonreductase 2; mitochondriale Wirkungen

Möglicherweise werden Erklärungen, die die oben erwähnten Lücke schließen und welche auf eine Protektion durch physiologische Melatonin-Konzentrationen verweisen, auf der Basis einiger neuerer Befunde möglich. Eine beträchtliche Überraschung stellte der Nachweis dar, dass es sich bei dem vermuteten Melatonin-Rezeptor MT_3 nicht um ein Protein mit Signalfunktion, sondern um das lösliche, cytosolische Enzym Chinonreductase 2 (= NRH:Chinon-Oxidoreductase 2 = NQO2) handelt (Nosjean et al., 2000, 2001; Witt-Enderby et al., 2003). Man darf davon ausgehen, dass die Natur einen solchen Mechanismus nicht „grundlos“ entwickelt hat, doch bleibt das Verständnis hierfür noch im Dunkeln. Ihre von der Chinonreductase 1 abweichenden Spezifitäten, ihre Gewebeverteilung, ihre Rolle bei der Detoxifikation von Xenobiotika und auch natürlichen Nahrungskomponenten (Zusf.: Hardeland et al., 2003a) erklären nicht im mindesten, warum die Funktionen der NQO2 an Melatonin und damit wohl auch an die Dunkelphase angekoppelt sein sollten. Gleichwohl handelt es sich um ein Enzym der antioxidativen Protektion, selbst wenn im Einzelfall seine Produkte toxisch sein können. Beziehungen von Mutationen im *NQO2*-Gen zu Morbus Parkinson sind beschrieben worden (Harada et al., 2001) und der Promotor dieses Gens enthält u. a. ein ARE *(antioxidant response element)* (Long und Jaiswal, 2000). *NQO2*-knockout-Mäuse zeigen eine myeloide Hyperplasie, ein Hinweis auf eine Inhibition der Apoptose (Long et al., 2002). Die Rolle von Melatonin mag demnach um qualitativ neue Gesichtspunkte bereichert werden.

Ein weiterer neuerer Aspekt betrifft die Mitochondrien (Zusf.: Hardeland et al., 2003a). Da sie in tierischen Zellen oft die Hauptquelle freier Radikale darstellen und zudem eine fortschreitende Schädigung dieser Organellen im Zuge von pathologischen wie gerontologischen Entwicklungen festzustellen ist, muss Protektion auf mitochondrialer Ebene besonderes Interesse auf sich ziehen. Ein Schutz der Mitochondrien durch Melatonin wurde in den verschiedensten Modellsystemen beschrieben, einschließlich der Verwendung Seneszenz-akzelerierter Tiere (Martín et al., 2000, 2002; Acuña-Castroviejo et al., 2001, 2002; Sharman und Bondy, 2001; Okatani et al., 2001, 2002a,b, 2003; Reiter et al., 2002a,b). Auf protektive Effekte bereits im nanomolaren Bereich wurde bereits hingewiesen (s. o.).

Vor diesem Hintergrund und in Kenntnis von Details der mitochondrialen Radikalgenerierung im FeS-Komplex N2 innerhalb des sogenannten Komplexes I ist ein neues Modell der Wirkung von Melatonin vorgeschlagen worden, welches nur geringer, quasi katalytischer Mengen dieser Substanz bedarf (Hardeland et al., 2003a). Diese Vorstellung, bei der Befunde über bestimmte Nitrone Pate gestanden haben, welche trotz nur mäßigen Radikalfangens starke mitochondriale Protektion zeigen, geht nicht von einer stöchiometrischen Eliminierung bereits gebildeter Sauerstoffradikale aus, sondern von einer Elektronen-Interzeption durch Melatonin, und alternativ auch durch sein Produkt AMK, wodurch der an N2 direkt oder auf dem Umweg über Ubisemichinon stattfindende „parasitische“ Elektronentransfer auf molekularen Sauerstoff kompetitiv vermindert wird. Die radikalischen Zwischenprodukte von Melatonin und AMK, beides Substanzen mit bevorzugten Einelektronentransferreaktionen (Ressmeyer et al., 2003), vermögen nach dieser Vorstellung ihre Elektronen in die Atmungskette wieder einzuspeisen. Diesem Konzept gemäß, welches von der Regenerierung der Interzeptoren ausgeht, könnten bereits sehr niedrige Konzentrationen für eine Schutzfunktion ausreichen. Das Paradox der Schutzwirkung von Melatonin bei sowohl tag- als auch nachtaktiven Tieren trotz divergierender Phasenbeziehung seiner Rhythmik zu jener der Aktivität ließe sich hiermit auflösen. Es käme nicht mehr auf die nächtlichen Maxima an, sondern auf eine Mindestbeladung der Gewebe mit Melatonin. Der wesentliche Unterschied gegenüber früheren Konzepten besteht aber darin, dass es nicht um die nachträgliche Detoxifikation von Radikalen geht, sondern um die Vermeidung ihrer Bildung (Hardeland et al., 2003a).

Ausblick

Melatonin ist zwar auch ein Vermittler der Information Dunkelheit, und ohne Frage besteht hierin eine seiner biologisch wichtigsten Funktionen, doch erschöpft sich seine Rolle hierin keineswegs. Sein Vorkommen bei allen daraufhin untersuchten Taxa, seine in diversen Fällen dokumentierte Unabhängigkeit von der Nachtphase und gelegentlich sogar von circadianer Rhythmik überhaupt verlangt nach Erklärungen für seine ursprüngliche Rolle. Obwohl jahrmilliardenalte evolutive Prozesse bei ubiquitären niedermolekularen Substanzen prinzipiell nicht bewiesen werden können, liegt dennoch die Vorstellung nahe, dass Funktionen der antioxidativen Protektion am Anfang gestanden haben, zumal es sich hierbei um rein chemisch-molekulare Eigenschaften handelt (Hardeland et al., 1995). Eine Akquisition chronobiologischer Funktionen auf der Basis lichtabhängiger Destruktion und sich daraus ergebender Zeitmuster mag als sekundär angesehen werden (Hardeland et al., 1993c). Welche Rolle die offenbar ebenfalls auf konservierte Mechanismen zurückgehende Modulation des Cytoskeletts in einem solchen Erklärungsmuster spielt, bleibt noch schwer einzuschätzen. Dieses wenig beachtete Phänomen verdient weitere Aufmerksamkeit. Aber auch das viel stärker in das Interesse gerückte Gebiet der antioxidativen Protektion bedarf noch erheblicher Aufklärungsarbeit, die sich nicht im Nachweis der Interaktion mit weiteren Radikalen erschöpfen darf noch in der Demonstration eines Schutzes vor oxidativen Schäden in zusätzlichen Modellen. Aus der Sicht des Autors sind für die Zukunft vor allem jene Felder zu beachten, in denen protektive Wirkungen mit physiologischen Konzentrationen erzielbar sind, wobei die genaue Rolle der Chinonreductase 2 einschließlich ihrer Beziehung zur Apoptose zu analysieren ist, aber mehr noch die Mitochondrien und die Radikalvermeidung im Mittelpunkt stehen sollten. Ferner sei die Prognose gewagt, dass das inzwischen wieder einsetzende Interesse an oxidativen Metaboliten, vor allem an AFMK, AMK und den hieraus entstehenden, noch in Untersuchung befindlichen Produkten, zu qualitativ neuen Erkennissen über die Funktion des Melatonins beitragen wird.

Literatur

Abran, D., M. Anctil, M. A. Ali (1994) Melatonin activity rhythms in eyes and cerebral ganglia of *Aplysia californica* Gen. Comp. Endocrinol. 96: 215–222.

Acuña-Castroviejo, D., G. Escames, A. Carazo, J. León, H. Khaldy, R. J. Reiter (2002) Melatonin, mitochondrial homeostasis and mitochondrial-related diseases. Curr. Top. Med. Chem. 2: 133–151.

Acuña-Castroviejo, D., M. Martín, M. Macías, G. Escames, J. León, H. Khaldy, R. J. Reiter (2001) Melatonin, mitochondria, and cellular bioenergetics. J. Pineal Res. 30: 65–74.

Alberati-Giani, D., P. Ricciardi-Castagnoli, C. Köhler, A. M. Cesura (1996) Regulation of the kynurenine pathway by IFN-γ in murine cloned macrophages and microglial cells. Adv. Exp. Med. Biol. 398: 171–175.

Allen, A. E., S. F. Pang, I. Nir (1991) The effect of environmental photoperiodicity on indole rhythms and locomotor activity in sighted and eye covered chickens. J. Neural Transm. 83: 107–119.

Amherd, R., E. Hintermann, D. Walz, M. Affolter, U. A. Meyer (2000) Purification, cloning, and characterization of a second *N*-acetyltransferase from *Drosophila melanogster*. DNA Cell Biol. 19: 697–705.

Anctil, M., A. K. Pani, M. A. Ali (1991) Modulations of rhythmic contractions by melatonin via cyclic GMP in the coelenterate *Renilla koellikeri*. J. Comp. Physiol. B 161: 569–575.

Antolín, I., R. Hardeland (1997) Suppression of the *Gonyaulax* glow peak by paraquat and its restoration by melatonin. In: Biological Rhythms and Antioxidative Protection, R. Hardeland, ed. Cuvillier, Göttingen, pp. 86–97.

Antolín, I., B. Obst, S. Burkhardt, R. Hardeland (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.

ANTÓN-TAY, F., I. MARTÍNEZ, R. TOVAR, G. BENÍTEZ-KING (1998a) Modulation of the subcellular distribution of calmodulin by melatonin in MDCK cells. J. Pineal Res. 24: 35–42.

ANTÓN-TAY, F., G. RAMÍREZ, I. MARTÍNEZ, G. BENÍTEZ-KING (1998b) *In vitro* stimulation of protein kinase C by melatonin. Neurochem. Res. 23: 601–606.

ARENDT, J. (1985) Mammalian pineal rhythms. Pineal Res. Rev. 3: 161–213.

ARENDT, J. (1986) Role of the pineal gland in seasonal reproduction function in mammals. Oxford Rev. Reprod. Biol. 8: 266–320.

BALEMANS, M. G., P. PÉVET, W. C. LEGERSTEE, E. NEVO (1980) Preliminary investigations of melatonin and 5-methoxy-tryptophol synthesis in the pineal, retina, and Harderian gland of the mole rat and in the pineal of the mouse "eyeless". J. Neural Transm. 49: 247–255.

BALZER, I., B. FUHRBERG (1996) Presence of melatonin in the unicell *Euglena gracilis*. 5th Meet. Soc. Res. Biol. Rhythms, Amelia Island, p. 82.

BALZER, I., B. FUHRBERG, R. HARDELAND (1996a) The neurohormone melatonin oscillates in a circadian fashion already in unicells. In: Brain and Evolution, N. Elsner, H.-U. Schnitzler, eds., Thieme, Stuttgart/New York, abstract no. 38.

BALZER, I., B. FUHRBERG, R. HARDELAND (1996b) Les indoleamines des algues. 28ème Congr. Ann. Gr. Ét. Rythmes Biol., Saint-Étienne, résumé no. 3.

BALZER, I., R. HARDELAND (1989) Action of kynuramine in a dinoflagellate: stimulation of bioluminescence in *Gonyaulax polyedra*. Comp. Biochem. Physiol. 94C: 129–132.

BALZER, I., R. HARDELAND (1991a) Stimulation of bioluminescence by 5-methoxylated indoleamines in the dinoflagellate, *Gonyaulax polyedra*. Comp. Biochem. Physiol. 98C: 395–397.

BALZER, I., R. HARDELAND (1991b) Circadian rhythmicity in the stimulation of bioluminescence by biogenic amines and MAO inhibitors in *Gonyaulax polyedra*. Int. J. Biometeorol. 34: 231–234.

BALZER, I., R. HARDELAND (1991c) Photoperiodism and effects of indoleamines in a unicellular alga, *Gonyaulax polyedra*. Science 253: 795–797.

BALZER, I., R. HARDELAND (1991d) Mechanism of cyst formation in *Gonyaulax polyedra*: involvement of photoperiodism, low temperature, indoleamines and proton release. J. Interdiscipl. Cycle Res. 22: 87–88.

BALZER, I., R. HARDELAND (1991e) Circadian variations in the effects of epinephrine, kynuramine and potential MAO inhibitors on bioluminescence of *Gonyaulax*. In: Chronobiology & Chronomedicine, J. Surowiak, M. H. Lewandowski, eds. Lang, Frankfurt a. M./Bern/New York/Paris, pp. 16–22.

BALZER, I., R. HARDELAND (1992) Effects of indoleamines and short photoperiods on the encystment of *Gonyaulax polyedra*. Chronobiol. Int. 9: 260–265.

BALZER, I., R. HARDELAND (1993a) Une réponse photopériodique chez le dinoflagellé *Gonyaulax polyedra*: le rôle possible des indoleamines. Bull. Gr. Ét. Rythmes Biol. 25, no. 4: 23–27.

BALZER, I., R. HARDELAND (1993b): On the mechanism of cyst induction in *Gonyaulax polyedra*: roles of photoperiodism, low temperature, 5-methoxylated indoleamines, and proton release. In: Chronobiology & Chronomedicine, C. Gutenbrunner, G. Hildebrandt, R. Moog, eds. Lang, Frankfurt a. M./Berlin/Bern/New York/Paris/Wien, pp. 127–133.

BALZER, I., R. HARDELAND (1993c) Effects of short-days, melatonin and 5-methoxytryptamine in the marine alga *Gonyaulax polyedra* (Gonyaulacaceae). In: Quantified Phenotypic Responses in Morphology and Physiology, J. C. Aldrich, ed. JAPAGA, Ashford, pp. 109–113.

BALZER, I., R. HARDELAND (1995) Melatonin in green plants. In: Cellular Rhythms and Indoleamines, R. Hardeland, ed. Univ. of Göttingen, Göttingen, pp. 152–161.

BALZER, I., R. HARDELAND (1996a) Melatonin in algae and higher plants – Possible new roles as a phytohormone and antioxidant. Bot. Acta 109: 180–183.

BALZER, I., R. HARDELAND (1996b) Thermophotoperiodism. In: Vistas on Biorhythmicity, H. Greppin, R. Degli Agosti, M. Bonzon, eds. University of Geneva, Geneva, pp. 37–50.

BALZER, I., B. HÖCKER, H. KAPP, B. BARTOLOMAEUS (2000) Occurrence and comparative physiology of melatonin in evolutionary diverse organisms. In: The Redox State and Circadian Rhythms, T. Vanden Driessche, J.-L. Guisset, G. M. Petiau-de Vries, eds. Kluwer, Dordrecht/Boston/London, pp. 95–119.

BALZER, I., B. POEGGELER, R. HARDELAND (1991) Effects of indoleamines in the circadian organization of *Gonyaulax*. In: Chronobiology & Chronomedicine, J. Surowiak, M. H. Lewandowski, eds. Lang, Frankfurt a. M./Bern/New York/Paris, pp. 9–15.

BALZER, I., B. POEGGELER, R. HARDELAND (1993) Circadian rhythms of indoleamines in a dinoflagellate, *Gonyaulax polyedra*: Persistence of melatonin rhythm in constant darkness and relationship to 5-methoxytryptamine. In: Melatonin and the Pineal Gland – From Basic Science to Clinical Application, Y. Touitou, J. Arendt, P. Pévet, eds. Excerpta Medica, Amsterdam/London/New York/Tokyo, pp. 183–186.

BANERJEE, S., V. KERR, M. WINSTON, J. K. KELLEHER, L. MARGULIS (1972) Melatonin: inhibitions of microtubule-based oral morphogenesis in *Stentor coeruleus*. J. Protozool. 19: 108–113.

BANERJEE, S., L. MARGULIS (1973) Mitotic arrest by melatonin. Exp. Cell Res. 78: 314–318.

BARTSCH, I., K. LÜNING, P. KADEL (1999) Laboratory and field investigations of the melatonin content in the intertidal marine macroalga *Porphyra umbilicalis*. Biol. Rhythm Res. 30: 239.

BEHRMANN, G. (1989) Die Rolle des Metabolismus der aromatischen Aminosäure Tryptophan bei *Gonyaulax polyedra*. Diplomarbeit, Universität Göttingen.

BEHRMANN, G., B. FUHRBERG, R. HARDELAND, H. URÍA, B. POEGGELER (1997) Photooxidation of melatonin, 5-methoxytryptamine and 5-methoxytryptophol: aspects of photoprotection by periodically fluctuating molecules? In: Biometeorology 14, Pt. 2, Vol. 2, A. Hočevar, Z. Črepinšek, L. Kajfež-Bogataj, eds. Int. Soc. Biometeorol., Ljubljana, pp. 258–263.

BEHRMANN, G., R. HARDELAND (1995) Ultrastructural characterization of asexual cysts of *Gonyaulax polyedra* Stein (Dinoflagellata). Protoplasma 185: 22–27.

BEHRMANN, G., R. HARDELAND (1996) Kynuric metabolism in *Gonyaulax polyedra*. In: Metabolism and Cellular Dynamics of Indoles, R. Hardeland, ed. University of Göttingen, Göttingen, pp. 81–84.

BEHRMANN, G., H. URÍA, B. FUHRBERG, B. POEGGELER, R. HARDELAND (1995) Melatonin terminiert photooxidative radikalische Reaktionsketten. Verh. Dtsch. Zool. Ges. 88, Teil 1, p. 94.

BEHRMANN, G., R. WOLF, I. BALZER, R. HARDELAND (1994) Photoperiodic cyst induction overrides cell division in *Gonyaulax polyedra*. In: Cell Biological Problems in Chronobiology, R. Hardeland, ed. University of Göttingen, Göttingen, pp. 116–117.

Benítez-King, G. (2000) PKC activation by melatonin modulates vimentin intermediate filament organization in N1E-115 cells. J. Pineal Res. 29: 8–14.

Benítez-King, G., F. Antón-Tay (1993) Calmodulin mediates melatonin cytoskeletal effects. Experientia 49: 635–641.

Benítez-King, G., F. Antón-Tay (1996) Role of melatonin in cytoskeletal remodeling is mediated by calmolulin and protein kinase C. Front. Horm. Res. 21: 154–159.

Benítez-King, G., M. E. Hernández, R. Tovar, G. Ramírez (2001) Melatonin activates PKC-α but not PKC-ε in N1E-115 cells. Neurochem. Int. 39: 95–102.

Benítez-King, G., L. Huerto-Delgadillo, F. Antón-Tay (1993) Binding of ^{3}H-melatonin to calmodulin. Life Sci. 53: 201–207.

Benítez-King, G., A. Ríos, A. Martínez, F. Antón-Tay (1996) *In vitro* inhibition of Ca^{2+}/calmodulin-dependent kinase II activity by melatonin. Biochim. Biophys. Acta 1290: 191–196.

Binkley, S. (1993) Structures and molecules involved in generation and regulation of biological rhythms in vertebrates and invertebrates. Experientia 49: 648–653.

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

Brodbeck, D., R. Amherd, P. Callaerts, E. Hintermann, U. A. Meyer, M. Affolter (1998) Molecular and biochemical characterization of the aaNAT1 (Dat) locus in *Drosophila melanogaster*: differential expression of two gene products. DNA Cell Biol. 17: 621–633.

Brömme, H. J., W. Mörke, E. Peschke (2002) Transformation of barbituric acid into alloxan by hydroxyl radicals: interaction with melatonin and with other hydroxyl radical scavengers. J. Pineal Res. 33: 239–247.

Brömme, H. J., W. Mörke, E. Peschke, H. Ebelt, D. Peschke (2000) Scavenging effect of melatonin on hydroxyl radicals generated by alloxan. J. Pineal Res. 29: 201–208.

Brömme, H. J., E. Peschke (2003) Molekulare Mechanismen der Alloxan-Toxizität sowie die radikalfangende und antidiabetogene Bedeutung von Melatonin. In: Peschke, E. (Hrsg.): Endokrinologie, Vorträge im Rahmen des Projektes „Zeitstrukturen endokriner Systeme“. Abh. Sächs. Akad. Wiss., Math.-nat. Kl., 60/1. S. Hirzel, Stuttgart/Leipzig, S. 137–162.

Bubenik, G. A. (1980) Localization of melatonin in the digestive tract of the rat. Hormone Res. 12: 313–323.

Bubenik, G. A. (2001) Localization, physiological significance and possible clinical implication of gastrointestinal melatonin. Biol. Signals Recept. 10: 350–366.

Bubenik, G. A. (2002) Gastrointestinal melatonin: localization, function, and clinical relevance. Dig. Dis. Sci. 47: 2336–2348.

Bubenik, G. A., R. R. Hacker, G. M. Brown, L. Bartos (1999) Melatonin concentrations in the luminal fluid, mucosa, and muscularis of the bovine and porcine gastrointestinal tract. J. Pineal Res. 26: 56–63.

Burkhardt, S. (1998) Die Chronobiologie des antioxidativen Protektionssystems des Dinoflagellaten *Gonyaulax polyedra* und die Rolle seiner indolischen Komponenten Melatonin und 5-Methoxytryptamin. Dissertation, Universität Göttingen.

Burkhardt, S., R. Hardeland (1995) Tryptophan hydroxylase in the dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*. I. Differences to the vertebrate enzyme. In: Cellular Rhythms and Indoleamines, R. Hardeland, ed. University of Göttingen, Göttingen, pp. 33–36.

Burkhardt, S., R. Hardeland (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., R. Hardeland (1997) Effects of melatonin on superoxide dismutase and glutathione S-transferase activities in the dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*. In: Biological Rhythms and Antioxidative Protection, R. Hardeland, ed. Cuvillier, Göttingen, pp. 65–68.

Burkhardt, S., T. J. Meyer, R. Hardeland, B. Fuhrberg (1997a) Significance of indoleamines and a V-type proton ATPase in the circadian glow rhythm of *Gonyaulax polyedra* (Dinoflagellata). In: Biometeorology 14, Pt. 2, Vol. 2, A. Hočevar, Z. Črepinšek, L. Kajfež-Bogataj, eds. Int. Soc. Biometeorol., Ljubljana, pp. 266–271.

Burkhardt, S., T. J. Meyer, R. Hardeland, B. Poeggeler, B. Fuhrberg, I. Balzer (1997b) Requirement of indoleamines and a V-type proton ATPase for the expression of the circadian glow rhythm in *Gonyaulax polyedra*. Biol. Rhythm Res. 28: 151–159.

Burkhardt, S., B. Poeggeler, D.-X. Tan, C. Rosner, T. Gruetzner, F. Nitzki, M. Schoenke, S. Thuermann, R. J. Reiter, R. Hardeland (2001) Oxidation products formed from melatonin in various radical-generating systems. In: Actions and Redox Properties of Melatonin and Other Aromatic Amino Acid Metabolites, R. Hardeland, ed. Cuvillier, Göttingen, pp. 9–22.

Cahill, G. M. (1996) Circadian regulation of melatonin production in cultured zebrafish pineal and retina. Brain Res. 708: 177–181.

Cahill, G. M., J. C. Besharse (1990) Circadian regulation of melatonin in the retina of *Xenopus laevis*: Limitation by serotonin availability. J. Neurochem. 54: 716–719.

Callebert, J., J.-M. Jaunay, J.-M. Jallon (1991) Control of *Drosophila* biorhythms. Adv. Pineal Res. 5: 81–84.

Cardinali, D. P., L. I. Brusco, C. Liberczuk, A. M. Furio (2002) The use of melatonin in Alzheimer's disease. Neuroendocrinol. Lett. 23, Suppl. 1: 20–23.

Chieffi, G., G. Chieffi Baccari, L. Di Matteo, M. d'Istria, S. Minucci, B. Varriale (1996) Cell biology of the Harderian gland. Int. Rev. Cytol. 168: 1–80.

Chyan, Y.-J., B. Poeggeler, R. A. Omar, D. G. Chain, B. Frangione, J. Ghiso, M. A. Pappolla (1999) Potent neuroprotective properties against the Alzheimer β-amyloid by an endogenous melatonin-related indole structure, indole-3-propionic acid. J. Biol. Chem. 274: 21937–21942.

Conti, A., S. Conconi, E. Hertens, K. Skwarlo-Sonta, M. Markowska, G. J. M. Maestroni (2000) Evidence for melatonin synthesis in mouse and human bone marrow cells. J. Pineal Res. 28: 193–202.

Conti, A., C. Tettamanti, M. Singaravel, C. Haldar, R. S. Pandi-Perumal, G. J. M. Maestroni (2002) Melatonin: An ubiquitous and evolutionary hormone. In: Treatise on Pineal Gland and Melatonin, C. Haldar, M. Singaravel, S. M. Maitra, eds. Science Publishers, Enfield, pp. 105–143.

Csaba, G. (1993) Presence in and effects of pineal indoleamines at very low level of phylogeny. Experientia 49: 627–634.

Djeridane, Y., Y. Touitou (2001) Melatonin synthesis in the rat Harderian gland: age- and time-related effects. Exp. Eye Res. 72: 487–492.

Djeridane, Y., Y. Touitou (2003) Effects of diazepam and its metabolites on nocturnal melatonin secretion in the rat pineal

and Harderian glands. A comparative *in vivo* and *in vitro* study. Chronobiol. Int. 20: 285–297.

DJERIDANE, Y., B. VIVIEN-ROELS, V. SIMONNEAUX, J. M. MIGUEZ, P. PÉVET (1998) Evidence for melatonin synthesis in rodent Harderian gland: a dynamic in vitro study. J. Pineal Res. 25: 54–64.

DUBBELS, R., R. J. REITER, E. KLENKE, A. GOEBEL, E. SCHNAKENBERG, C. EHLERS, H. W. SCHIWARA, W. SCHLOOT (1995) Melatonin in edible plants identified by radioimmunoassay and by high performance liquid chromatography-mass spectrometry. J. Pineal Res. 18: 28–31.

FALCON, J., Y. GOTHILF, S. L. COON, G. BŒUF, D. C. KLEIN (2003) Genetic, temporal and developmental differences between melatonin rhythm gererating systems in the teleost fish pineal organ and retina. J. Neuroendocrinol. 15: 378–382.

FINOCCHIARO, L. M. E., E. S. ARZT, S. FERNÁNDEZ-CASTELO, M. CRISCUOLO, S. FINKELMAN, V. NAHMOD (1988a) Serotonin and melatonin synthesis in peripheral mononuclear cells: stimulation by interferon γ as part of an immunomodulatory pathway. J. Interferon Res. 8: 705–716.

FINOCCHIARO, L., J. CALLEBERT, J. M. LAUNAY, J. M. JALLON (1988b) Melatonin biosynthesis in *Drosophila*: its nature and its effects. J. Neurochem. 50: 382–387.

FLETCHER, R. A., C. SOPHER (1997) Retardation of leaf senescence by melatonin indicates that it acts as an antioxidant in plants. 5th Canadian Pineal & Melatonin Symposium, Guelph, abstract no. 7.

FOWLER, G., M. DAROSZEWSKA, K. U. INGOLD (2003) Melatonin does not "directly scavenge hydrogen peroxide": Demise of another myth. Free Radic. Biol. Med. 34: 77–83.

FUHRBERG, B. (1993) Kynuramine: Bildung aus Indolaminen und Wirksamkeit bei dem Dinoflagellaten *Gonyaulax polyedra*. Diplomarbeit, Universität Göttingen.

FUHRBERG, B. (1997) Melatonin und verwandte 5-Methoxyindole bei Einzellern und einfachen Vielzellern. Vergleichende Untersuchungen an Dinoflagellaten, Hefe und einer Phaeophycee. Mechanismen der Cysteninduktion und der Integration photoperiodischer und Temperatursignale bei *Gonyaulax polyedra*. Dissertation, Universität Göttingen.

FUHRBERG, B., I. BALZER, R. HARDELAND, A. WERNER, K. LÜNING (1996a) The vertebrate pineal hormone melatonin is produced by the brown alga *Pterygophora californica* and mimics dark effects on growth rate in the light. Planta 200: 125–131.

FUHRBERG, B., S.-Z. HAN, R. HARDELAND (1996b): Melatonin and other methoxyindoles in yeast, *Saccharomyces cerevisiae.* In: Metabolism and Cellular Dynamics of Indoles, R. Hardeland, ed. University of Göttingen, Göttingen, pp. 141–145.

FUHRBERG, B., R. HARDELAND (1994) Oxidation of melatonin by free radicals: catalysis by hemin. In: Cell Biological Problems in Chronobiology, R. Hardeland, ed. University of Göttingen, Göttingen, pp. 75–81.

FUHRBERG, B., R. HARDELAND (1995a) Melatonin integrates photoperiodic and temperature signals in the dinoflagellate *Gonyaulax polyedra.* In: Cellular Rhythms and Indoleamines, R. Hardeland, ed. University of Göttingen, Göttingen, pp. 15–19.

FUHRBERG, B., R. HARDELAND (1995b) In the dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*, exposure to decreased temperature can elicit accumulation of melatonin by several orders of magnitude. In: Cellular Rhythms and Indoleamines, R. Hardeland, ed. University of Göttingen, Göttingen, pp. 20–24.

FUHRBERG, B., R. HARDELAND (1995c) 5-Methoxytryptophol in *Gonyaulax polyedra*. In: Cellular Rhythms and Indoleamines, R. Hardeland, ed. University of Göttingen, Göttingen, pp. 25–27.

FUHRBERG, B., R. HARDELAND (1996a) Effects of nitrate on methoxyindoles in *Gonyaulax polyedra.* In: Metabolism and Cellular Dynamics of Indoles, R. Hardeland, ed. University of Göttingen, Göttingen, pp. 91–93.

FUHRBERG, B., R. HARDELAND (1996b) Melatonin and other methoxyindoles in the dinoflagellate *Amphidinium carterae*: Dependence on temperature. In: Metabolism and Cellular Dynamics of Indoles, R. Hardeland, ed. University of Göttingen, Göttingen, pp. 131–133.

FUHRBERG, B., R. HARDELAND (1997) Temperature as a major environmental factor controlling levels and rhythm amplitudes of melatonin in the marine dinoflagellate *Gonyaulax polyedra.* In: Biometeorology 14, Pt. 2, Vol. 2, A. Hočevar, Z. Črepinšek, L. Kajfež-Bogataj, eds. Int. Soc. Biometeorol., Ljubljana, pp. 272–277.

FUHRBERG, B., R. HARDELAND, B. POEGGELER (1996c) Temporal patterns of 5-methoxytryptamine and 5-methoxytryptophol in *Gonyaulax* exposed to a temperature permitting photoperiodic cyst induction. In: Metabolism and Cellular Dynamics of Indoles, R. Hardeland, ed. University of Göttingen, Göttingen, pp. 62–69.

FUHRBERG, B., R. HARDELAND, B. POEGGELER, G. BEHRMANN (1997) Dramatic rises of melatonin and 5-methoxytryptamine in *Gonyaulax* exposed to decreased temperature. Biol. Rhythm Res. 28: 144–150.

GANGULY, S., P. MUMMANENI, P. J. STEINBACH, D. C. KLEIN, S. L. COON (2001) Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* homolog of the melatonin rhythm enzyme arylalkylamine N-acetyltransferase (EC 2.3.1.87). J. Biol. Chem. 276: 47239–47247.

GAUER, F., M. MASSON-PÉVET, P. PÉVET (1994) Seasonal regulation of melatonin receptors in rodent pars tuberalis: correlation with reproductive state. J. Neural Transm. 96: 187–195.

GAWRON, E., R. HARDELAND (1999) Photocatalytic destruction of melatonin by chlorophyll. In: Studies on Antioxidants and their Metabolites, R. Hardeland, ed. Cuvillier, Göttingen, pp. 95–98.

GAWRON, E., R. HARDELAND, B. POEGGELER, B. FUHRBERG (1997) Photooxidation of indolic compounds mediated by extracts from *Gonyaulax polyedra*: Dependence on reactant concentrations. In: Biological Rhythms and Antioxidative Protection, R. Hardeland, ed. Cuvillier, Göttingen, pp. 142–146.

GILAD, E., H. R. WONG, B. ZINGARELLI, L. VIRAG, M. O'CONNOR, A. L. SALZMAN, C. SZABO (1998) Melatonin inhibits expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase in murine macrophages: role of inhibition of NFκB activation. FASEB J. 12: 685–693.

GRACE, M. S., J. C. BESHARSE (1993) Solubilization and biochemical charcterization of the melatonin deacetylase from *Xenopus laevis* retina. J. Neurochem. 60: 990–999.

GRACE, M. S., J. C. BESHARSE (1994) Melatonin deacetylase activity in the pineal gland and brain of the lizards *Anolis carolinensis* and *Sceloporus jarrovi*. Neuroscience 62: 615–623.

GRACE, M. S., G. M. CAHILL, J. C. BESHARSE (1991) Melatonin deacetylation: retinal vertebrate class distribution and *Xenopus laevis* tissue distribution. Brain Res. 559: 56–63.

GREEN, C. (2003) Molecular control of *Xenopus* retinal circadian rhythms. J. Neuroendocrinol. 15: 350–354.

Guerrero, J. M., M. A. López-González, C. Osuna, J. R. Calvo (1994a) Specific binding of melatonin by immunocompetent cells in humans and rodents. Modifications during postnatal development. Ann. N.Y. Acad. Sci. 719: 369–377.

Guerrero, J. M., A. Menéndez-Peláez, J. R. Calvo, C. Osuna, A. Rubio, M. A. López-González (1994b) Melatonin binding sites in the Harderian gland of the rat and Syrian hamster. Biol. Signals 3: 99–106.

Harada, S., C. Fujii, A. Hayashi, N. Ohkoshi (2001) An association between idiopathic Parkinson's disease and polymorphisms of phase II detoxification enzymes: glutathione S-transferase M1 and quinone oxidoreductase 1 and 2. Biochem. Biophys. Res. Commun. 288: 887–892.

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

Hardeland, R. (1996a) The pleiotropy of melatonin. In: Metabolism and Cellular Dynamics of Indoles, R. Hardeland, ed. Univ. of Göttingen, Göttingen, pp. 23–46.

Hardeland, R. (1996b) Effects of 5-methoxytryptamine on resting and motility in various dinoflagellates. In: Metabolism and Cellular Dynamics of Indoles, R. Hardeland, ed. University of Göttingen, Göttingen, pp. 100–102.

Hardeland, R. (1996c) Photooxidation of melatonin: Catalysis by extracts from *Pterygophora californica* (Phaeophyceae). In: Metabolism and Cellular Dynamics of Indoles, R. Hardeland, ed. University of Göttingen, Göttingen, pp. 149–152.

Hardeland, R. (1997a) New actions of melatonin and their relevance to biometeorology. Int. J. Biometeorol. 41: 47–57.

Hardeland, R. (1997b) Melatonin: Multiple functions in signaling and protection. In: Skin Cancer and UV Radiation, P. Altmeyer, K. Hoffmann, M. Stücker, eds. Springer, Berlin/Heidelberg, pp. 186–198.

Hardeland, R. (1998) Melatonin in unicellular organisms, fungi, macroalgae and angiosperms: Consequences of its metabolism, mediation of environmental signals and the search for its primary roles. Bull. Soc. Ecophysiol. 24, communication invitée no. 1.

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

Hardeland, R., I. Balzer (1993) Chronobiology of unicells: Multiplicity of frequencies, non-oscillatory states, photoperiodism and effects of biogenic amines. Trends Comp. Biochem. Physiol. 1: 71–87.

Hardeland, R., I. Balzer, B. Fuhrberg, I. Antolín (1996a) Melatonin and other methoxyindoles in non-vertebrates. In: Metabolism and Cellular Dynamics of Indoles, R. Hardeland, ed. University of Göttingen, Göttingen, pp. 162–172.

Hardeland, R., I. Balzer, B. Poeggeler, G. Behrmann, B. Fuhrberg (1992) Evolutionary aspects of circadian rhythmicity and indoleamine-mediated photoperiodism. Eur. J. Cell Biol. 57, Suppl. 36: 29.

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

Hardeland, R., G. Behrmann (1994) The circadian oscillator system and photoperiodic time measurement in *Gonyaulax polyedra*: oscillatory behaviour as a permissive condition or as an aspect of a time-measuring device? In: Cell Biological Problems in Chronobiology, R. Hardeland, ed. University of Göttingen, Göttingen, pp. 153–157.

Hardeland, R., G. Behrmann, I. Balzer (1993a) Knocking-out the circadian oscillator desensitizes *Gonyaulax* to melatonin and 5-methoxytryptamine: Is circadian rhythmicity required for photoperiodic cyst induction? J. Interdiscipl. Cycle Res. 24: 219–224.

Hardeland, R., G. Behrmann, B. Fuhrberg, B. Poeggeler, S. Burkhardt, H. Uría, B. Obst (1996b) Evolutionary aspects of indoleamines as radical scavengers. Presence and photocatalytic turnover of indoleamines in a unicell, *Gonyaulax polyedra*. Adv. Exp. Med. Biol. 398: 279–284.

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

Hardeland, R., S. Burkhardt, I. Antolín, B. Fuhrberg, A. Coto-Montes (1999a) Melatonin and 5-methoxytryptamine in the bioluminescent dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*: Restoration of the circadian glow peak after suppression of indoleamine biosynthesis or oxidative stress. Adv. Exp. Med. Biol. 460: 387–390.

Hardeland, R., A. Coto-Montes (2000) Chronobiology of oxidative stress and antioxidative defense mechanisms. In: Recent Research Developments in Comparative Biochemistry and Physiology, Vol. 1, S. G. Pandalai, ed. Transworld Research Network, Trivandrum, pp. 123–137.

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

Hardeland, R., A. Coto-Montes, B. Poeggeler (2003a) Circadian rhythms, oxidative stress and antioxidative defense mechanisms. Chronobiol. Int., 20: 921–962.

Hardeland, R., B. Fuhrberg (1994): On the possible significance of melatonin oxidation in chronobiology. In: Cell Biological Problems in Chronobiology, R. Hardeland, ed. University of Göttingen, Göttingen, pp. 100–103.

Hardeland, R., B. Fuhrberg (1996a) Ubiquitous melatonin – Presence and effects in unicells, plants and animals. Trends Comp. Biochem. Physiol. 2: 25–45.

Hardeland, R., B. Fuhrberg (1996b) The circadian rhythm of aryl acylamidase activity explains the nocturnal maximum of 5-methoxytryptamine in *Gonyaulax polyedra.* In: Metabolism and Cellular Dynamics of Indoles, R. Hardeland, ed. University of Göttingen, Göttingen, pp. 52–56.

Hardeland, R., B. Fuhrberg (1996c) The mechanism of 5-methoxytryptamine accumulation in *Gonyaulax* exposed to low temperature: Induction of aryl acylamidase by melatonin. In: Metabolism and Cellular Dynamics of Indoles, R. Hardeland, ed. University of Göttingen, Göttingen, pp. 57–61.

Hardeland, R., B. Fuhrberg (1996d) Time course of aryl acylamidase activity in *Gonyaulax polyedra* under cyst-inducing conditions. In: Metabolism and Cellular Dynamics of

Indoles, R. Hardeland, ed. University of Göttingen, Göttingen, pp. 70–73.

HARDELAND, R., B. FUHRBERG, I. BALZER (2001a) Melatonin in plants: A mechanism of action in a unicellular alga and some perspectives of its role in multicellular plants. In: Actions and Redox Properties of Melatonin and Other Aromatic Amino Acid Metabolites, R. Hardeland, ed. Cuvillier, Göttingen, pp. 70–79.

HARDELAND, R., B. FUHRBERG, G. BEHRMANN, I. BALZER (1993b) Sleep-latency reducing pineal hormone melatonin as a scavenger of free radicals: hemin-catalysed formation of N^1-acetyl-N^2-formyl-5-methoxykynuramine. Sleep Res. 22: 621.

HARDELAND, R., B. FUHRBERG, S. BURKHARDT, B. POEGGELER, P. LAX (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, A. Hočevar, Z. Črepinšek, L. Kajfež-Bogataj, eds. Int. Soc. Biometeorol., Ljubljana, pp. 278–285.

HARDELAND, R., B. FUHRBERG, B. K. ZSIZSIK, B. POEGGELER (1997b) Chemiluminescence as a tool for monitoring the oxidation of indolic and quinaldic radical scavengers. Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 35: A108.

HARDELAND, R., R. NIEBERGALL, M. SCHOENKE, B. POEGGELER (2001b) Carbonate radicals as initiators of melatonin oxidation: chemiluminescence and formation of oxidation products. In: Actions and Redox Properties of Melatonin and Other Aromatic Amino Acid Metabolites, R. Hardeland, ed. Cuvillier, Göttingen, pp. 49–57.

HARDELAND, R., B. POEGGELER (1995) Effect of oxidized glutathione on photooxidation of melatonin in a *Gonyaulax* extract/DMSO system. In: Cellular Rhythms and Indoleamines, R. Hardeland, ed. University of Göttingen, Göttingen, pp. 132–134.

HARDELAND, R., B. POEGGELER (2002) Chemistry and biology of melatonin oxidation. In: Treatise on Pineal Gland and Melatonin, C. Haldar, M. Singaravel, S. K. Maitra, eds. Science Publishers (USA), Enfield, pp. 407–422.

HARDELAND, R., B. POEGGELER (2003): Non-vertebrate melatonin. J. Pineal Res. 34: 233–241.

HARDELAND, R., B. POEGGELER, I. BALZER, G. BEHRMANN (1991) Common basis of photoperiodism in phylogenetically distant organisms and its possible origins. J. Interdiscipl. Cycle Res. 22: 122–123.

HARDELAND, R., B. POEGGELER, I. BALZER, G. BEHRMANN (1993c) A hypothesis on the evolutionary origins of photoperiodism based on circadian rhythmicity of melatonin in phylogenetically distant organisms. In: Chronobiology & Chronomedicine, C. Gutenbrunner, G. Hildebrandt, R. Moog, eds. Lang, Frankfurt a. M./Berlin/Bern/New York/Paris/Wien, pp. 113–120.

HARDELAND, R., B. POEGGELER, G. BEHRMANN, B. FUHRBERG (1996c) Enzymatic and non-enzymatic metabolism of methoxyindoles. In: Metabolism and Cellular Dynamics of Indoles, R. Hardeland, ed. University of Göttingen, Göttingen, pp. 6–22.

HARDELAND, R., B. POEGGELER, R. NIEBERGALL, V. ZELOSKO (2003b) Oxidation of melatonin by carbonate radicals and chemiluminescence emitted during pyrrole ring cleavage. J. Pineal Res. 34: 17–25.

HARDELAND, R., R. J. REITER, B. POEGGELER, D.-X. TAN (1993d) The significance of the metabolism of the neurohormone melatonin: antioxidative protection and formation of bioactive substances. Neurosci. Biobehav. Rev. 17: 347–357.

HARDELAND, R., A.-R. RESSMEYER, V. ZELOSKO, S. BURKHARDT, B. POEGGELER (2004) Metabolites of melatonin: Formation and properties of the methoxylated kynuramines AFMK and AMK. In: Recent Advances in Endocrinology and Reproduction: Evolutionary, Biotechnological and Clinical Applications, C. Haldar, S. S. Singh, eds. Banaras Hindu University, Varanasi, pp. 21–38.

HARDELAND, R., C. RODRÍGUEZ (1995) Versatile melatonin: A pervasive molecule serves various functions in signaling and protection. Chronobiol. Int. 12: 157–165.

HARDELAND, R., H. URÍA (1995) On the role of melatonin in mammalian Harderian glands: Does melatonin protect from free radicals generated by protoporphyrin-catalysed photooxidation? In: Cellular Rhythms and Indoleamines, R. Hardeland, ed. University of Göttingen, Göttingen, pp. 145–151.

HARDELAND, R., B. K. ZSIZSIK, B. FUHRBERG (1998) Chemiluminescence during oxidation of indolic and quinaldic free-radical scavengers. J. Biolum. Chemilum. 13: 204.

HARDELAND, R., B. K. ZSIZSIK, B. POEGGELER, B. FUHRBERG, S. HOLST, A. COTO-MONTES (1999b) Indole-3-pyruvic and -propionic acids, kynurenic acid and related metabolites as luminophores and free-radical scavengers. Adv. Exp. Med. Biol. 467: 389–395.

HATTORI, A., H. MIGITAKA, M. IIGO, M. ITOH, K. YAMAMOTO, R. OHTANI-KANEKO, M. HARA, T. SUZUKI, R. J. REITER (1995) Identification of melatonin in plants and its effects on plasma melatonin levels and binding to melatonin receptors in vertebrates. Biochem. Mol. Biol. Int. 35: 627–634.

HAYAISHI, O. (1976) Properties and function of indoleamine 2,3-dioxygenase. J. Biochem. (Tokyo) 79: 13P–21P.

HAYAISHI, O., R. YOSHIDA (1979) Rhythms and physiological significance of indoleamine 2,3-dioxygenase. In: Biological Rhythms and their Central Mechanism, M. Suda, O. Hayaishi, H. Nakagawa, eds. Elsevier/North Holland, Amsterdam/New York/Oxford, pp. 133–141.

HIRATA, F., O. HAYAISHI, T. TOKUYAMA, S. SENOH (1974) *In vitro* and *in vivo* formation of two new metabolites of melatonin. J. Biol. Chem. 249: 1311–1313.

HOFFMAN, R. A., L. B. JOHNSON, R. J. REITER (1985) Harderian glands of golden hamsters: temporal and sexual differences in immunoreactive melatonin. J. Pineal Res. 2: 161–168.

HOFFMAN, R. A., R. J. REITER (1965) Pineal gland: Influence on gonads of male hamsters. Science 148: 1609–1611.

HUERTO-DELGADILLO, L., F. ANTÓN-TAY, G. BENÍTEZ-KING (1994) Effects of melatonin on microtubule assembly depend on hormone concentration: role of melatonin as a calmodulin antagonist. J. Pineal Res. 17: 55–62.

HUETHER, G. (1993) The contribution of extrapineal sites of melatonin synthesis to circulating melatonin levels in higher vertebrates. Experientia 49: 665–670.

HUETHER, G., M. MESSNER, A. RODENBECK, R. HARDELAND (1998) Effect of continuous melatonin infusions on steady-state plasma melatonin levels in rats under near physiological conditions. J. Pineal Res. 24: 146–151.

HUETHER, G., B. POEGGELER, A. REIMER, A. GEORGE (1992) Effect of tryptophan administration on circulating melatonin levels in chicks and rats: evidence for stimulation of melatonin synthesis and release in the gastrointestinal tract. Life Sci. 51: 945–953.

IIGO, M., M. HARA, R. OHTANI-KANEKO, K. HIRATA, M. TABATA, K. AIDA (1997) Photic and circadian regulations of melatonin rhythms in fishes. Biol. Signals 6: 225–232.

Itoh, M. T., A. Hattori, Y. Sumi, T. Suzuki (1995) Day-night changes in melatonin levels in different organs of the cricket *(Gryllus bimaculatus)*. J. Pineal Res. 18: 165–169.

Iuvone, P. M. (1996) Circadian rhythms of melatonin biosynthesis in retinal photoreceptor cells: Signal transduction, interactions with dopamine, and speculations on a role in cell survival. In: Retinal Degeneration and Regeneration, S. Kato, N. N. Osborne, M. Tamai, eds. Kugler, Amsterdam/New York, pp. 3–13.

Iuvone, P. M., A. D. Brown, R. Haque, J. Weller, J. B. Zawilska, S. S. Chaurasia, M. Ma, D. C. Klein (2002) Retinal melatonin production: role of proteasomal proteolysis in circadian and photic control of arylalkylamine *N*-acetyltransferase. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 43: 563–572.

Iuvone, P. M., N. W. Chong, M. Bernard, A. D. Brown, K. B. Thomas, D. C. Klein (1999) Melatonin biosynthesis in chicken retina. Regulation of tryptophan hydroxylase and arylalkylamine *N*-acetyltransferase. Adv. Exp. Med. Biol. 460: 31–41.

Iuvone, P. M., J. Gan, A. L. Alonso-Gomez (1995) 5-Methoxytryptamine inhibits cyclic AMP accumulation in cultured retinal neurons through activation of a pertussis toxin-sensitive site distinct from the 2-(^{125}I)iodomelatonin binding site. J. Neurochem. 64: 1892–1895.

Ivanova, T. N., P. M. Iuvone (2003) Melatonin synthesis in retina: circadian regulation of arylalkylamine *N*-acetyltransferase activity in cultured photoreceptor cells of embryonic chicken retina. Brain Res. 973: 56–63.

Jackson, W. T. (1969) Regulation of mitosis. Interaction of isopropyl N-phenylcarbamate and melatonin. J. Cell Sci. 5: 745–755.

Jacob, S., B. Poeggeler, J. H. Weishaupt, A.-L. Sirén, R. Hardeland, M. Bähr, H. Ehrenreich (2002) Melatonin as a candidate compound for neuroprotection in amyotrophic lateral sclerosis (ALS): High tolerability of daily oral melatonin administration in ALS patients. J. Pineal Res. 33: 186–187.

Jacob, S., J. H. Weishaupt, J. Finsterbusch, A.-L. Sirén, B. Poeggeler, E. Poelking, M. Bähr, R. Hardeland, J. Frahm, K.-A. Nave, H. Ehrenreich (2003) Melatonin: A candidate compound for neuroprotection in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). In: The Neurosciences from Basic Research to Therapy, N. Elsner, H. Zimmermann, eds. Thieme, Stuttgart/New York, p. 374.

Jametti-Tettamanti, C., A. Conti (2002) Melatonin identification in mediterranean and alpine medicinal and wild plants. Acta Phytotherap. 3: 42–46.

Jin, X., C. von Gall, R. L. Pieschl, V. K. Gribkoff, J. H. Stehle, S. M. Reppert, D. R. Weaver (2003) Targeted disruption of the mouse Mel_{1b} melatonin receptor. Mol. Cell Biol. 23: 1054–1060.

Kelly, R. W., F. Amato, R. F. Seamark (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.

Kennaway, D. J., P. Blake, H. A. Webb (1989) A melatonin agonist and N-acetyl-N^2-formyl-5-methoxykynurenamine accelerate the reentrainment of the melatonin rhythm following a phase advance of the light-dark cycle. Brain Res. 495: 349–354.

Kolář, J., C. H. Johnson, I. Macháčková (1999) Presence and possible role of melatonin in a short-day flowering plant, *Chenopodium rubrum*. Adv. Exp. Med. Biol. 460: 391–393.

Kolář, J., I. Macháčková, J. Eder, E. Prinsen, W. Van Dongen, H. Van Onckelen, H. Illnerová (1997) Melatonin: occurrence and daily rhythm in *Chenopodium rubrum*. Phytochemistry 44: 1407–1413.

Kolář, J., I. Macháčková, H. Illnerová, E. Prinsen, W. Van Dongen, H. A. Van Onckelen (1995) Melatonin in higher plant determined by radioimmunoassay and liquid chromatography-mass spectrometry. Biol. Rhythm Res. 26: 406.

Leone, R. M., R. E. Silman (1984) Melatonin can be differentially metabolised in the rat to produce *N*-acetyl-serotonin in addition to 6-hydroxy-melatonin. Endocrinology 114: 1825–1832.

Leone, R. M., R. E. Silman (1985) An investigation of demethylation in the metabolism of 5-methoxytryptamine and 5-methoxytryptophol. J. Pineal Res. 2: 87–94.

Lerchl, A., S. Schlatt (1993) Influence of photoperiod on pineal melatonin synthesis, fur color, body weight, and reproductive function in the female Djungarian hamster, *Phodopus sungorus*. Neuroendocrinology 57: 359–364.

Lerner, A. B., J. D. Case, R. V. Heinzelman (1959) The structure of melatonin. J. Am. Chem. Soc. 81: 6084–6085.

Lerner, A. B., J. D. Case, Y. Takahashi (1958a) Isolation of melatonin, a pineal factor that lightens melanocytes. J. Am. Chem. Soc. 80: 2057–2058.

Lerner, A. B., J. D. Case, Y. Takahashi, T. H. Lee, W. Mori (1958b) Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. J. Am. Chem. Soc. 80: 2587–2592.

Li, P., S. F. Pang, C. W. Tsang (1997) Retinal 5-methoxytryptamine and 5-methoxyindole-3-acetic acid in the rat and quail: diurnal rhythms and interspecies differences. Biochem. Biophys. Res. Commun. 239: 353–356.

Liu, C., D. R. Weaver, X. Jin, L. P. Shearman, R. L. Pieschl, V. K. Gribkoff, S. M. Reppert (1997) Molecular dissection of two distinct actions of melatonin on the suprachiasmatic circadian clock. Neuron 19: 91–102.

Long, D. J. II, K. Iskander, A. Gaikwad, M. Arin, D. R. Roop, R. Knox, R. Barrios, A. K. Jaiswal (2002) Disruption of dihydronicotinamide riboside:quinone oxidoreductase 2 (NQO2) leads to myeloid hyperplasia of bone marrow and decreased sensitivity to menadione toxicity. J. Biol. Chem. 277: 46131–46139.

Long, D. J. II, A. K. Jaiswal (2000) NRH:quinone oxidoreductase2 (NQO2). Chem.-Biol. Interact. 29: 99–112.

López-González, M. A., J. R. Calvo, C. Osuna, J. M. Guerrero (1992) Interaction of melatonin with human lymphocytes: evidence for binding sites coupled to potentiation of cyclic AMP stimulated by vasoactive intestinal peptide and activation of cyclic GMP. J. Pineal Res. 12: 97–104.

López-González, M. A., J. R. Calvo, J. J. Segura, J. M. Guerrero (1993a) Characterization of melatonin binding sites in human peripheral blood neutrophils. Biotech. Ther. 4: 253–262.

López-González, M. A., A. Martín-Cacao, J. R. Calvo, R. J. Reiter, C. Osuna, J. M. Guerrero (1993b) Specific binding of 2-(^{125}I)melatonin by partially purified membranes of rat thymus. J. Neuroimmunol. 45: 121–126.

Lorenz, M., K. Lüning (1999) Detection of endogenous melatonin in the marine red macroalgae *Porphyra umbilicalis* and *Palmaria palmata* by enzyme-linked immunoassay (ELISA) and effects of melatonin administration on algal growth. Biol. Rhythm Res. 30: 243.

Lüning, K., P. Kadel, I. Bartsch (1999) Melatonin content of the intertidal marine macroalgae *Chondrus crispus* and *Petalonia fascia* at the island of Sylt, North Sea. Biol. Rhythm Res. 30: 244.

MACÍAS, M., M. N. RODRÍGUEZ-CABEZAS, R. J. REITER, A. OSUNA, D. ACUÑA-CASTROVIEJO (1999) Presence and effects of melatonin in *Trypanosoma cruzi*. J. Pineal Res. 27: 86–94.

MACKENZIE, C. R., R. GUADARRAMA GONZÁLEZ, E. KNIEP, S. ROCH, W. DÄUBENER (1999) Cytokine mediated regulation of interferon-gamma-induced IDO activation. Adv. Exp. Med. Biol. 467: 533–539.

MAESTRONI, G. J. M. (1995) T-Helper-2 lymphocytes as a peripheral target of melatonin. J. Pineal Res. 18: 84–89.

MAESTRONI, G. J. M. (1999) MLT and the immune-hematopoietic system. Adv. Exp. Med. Biol. 460: 395–405.

MAESTRONI, G. J. M. (2001) The immunotherapeutic potential of melatonin. Expert. Opin. Invest. Drugs 10: 467–476.

MAESTRONI, G. J. M., A. CONTI (1990) The pineal hormone melatonin stimulates activated $CD4^+$, Thy-1^+ cells to release opioid agonist(s) with immunoenhancing and anti-stress properties. J. Neuroimmunol. 28: 167–176.

MAESTRONI, G. J. M., A. CONTI (1991) Anti-stress role of the melatonin-immuno-opioid network. Evidence for a physiological mechanism involving T cell-derived, immunoreactive β-endorphin and metenkephalin binding to thymic opioid receptors. Int. J. Neurosci. 61: 289–298.

MAESTRONI, G. J. M., A. CONTI, P. LISSONI (1994) Colony-stimulating activity and hematopoietic rescue from cancer chemotherapy compounds are induced by melatonin via endogenous interleukin 4. Cancer Res. 54: 4740–4743.

MANCHESTER, L. C., B. POEGGELER, F. L. ALVARES, G. B. OGDEN, R. J. REITER (1995) Melatonin immunoreactivity in the photosynthetic prokaryote, *Rhodospirillum rubrum*: implications for an ancient antioxidant system. Cell. Mol. Biol. Res. 41: 391–395.

MARTÍN, M., M. MACÍAS, G. ESCAMES, R. J. REITER, M. T. AGAPITO, G. G. ORTIZ, D. ACUÑA-CASTROVIEJO (2000) Melatonin-induced increased activity of the respiratory chain complexes I and IV can prevent mitochondrial damage induced by ruthenium red in vivo. J. Pineal Res. 28: 242–248.

MARTÍN, M., M. MACÍAS, J. LEÓN, G. ESCAMES, H. KHALDY, D. ACUÑA-CASTROVIEJO (2002) Melatonin increases the activity of the oxidative phosphorylation enzymes and the production of ATP in rat brain and liver mitochondria. Int. J. Biochem. Cell Biol. 34: 348–357.

MASSON-PÉVET, M., I. BALZER, R. HARDELAND (1997) Testing for melatonin receptors in *Gonyaulax polyedra*. In: Biological Rhythms and Antioxidative Protection, R. Hardeland, ed. Cuvillier, Göttingen, pp. 107–109.

MATSUBARA, E., T. BRYANT-THOMAS, J. PACHECO QUINTO, T. L. HENRY, B. POEGGELER, D. HERBERT, F. CRUZ-SANCHEZ, Y.-J. CHYAN, M. A. SMITH, G. PERRY, M. SHOJI, K. ABE, A. LEONE, I. GRUNDKE-IKBAL, G. L. WILSON, J. GHISO, C. WILLIAMS, L. M. REFOLO, M. A. PAPPOLLA (2003) Melatonin increases survival and inhibits oxidative and amyloid pathology in a transgenic model of Alzheimer's disease. J. Neurochem. 85: 1101–1108.

MBACHU, E. M., R. HARDELAND (1997) Stimulation of bioluminescence by 5-methoxytryptamine in an *Alexandrium* species. In: Biological Rhythms and Antioxidative Protection, R. Hardeland, ed. Cuvillier, Göttingen, pp. 113–115.

MBACHU, E. M., R. HARDELAND (1999) Effects of mastoparan on bioluminescence in *Gonyaulax spinifera*. In: Studies on Antioxidants and their Metabolites, R. Hardeland, ed. Cuvillier, Göttingen, pp. 172–176.

MENÉNDEZ-PELÁEZ, A. (1990) Melatonin and other indoles in the rodent Harderian glands: regulation and physiological significance. Adv. Pineal Res. 4: 75–80.

MENÉNDEZ-PELÁEZ, A., M. A. LÓPEZ-GONZÁLEZ, J. M. GUERRERO (1993) Melatonin binding sites in the Harderian gland Syrian hamsters: sexual differences and effect of castration. J. Pineal Res. 14: 34–38.

MESSNER, M., R. HARDELAND, A. RODENBECK, G. HUETHER (1998) Tissue retention and subcellular distribution of continuously infused melatonin in rats under near physiological conditions. J. Pineal Res. 25: 251–259.

MESSNER, M., R. HARDELAND, A. RODENBECK, G. HUETHER (1999) Effects of continuous melatonin infusions on steady-state plasma melatonin levels, metabolic fate and tissue retention in rats under near physiological conditions. Adv. Exp. Med. Biol. 467: 303–313.

MESSNER, M., G. HUETHER, T. LORF, G. RAMADORI, H. SCHWÖRER (2001) Presence of melatonin in the human hepatobiliary-gastrointestinal tract. Life Sci. 69: 543–551.

MORITA, M., J. B. BEST (1993) The occurrence and physiological functions of melatonin in the most primitive eumetazoans, the planarians. Experientia 49: 623–626.

MORITA, M., F. L. HALL, J. B. BEST, W. GERN (1987) Photoperiodic modulation of cephalic melatonin in planarians. J. Exp. Zool. 241: 383–388.

MORREY, K. M., J. A. MCLACHLAN, C. D. SERKIN, O. BAKOUCHE (1994) Activation of human monocytes by the pineal hormone melatonin. J. Immunol. 153: 2671–2680.

MORSE, D. S., L. FRITZ, J. W. HASTINGS (1990) What is the clock? Translational regulation of circadian bioluminescence. Trends Biochem. Sci. 15: 262–265.

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

MUELLER, U., R. HARDELAND (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, R. Hardeland, ed. Cuvillier, Göttingen, pp. 148–161.

MUELLER, U., R. HARDELAND (1999c) Photooxidative pyrrolering cleavage of melatonin: limits of quantification. In: Studies on Antioxidants and their Metabolites, R. Hardeland, ed. Cuvillier, Göttingen, pp. 162–171.

MUELLER, U., R. HARDELAND, B. FUHRBERG, B. POEGGELER (2000) Accumulation and metabolism of 5-methoxylated indoleamines in the dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*. Eur. J. Cell. Biol. 79, Suppl. 50: 98.

MUELLER, U., R. HARDELAND, B. POEGGELER, B. FUHRBERG, S. BURKHARDT (2001) Pathways of melatonin catabolism in the dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*. Biol. Rhythm Res. 32: 465.

MURCH, S. J., C. B. SIMMONS, P. K. SAXENA (1997) Melatonin in fever few and other medicinal plants. Lancet 350: 1598–1599.

NOSJEAN, O., M. FERRO, F. COGÉ, P. BEAUVERGER, J.-M. HENLIN, F. LEFOULON, J.-L. FAUCHÈRE, P. DELAGRANGE, E. CANET, J. A. BOUTIN (2000) Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinone reductase 2. J. Biol. Chem. 275: 31311–31317.

Nosjean, O., J. P. Nicolas, F. Klupsch, P. Delagrange, E. Canet, J. A. Boutin (2001) Comparative parmacological studies of melatonin receptors: MT1, MT2 and MT3/QR2. Tissue distribution of MT3/QR2. Biochem. Pharmacol. 61: 1369–1379.

Okatani, Y., A. Wakatsuki, R. J. Reiter (2002a) Melatonin protects hepatic respiratory chain activity in senescence-accelerated mice. J. Pineal Res. 32: 143–148.

Okatani, Y., A. Wakatsuki, R. J. Reiter, Y. Miyahara (2002b) Hepatic mitochondrial dysfunction in senescence-accelerated mice: correction by long-term, orally administered physiological levels of melatonin. J. Pineal Res. 33: 127–133.

Okatani, Y., A. Wakatsuki, R. J. Reiter, Y. Miyahara (2003) Acutely administered melatonin restores hepatic mitochondrial physiology in old mice. Int. J. Biochem. Cell Biol. 35: 367–375.

Okatani, Y., A. Wakatsuki, K. Shinohara, K. Taniguchi, T. Fukaya (2001) Melatonin protects against oxidative mitochondrial damage induced in rat placenta by ischemia and reperfusion. J. Pineal Res. 31: 173–178.

Pang, S. F., H. S. Yu, H. C. Suen, G. M. Brown (1980) Melatonin in the retina of rats: a diurnal rhythm. J. Endocrinol. 87: 89–93.

Pappolla, M. A., Y.-J. Chyan, B. Poeggeler, B. Frangione, G. Wilson, J. Ghiso, R. J. Reiter (2000) An assessment of the antioxidant and antiamyloidogenic properties of melatonin: implications for Alzheimer's disease. J. Neural Transm. 107: 203–231.

Pappolla, M. A., M. J. Simovich, T. Bryant-Thomas, Y.-J. Chyan, B. Poeggeler, M. Dubocovich, R. Bick, G. Perry, F. Cruz-Sanchez, M. A. Smith (2002) The neuroprotective activities of melatonin against the Alzheimer β-protein are not mediated by melatonin membrane receptors. J. Pineal Res. 32: 135–142.

Payne, A. P. (1994) The harderian gland: a tercentennial review. J. Anat. 185: 1–49.

Poeggeler, 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, Universität Göttingen.

Poeggeler, B., I. Balzer, J. Fischer, G. Behrmann, R. Hardeland (1989) A role of melatonin in dinoflagellates? Acta Endocrinol., Cop. 120, Suppl. 1: 97.

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

Poeggeler, B., R. Hardeland (1994a) Probleme der quantitativen Extraktion 5-methoxylierter Indolamine aus *Gonyaulax polyedra*. In: Cell Biological Problems in Chronobiology, R. Hardeland, ed. University of Göttingen, Göttingen, pp. 118–124.

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

Poeggeler, B., L. Miravalle, M. G. Zagorski, T. Wisniewski, Y.-J. Chyan, Y. Zhang, H. Shao, T. Bryant-Thomas, R. Vidal, B. Frangione, J. Ghiso, M. A. Pappolla (2001) Melatonin reverses the profibrillogenic activity of apolipoprotein E4 on the Alzheimer amyloid Aβ peptide. Biochemistry 40: 14995–15001.

Poeggeler, B., R. J. Reiter, R. Hardeland, D.-X. Tan, L. R. Barlow-Walden (1996) Melatonin and structurally-related, endogenous indoles act as potent electron donors and radical scavengers *in vitro*. Redox Rep. 2: 179–184.

Poeggeler, B., S. Thuermann, A. Dose, M. Schoenke, S. Burkhardt, R. Hardeland (2002) Melatonin's unique radical scavenging properties – Roles of its functional substituents as revealed by a comparison with its structural analogs. J. Pineal Res. 33: 20–30.

Poirel, V. J., C. Cailotto, D. Streicher, P. Pévet, M. Masson-Pévet, F. Gauer (2003) MT1 melatonin receptor mRNA tissular localization by PCR amplification. Neuroendocrinol. Lett. 24: 33–38.

Primus, J. P., G. M. Brown (1994) Sepiapterin reductase and the biosynthesis of tetrahydrobiopterin in *Drosophila melanogaster*. Insect Biochem. Mol. Biol. 24: 907–918.

Raikhlin, N., I. Kvetnoy (1976) The synthesis of melatonin in the enterochromaffin cells. Arch. Pathol. 3: 21–25.

Raikhlin, N., I. Kvetnoy, V. N. Tolkachev (1975) Melatonin may be synthesized in enterochromaffin cells. Nature 255: 344–345.

Recio, J., P. Pévet, M. Masson-Pévet (1998) Regulation of melatonin receptors in the pars tuberalis of Syrian hamsters transferred from long to short photoperiod: implication of melatonin and testosterone. J. Neuroendocrinol. 10: 303–308.

Reece, S., J. T. Y. Wong (1995) Indoleamine-induced encystment of symbiotic dinoflagellates. CAPS News Commun. 14, suppl. 2;26.

Rehman, J., K. Lindgren, T. Roenneberg (1996) Light and nitrate – Interactions of two zeitgebers in the marine unicellular alga *Gonyaulax*. 5th Meet. Soc. Res. Biol. Rhythms, Amelia Island, p. 42.

Reinhard, J. F. Jr., E. M. Flanagan (1996) The neurotoxin quinolinic acid is increased in spinal cords of mice with herpes simplex virus encephalitis. Adv. Exp. Med. Biol. 398: 241–246.

Reiter, R. J. (1989) Melatonin: its sources, its message and the interpretation of the message. Adv. Pineal Res. 3: 165–173.

Reiter, R. J. (1991a) Pineal gland: Interface between the photoperiodic environment and the endocrine system. Trends Endocr. Metab. 2: 13–19.

Reiter, R. J. (1991b) Melatonin: The chemical expression of darkness. Mol. Cell. Endocrinol. 79: C153–C159.

Reiter, R. J. (1991c) The pineal gland: Reproductive interactions. In: Vertebrate Endocrinolgy: Fundamentals and Biomedical Implications, Vol. 4, Part B, M. Schreibman, P. K. T. Pang, eds. Academic Press, New York, pp. 269–310.

Reiter, R. J. (1993) The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. Experientia 49: 654–664.

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

Reiter, R. J. (2002) Potential biological consequences of excessive light exposure: melatonin suppression, DNA damage, cancer and neurodegenerative diseases. Neuroendocrinol. Lett. 23, Suppl. 2: 9–13.

Reiter, R. J., D.-X. Tan (2002a) Melatonin. An antioxidant in edible plants. Ann. N.Y. Acad. Sci. 957: 341–344.

Reiter, R. J., D.-X. Tan (2002b) Role of CSF in the transport of melatonin. J. Pineal Res. 33: 61.

Reiter, R. J., D.-X. Tan, S. Burkhardt, L. C. Manchester. (2001) Melatonin in plants. Nutr. Rev. 59: 286–290.

REITER, R. J., D.-X. TAN, S. BURKHARDT (2002a) Reactive oxygen and nitrogen species and cellular and organismal decline: amelioration with melatonin. Mech. Ageing Dev. 123: 1007–1019.

REITER, R. J., D.-X. TAN, L. C. MANCHESTER, M. R. EL-SAWI (2002b) Melatonin reduces oxidant damage and promotes mitochondrial respiration: implications for aging. Ann. N.Y. Acad. Sci. 959: 238–250.

REITER, R. J., D.-X. TAN, J. C. MAYO, R. M. SAINZ, S. LOPEZ-BURILLO (2002c) Melatonin, longevity and health in the aged: an assessment. Free Radic. Res. 36: 1323–1329.

REITER, R. J., D.-X. TAN, R. M. SAINZ, J. C. MAYO, S. LOPEZ-BURILLO (2002d) Melatonin: reducing the toxicity and increasing the efficacy of drugs. J. Pharm. Pharmacol. 54: 1299–1321.

REPPERT, S. M. (1997) Melatonin receptors: molecular biology of a new family of G protein-coupled receptors. J. Biol. Rhythms 12: 528–531.

RESSMEYER, A.-R., J. C. MAYO, V. ZELOSKO, R. M. SÁINZ, D.-X. TAN, B. POEGGELER, I. ANTOLÍN, B. K. ZSIZSIK, R. J. REITER, R. HARDELAND (2003) Antioxidant properties of the melatonin metabolite N^1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK): Scavenging of free radicals and prevention of protein destruction. Redox Rep., 8: 205–213.

RODRIGUES, M. R., D. RODRIGUEZ, H. C. CATALANI, M. RUSSO, A. CAMPA (2003) Interferon-gamma independent oxidation of melatonin by macrophages. J. Pineal Res. 34: 69–74.

RODRÍGUEZ-CABEZAS, M. N., M. MACÍAS-GONZÁLEZ, D. ACUÑA-CASTROVIEJO, A. OSUNA CARRILLO (1996) Melatonin in *Trypanosoma cruzi*: Changes during its cell cycle and the photoperiod. 7th Eur. Pineal Soc. Colloquium, Sitges, p. P7.

RODRÍGUEZ-COLUNGA, M. J., C. FERNÁNDEZ, I. ANTOLÍN, C. RODRÍGUEZ, D. TOLIVIA, A. MENÉNDEZ-PELÁEZ (1991) Chronic administration of melatonin induces changes in porphyrins and in the histology of male and female hamster Harderian gland: interrelation with gonadal status. J. Pineal Res. 11: 42–48.

ROENNEBERG, T. (1996) Ecological aspects of the multi-oscillatory circadian system in *Gonyaulax polyedra*. 1st Eur. Phycol. Congress, Cologne, p. 6.

ROENNEBERG, T., J. REHMAN (1996) Nitrate, a nonphotic signal for the circadian system. FASEB J. 10: 1443–1447.

SAITO, K., M. P. HEYES (1996) Kynurenine pathway enzymes in brain. Properties of enzymes and regulation of quinolinic acid synthesis. Adv. Exp. Med. Biol. 398: 485–492.

SCHOENKE, M., B. POEGGELER, S. BURKHARDT, R. HARDELAND, B. K. ZSIZSIK (2001) A comparative study on products formed from indoleamines in radical-generating systems. In: Actions and Redox Properties of Melatonin and Other Aromatic Amino Acid Metabolites, R. Hardeland, ed. Cuvillier, Göttingen, pp. 32–38.

SEONG, C., Y. A. KIM, J. J. CHUNG, D. PARK, J. YIM, K. BAEK, Y. S. PARK, K. HAN, J. YOON (1998) Isolation and characterization of the Drosophila melanogaster cDNA encoding the sepiapterin reductase. Biochim. Biophys. Acta 1443: 239–244.

SHARMAN, E. H., S. C. BONDY (2001) Effects of age and dietary antioxidants on cerebral electron transport chain activity. Neurobiol. Aging 22: 629–634.

SPRENGER, J., R. HARDELAND (1999) Melatonin and 5-methoxytryptamine in yeast: Requirement of precursors. In: Studies on Antioxidants and their Metabolites, R. Hardeland, ed. Cuvillier, Göttingen, pp. 191–198.

SPRENGER, J., R. HARDELAND, B. FUHRBERG (1997) Methoxyindoles in yeast: Variability and effects of growth conditions. In: Biological Rhythms and Antioxidative Protection, R. Hardeland, ed. Cuvillier, Göttingen, pp. 116–118.

SPRENGER, J., R. HARDELAND, B. FUHRBERG, S.-Z. HAN (1999) Melatonin and other 5-methoxylated indoles in yeast: Presence in high concentrations and dependence on tryptophan availability. Cytologia 64: 209–213.

STEHLE, J. H., C. VON GALL, H. W. KORF (2003) Melatonin: a clock-output, a clock-input. J. Neuroendocrinol. 15: 383–389.

TAN, D.-X. (2002) Interrelationships between melatonin and oxidative stress: mechanistic studies of the reactions of melatonin and its metabolites with free radicals. Dissertation, Universität Göttingen.

TAN, D.-X., L.-D. CHEN, B. POEGGELER, L. C. MANCHESTER, R. J. REITER (1993) Melatonin: a potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. Endocr. J. 1: 57–60.

TAN, D.-X., R. HARDELAND, L. C. MANCHESTER, B. POEGGELER, S. LOPEZ-BURILLO, J. C. MAYO, R. M. SAINZ, R. J. REITER (2003a): Mechanistic and comparative studies of melatonin and classic antioxidants in terms of their interactions with the ABTS cation radical. J. Pineal Res. 34: 249–259.

TAN, D.-X., L. C. MANCHESTER, S. BURKHARDT, R. M. SAINZ, J. C. MAYO, R. KOHEN, E. SHOHAMI, Y.-S. HUO, R. HARDELAND, R. J. REITER (2001) N^1-acetyl-N^2-formyl-5-methoxykynuramine, a biogenic amine and melatonin metabolite, functions as a potent antioxidant. FASEB J. 15: 2294–2296.

TAN, D.-X., L. C. MANCHESTER, R. HARDELAND, S. LOPEZ-BURILLO, J. C. MAYO, R. M. SAINZ, R. J. REITER (2003b): Melatonin – a hormone, a tissue factor, an autocoid, a paracoid, and an antioxidant vitamin. J. Pineal Res. 34: 75–78.

TAN, D.-X., L. C. MANCHESTER, R. J. REITER, B. F. PLUMMER, L. J. HARDIES, S. T. WEINTRAUB, VIJAYALAXMI, A. M. M. SHEPHERD (1998) A novel melatonin metabolite, cyclic 3-hydroxymelatonin: A biomarker of *in vivo* hydroxyl radical generation. Biochem. Biophys. Res. Commun. 253: 614–620.

TAN, D.-X., L. C. MANCHESTER, R. J. REITER, B. F. PLUMMER, J. LIMSON, S. T. WEINTRAUB, W. QI (2000a) Melatonin directly scavenges hydrogen peroxide: A potentially new metabolic pathway of melatonin biotransformation. Free Radic. Biol. Med. 29: 1177–1185.

TAN, D.-X., L. C. MANCHESTER, R. J. REITER, W. QI, M. A. HANES, N. J. FARLEY (1999) High physiological levels of melatonin in the bile of mammals. Life Sci. 65: 2523–2529.

TAN, D.-X., L. C. MANCHESTER, R. J. REITER, W.-B. QI, M. KARBOWNIK, J. R. CALVO (2000b) Significance of melatonin in antioxidative defense system: Reactions and products. Biol. Signals Recept. 9: 137–159.

TAN, D.-X., R. J. REITER, L. C. MANCHESTER, M. T. YAN, M. EL-SAWI, R. M. SAINZ, J. C. MAYO, R. KOHEN, M. ALLEGRA, R. HARDELAND (2002) Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger. Curr. Top. Med. Chem. 2: 181–197.

TESORIERE, L., G. AVELLONE, L. CERAULO, D. D'ARPA, M. ALLEGRA, M. A. LIVREA (2001) Oxidation of melatonin by oxoferryl hemoglobin: a mechanistic study. Free Radic. Res. 35: 633–642.

THUERMANN, S., R. HARDELAND, B. POEGGELER (2001) Melatonin and its analogs as luminophores. A comparative study on chemiluminescence emitted during oxidation in a moderately alkaline, hemin-catalyzed H_2O_2 system. In: Actions and Red-

ox Properties of Melatonin and Other Aromatic Amino Acid Metabolites, R. Hardeland, ed. Cuvillier, Göttingen, pp. 39–48.

Tilden, A. R., M. A. Becker, L. L. Amma, J. Arciniega, A. K. McGaw (1997) Melatonin production in an aerobic photosynthetic bacterium: An evolutionarily early association with darkness. J. Pineal Res. 22: 102–106.

Tomás-Zapico, C., A. Coto-Montes, J. Martínez-Fraga, M. J. Rodríguez-Colunga, R. Hardeland, D. Tolivia (2002a): Effects of δ-aminolevulinic acid and melatonin in the Harderian gland of female Syrian hamster. Free Radic. Biol. Med. 32: 1197–1204.

Tomás-Zapico, C., R. Hardeland, B. Poeggeler, A. Coto-Montes (2001) 3-Hydroxyanthranilic acid and 3-hydroxykynurenine as photooxidants: catalysis of N^1-acetyl-N^2-formyl-5-methoxykynuramine formation from melatonin. In: Actions and Redox Properties of Melatonin and Other Aromatic Amino Acid Metabolites, R. Hardeland, ed. Cuvillier, Göttingen, pp. 136–141.

Tomás-Zapico, C., J. Martínez-Fraga, M. J. Rodríguez-Colunga, D. Tolivia, R. Hardeland, A. Coto-Montes (2002b) Melatonin protects against δ-aminolevulinic acid-induced oxidative damage in male Syrian hamster Harderian glands. Int. J. Biochem. Cell Biol. 34: 544–553.

Tosini, G. (2000) Melatonin circadian rhythm in the retina of mammals. Chronobiol. Int. 17: 599–612.

Tosini, G., C. Fukuhara (2003) Photic and circadian regulation of retinal melatonin in mammals. J. Neuroendocrinol. 15: 364–369.

Tosini, G., M. Menaker (1998) Multioscillatory circadian organization in a vertebrate, *Iguana iguana*. J. Neurosci. 18: 1105–1114.

Tricoire, H., A. Locatelli, P. Chemineau, B. Malpaux (2002) Melatonin enters the cerebrospinal fluid through the pineal recess. Endocrinology 143: 84–90.

Tsim, S.-T., J. T. Y. Wong, Y. H. Wong (1996a) Effects of dibutyryl cAMP and bacterial toxins on indoleamine-induced encystment of dinoflagellates. Biol. Signals 5: 22–29.

Tsim, S.-T., J. T. Y. Wong, Y. H. Wong (1997) Calcium ion dependency and the role of inositol phosphates in melatonin-induced encystment of dinoflagellates. J. Cell Sci. 110: 1387–1393.

Tsim, S.-T., J. T. Y. Wong, Y. H. Wong (1998) Regulation of calcium influx and phospholipase C activity by indoleamines in dinoflagellate *Crypthecodinium cohnii*. J. Pineal Res. 24: 152–161.

Tsim, S.-T., L. Y. Yung, J. T. Y. Wong, Y. H. Wong (1996b) Possible involevement of G proteins in indoleamine-induced encystment in dinoflagellates. Mol. Mar. Biol. Biotech. 5: 162–167.

Uemura, T., K. Kadota (1984) Serotonin- and melatonin-dependent light emission induced by xanthine oxidase. In: Progress in Tryptophan and Serotonin Research, H. G. Schlossberger, W. Kochen, B. Linzen, H. Steinhart, eds. Walter de Gruyter, Berlin, pp. 673–676.

Uría, H., B. Fuhrberg, R. Hardeland, A. Menéndez-Peláez (1994a) Catalysis of melatonin oxidation by protoporphyrins: An aspect of Harderian gland metabolism? Proc. Int. Symp. on the Cell Biology and Physiology of the Harderian Gland, Sorrento, p. 12.

Uría, H., B. Fuhrberg, B. Poeggeler, R. Hardeland, A. Menéndez-Peláez (1994b) Photooxidation of melatonin. In: Cell Biological Problems in Chronobiology, R. Hardeland, ed. University of Göttingen, Göttingen, pp. 89–99.

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

Van Tassel, D. L., S. D. O'Neill (2001) Putative regulatory molecules in plants: evaluating melatonin. J. Pineal Res. 31: 1–7.

Van Tassel, D. L., N. Roberts, A. Lewy, S. D. O'Neill (2001) Melatonin in plant organs. J. Pineal Res. 31: 8–15.

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

Werner, A., K. Lüning (1998) Does the vertebrate pineal hormone melatonin regulate circadian and circannual growth rhythm in the brown alga *Pterygophora californica*? Workshop Eur. Soc. Chronobiol. "News from the Plant Chronobiology Research", Markgrafenheide, abstract.

Withyachumnarnkul, B., K. Buppaniroj, A. Pongsa-Asawapaiboon (1992a) *N*-Acetyltransferase and melatonin levels in the optic lobe of giant freshwater prawns, *Macrobrachium rosenbergii* de Man. Comp. Biochem. Physiol. 102A: 703–707.

Withyachumnarnkul, B., A. Pongsa-Asawapaiboon, S. Ajpru, P. Siamwalla, W. Trakulrungsi, C. Samritthong (1992b) Continuous light increases *N*-acetyltransferase activity in the optic lobe of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* de Man (Crustacea: Decapoda). Life Sci. 51: 1479–1484.

Witt-Enderby, P. A., J. Bennett, M. J. Jarzynska, S. Firestine, M. A. Melan (2003) Melatonin receptors and their regulation: biochemical and structural mechanisms. Life Sci. 72: 2183–2198.

Wong, J. T. Y., Y. H. Wong (1994) Indoleamine-induced encystment in dinoflagellates. J. Mar. Biol. Assoc. U.K. 74: 467–469.

Ximenes, V. F., L. H. Catalani, A. Campa (2001) Oxidation of melatonin and tryptophan by an HRP cycle involving compound III. Biochem. Biophys. Res. Commun. 287: 130–134.

Yoshizawa, Y., K. Wakabayashi, T. Shinozawa (1991) Inhibition of planarian regeneration by melatonin. Hydrobiologia 227: 31–40.

Young, I., R. M. Leone, P. Francis, P. Stovell, R. E. Silman (1985) Melatonin is metabolized to *N*-acetyl-serotonin and 6-hydroxymelatonin in man. J. Clin. Endocrinol. Metab. 60: 114–119.

Yu, H. S., S. F. Pang, P. L. Tang (1981) Increase in the level of retinal melatonin and persistence of its diurnal rhythm in rats after pinealectomy. J. Endocrinol. 91: 477–481.

Abstract

Melatonin is not only a pineal hormone, but a ubiquitous compound present in bacteria, unicellular eucaryotes, macroalgae, vesicular plants, fungi and various, phylogenetically distant animal taxa. Exact determinations in non-vertebrate material, especially in photosynthetic organisms, require particular preservative procedures and determinations of recovery. In vertebrates, melatonin is mainly secreted by the pineal gland, but additionally formed in various extrapineal sites, from which it is released either in minor amounts or only under certain con-

ditions. Pineal melatonin can be loaded to tissues, a process which may be particularly important in the brain. High amounts of melatonin are released to the 3rd ventricle via the pineal recess. Extrapineal melatonin does not always exhibit marked circadian variations. In the gastrointestinal tract, the rhythm may be weak or even absent. In the rodent Harderian gland, rhythmicity is negligible. In several organs of invertebrates, melatonin formation can be associated with light instead of darkness, perhaps indicating a photoprotective role. In some other organisms, melatonin was found to be arrhythmic. In yeast, the absence of rhythmicity can be explained by the lack of control elements required for photic regulation of arylalkylamine *N*-acetyltransferase. In phylogenetically distant organisms, melatonin exhibits effects on the cytoskeleton, a presumably ancient function of this molecule. Contrary to the circulating hormone, melatonin can be metabolized in non-hepatic tissues via several pathways independent of P_{450} monooxygenases. This holds especially for the central nervous system, but also for several non-vertebrate organisms. In many non-metazoans and primitive metazoans lacking renal excretion mechanisms, there is no need for 6-hydroxymelatonin formation and subsequent conjugation. In non-hepatic tissues of vertebrates and in several non-metazoans, melatonin is deacetylated to 5-methoxytryptamine (5-MT), demethylated to *N*-acetylserotonin, or oxidatively cleaved to give N^1-acetyl-N^2-formyl-5-methoxykynuramine (AFMK). 5-MT can be further metabolized via monoamine oxidase and alcohol or aldehyde dehydrogenase. AFMK is deformylated to N^1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK). Non-enzymatic reactions via free radicals can be involved in the formation of these substituted kynuramines and also give rise to another product, cyclic 3-hydroxymelatonin. The kynuramines are considered as putative signaling molecules, AMK having additional properties as a cyclooxygenase inhibitor and radical scavenger. In dinoflagellates, deacetylation of melatonin to 5-MT is important because this metabolite controls bioluminescence and induces, at elevated physiological concentrations, the formation of asexual cysts. Both processes involve vacuolar-cytoplasmic proton translocation. Therefore, 5-MT effects on light emission and encystment can be mimicked by protonophores. In *Lingulodinium polyedrum* (syn. *Gonyaulax polyedra*), the circadian glow maximum is depressed by depletion of melatonin and 5-MT, either by blocking the biosynthetic pathway or by sublethal oxidative stress. This peak can, however, be restored by repleting the melatonin pool. In the course of cyst induction by environmental stimuli, short-day plus moderately decreased temperature, melatonin concentration integrates these two external signals. The drop in temperature causes dramatic rises in melatonin, which, in short-days, lead to cyst-inducing 5-MT levels. This process can be inhibited by high nitrate as a nitrogen source favouring active life. Antioxidative protection by melatonin, another presumably ancient function of this molecule, represents a complex phenomenon not yet fully understood. This is not only a matter of direct radical scavenging, but comprises upregulation of antioxidant and downregulation of prooxidant enzymes. Nevertheless, circadian rhythmicity of free radical formation in nocturnal and diurnal animals indicates that this explanation is still insufficient. Novel findings on melatonin binding to quinone reductase 2 and on protection of mitochondrial functions at nanomolar concentrations offer new directions in the analysis of protection mechanisms. A model based on electron interception by melatonin and/or AMK at the mitochondrial electron transport chain, requiring only catalytic amounts of the compound, is discussed. This new concept does not focus on detoxification of free radicals already formed, but rather on radical avoidance.