

**Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**
(Direktor: Prof. Dr. Dr. Bernd Fischer)

**Entwicklung und Validierung eines Direkt-Radioimmunoassays
zur quantitativen Bestimmung von Gesamt-Melatonin (N-Acetyl-5-methoxytryptamin)
bei unterschiedlichen Mauslinien**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor rerum medicarum (Dr. rer. medic.) für das Fachgebiet
Medizinische Immunologie

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von André Welp
geboren am 18.08.1971 in Ankum

Betreuer: Prof. Dr. Elmar Peschke

Gutachter/ Gutachterin:

1. Prof. Dr. Stefan Reuss, Mainz
2. PD Dr. Hans-Jürgen Brömme, Halle
3. Prof. Dr. Elmar Peschke, Halle

verteidigt am: 08.09.2010

Referat

Die bisher publizierten Methoden zur Bestimmung von Melatonin bei verschiedenen Mausmodellen waren überwiegend ungeeignet oder aufwendig in der Durchführung. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein einfacher, sensitiver und spezifischer Radioimmunoassay (RIA) für die quantitative Detektion von Gesamt-Melatonin in Serum- bzw. Plasmaproben bei unterschiedlichen Mauslinien entwickelt. Durch die Herstellung einer spezifischen Mausegleichsmatrix wird die Beeinflussung von Messergebnissen aufgrund unterschiedlicher Zusammensetzung zwischen Standards und Probenmatrix verringert. Mit einem geeigneten Syntheseverfahren zur Herstellung eines Immunisierungskonjugats ist es gelungen, einen Antikörper gegen Melatonin zu generieren. Die Überprüfung der Kreuzreaktionen zu zehn strukturähnlichen Substanzen zeigte, dass der Antikörper eine hohe Spezifität zu Melatonin besitzt. Der Test erfasst das gesamte Melatonin, weil mit der Einführung eines Enzymschritts das an Proteine gebundene Melatonin getrennt wird. In dieser Arbeit ist die Markierung mit [¹²⁵I]-Bolton-Hunter-Reagenz beschrieben, was ein effektives Verfahren zur Einführung radioaktiven Iods in eine Vielzahl verschiedener Proteine, Peptide und Moleküle mit Amino-Gruppen darstellt. Die geforderten Akzeptanzkriterien für die Validierungsparameter wurden erfüllt. Die Standardkurve deckt bei einem Probenvolumen von nur 50 µL einen Arbeitsbereich von 12 bis 4000 pg/mL ab. Die Nachweisgrenze liegt für Mausserum bei 9,1 pg/mL und für Mausplasma bei 7,3 pg/mL. Für die mittlere Wiederfindungsrate von Melatonin wurde für Mausserum ein Wert von 108,0 % und für Mausplasma von 99,3 % ermittelt. Anhand der Bestimmung eines 24-h Profils von endogenem Melatonin in Serum- und Plasmaproben von Kontroll-Mäusen konnte ein diurnaler Rhythmus des Melatonins erfasst und deutlich zwischen niedrigen Tag- und hohen Nachtwerten unterschieden werden. Der validierte „Direkt-RIA“ wurde mit etablierten Extraktionsmethoden wie Flüssig-Flüssig- und Festphasenextraktion sowie anschließendem RIA verglichen. Die Korrelation zur Methanolextraktion ist $y = 1,1x - 0,9$; $R^2 = 0,98$, $P < 0,001$ und zur C₁₈-Extraktion $y = 0,8x - 0,03$; $R^2 = 0,99$, $P < 0,001$. Der „Direkt-RIA“ hat gegenüber den Extraktionsmethoden den entscheidenden Vorteil, dass die Durchführung wesentlich schneller ist. Bei einem Testvergleich zu einem kommerziell erhältlichen RIA konnte der „Direkt-RIA“ durch seinen weiten Arbeitsbereich und die einfache Durchführung überzeugen. Mit dem „Direkt-RIA“ konnte der Nachweis einer nächtlich erhöhten Melatoninsynthese bei vier unterschiedlichen Mauslinien erbracht werden. Die Melatonin-Bestimmungen mittels ELISA- oder HPLC-Techniken scheiterten bisher am Gebrauch eines hohen Probenvolumens und geringerer Sensitivität. Zusammenfassend können folgende Vorteile des „Direkt-RIA“ hervorgehoben werden: Einfache und schnelle Durchführung des Assays, höhere Anfangsaktivität des Tracers, weiter Arbeitsbereich, hohe Spezifität des Antikörpers, niedriges Probenvolumen und hohe Sensitivität. Tagesrhythmen von Melatonin mit erhöhten Melatoninwerten in der Nacht können mit dem „Direkt-RIA“ bei unterschiedlichen Mauslinien nachgewiesen werden.

Welp, André: Entwicklung und Validierung eines Direkt-Radioimmunoassays zur quantitativen Bestimmung von Gesamt-Melatonin (N-Acetyl-5-methoxytryptamin) bei unterschiedlichen Mauslinien. Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 80 Seiten, 2010.

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	III
1. Einleitung	1
2. Materialien und Methoden	13
2.1. Verwendete Chemikalien und Reagenzien	13
2.2. Verwendete Geräte	14
2.3. Verwendete Verbrauchsmaterialien	14
2.4. Mausproben für die Ausgleichsmatrix	14
2.5. EDTA-Plasma- und Serum-Kontrollproben	14
2.6. Haltung der Kontroll-Mäuse	15
2.7. Puffer und Lösungen	15
2.8. Testkomponenten für den Melatonin „Direkt-RIA“	16
2.9. Pipettierschema	16
2.10. Vorversuche	17
2.11. Validierung	20
2.12. Anwendungen	27
3. Ergebnisse	31
3.1. Vorversuche	31
3.1.1. Mause Ausgleichsmatrix	31
3.1.2. Melatonin-Antikörper	33
3.1.3. Bestimmung des Gesamt-Melatonins (freies und gebundenes Melatonin)	33
3.1.4. Herstellung und Überprüfung der Reproduktion des Melatonin-Tracers	36
3.2. Validierung	38
3.2.1. Typische Standardkurve und Arbeitsbereich	38
3.2.2. Nachweisgrenze	39
3.2.3. Wiederfindungsrate	39
3.2.4. Linearität	42
3.2.5. Präzision	43
3.2.6. Probenstabilität	48
3.2.7. Robustheit	50
3.2.8. Spezifität	51
3.3. Anwendungen	52

3.3.1	Bestimmung von endogenem Melatonin in unbekanntem Serum- und Plasmaproben von Kontroll-Mäusen und Erstellung eines 24-h Profils	52
3.3.2	Flüssig-Flüssig-Extraktion vs. Direkt-Bestimmung	52
3.3.3	Festphasenextraktion vs. Direkt-Bestimmung	54
3.3.4	Vergleich eines Melatonin 24-h Profils im Serum und Plasma von Kontroll-Mäusen analysiert mit dem „Direkt-RIA“ sowie mit Methanol- bzw. C ₁₈ -Extraktion	55
3.3.5	Testvergleich mit einem kommerziell erhältlichen direkt RIA	55
3.3.6	Bestimmung von Melatoninkonzentrationen bei unterschiedlichen Mauslinien	56
4.	Diskussion	57
5.	Zusammenfassung	70
6.	Literaturverzeichnis	72
7.	Thesen	79
	Lebenslauf	VI
	Selbständigkeitserklärung	VII
	Erklärung über Promotionsversuche	VII
	Danksagung	VIII

Abkürzungsverzeichnis

[³ H]	Tritium
μCi	Microcurie
[¹²⁵ J]	Jod 125
[¹³¹ J]	Jod 131
5HT	5-Hydroxytryptamin
5HTP	5-Hydroxytryptophan
AA-NAT	Arylalkylamin-N-acetyltransferase
Ab	Antikörper
Ab*	markierter Antikörper
a _r	Ordinatenabschnitt der Wiederfindungsgeraden
Ag	Antigen
Ag*	markiertes Antigen
AK	Antikörper
AS	Antiserum
B	Bindung eines Standards
B/B0	absolute Bindung des radioaktiv markierten Tracers
B0	maximale Bindung
BA 3300	Testkit für Melatonin in humanem Serum
b _r	„Steigung“ der Wiederfindungsgeraden
BSA	Bovine-Serum-Albumin
C ₁₈	Octadecyl-SPE-Kartusche
cpm	counts per minute
DIN	Deutsches Institut für Normung
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
f	Freiheitsgrad
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
GLP	Good Laboratory Practice
GMP	Good Manufacturing Practice
g _o	obere Grenze
g _u	untere Grenze
HIOMT	Hydroxyindol-O-methyltransferase
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IA	Immunoassay(s)

IDF Diabetes	International Diabestes Federation
IgG	Immunglobulin(e) der G-Fraktion
IRMA	Immunradiometrischer Assay
K	Gleichgewichtskonstante
K1 und K2	Kontrolle 1 und Kontrolle 2
L:D	Licht zu Dunkel
LIA	Lumineszenz immuno assay
M	mol
m	Steigung
MG	Molekulargewicht
MP	Mausplasma
mRNA	messenger ribonucleic acid
MS	Mausserum
MW	Mittelwert
N oder n	Anzahl der Bestimmungen
NSB	Nicht spezifische Bindung
NWG	Nachweisgrenze
OSG	Obere Spezifikationsgrenze
PEG	Polyethylenglykol
P	Wahrscheinlichkeit
PG	Prüfgröße nach David
pmol	picomol
Q	Prüfgröße nach Grubbs-Test
Q _{xx}	Quadratsummen
R ²	Bestimmtheitsmaß
RIA	Radioimmunoassay
rpm	rotation per minute
RT	Raumtemperatur
s	Standardabweichung
s _{af}	Standardabweichung des Achsenabschnitts a _f
SAM	S-adenosyl-methionin
s _{bf}	Standardabweichung der Steigung b _f
Schmp.	Schmelzpunkt
SCN	Nucleus suprachiasmaticus
SD	Standardabweichung
SPE	Festphasenextraktion

s_y	Reststandardabweichung der Wiederfindungsgeraden
t	Tabellenwert der t-Verteilung
T	Totalaktivität
TCA	Trichloressigsäure
U	Unsicherheit
USG	Untere Spezifikationsgrenze
VB	Vertrauensbereich
VK	Variationskoeffizient(en)
WFR	Wiederfindungsrate
WHO	World Health Organisation
x_c	Mittelwert Sollwerte
x_f	Mittelwert Istwerte

1. Einleitung

1.1 Einführung in die Problematik

Seit der Entdeckung von Melatonin als Hormon des Pinealorgans und seiner Strukturaufklärung [Lerner et al., 1958] hat sich die Sicht über die Funktion dieser Substanz mehrfach beträchtlich gewandelt und vor allem erweitert. Das Pinealorgan (Epiphysis cerebri) produziert das Hormon Melatonin im Allgemeinen in Abhängigkeit vom Licht-Dunkelwechsel der Umgebung (Photoperiode). Die Hauptaufgabe des Pinealorgans ist es, die physikalischen Merkmale Tageszeit und Jahreszeit in ein Hormonsignal umzuwandeln, das vom Organismus als endokriner „Zeitgeber“ interpretiert wird. Hierdurch wird es möglich, tageszeitliche (diurnale) als auch jahreszeitliche (saisonale) physiologische Prozesse mit der Außenwelt sinnvoll zu koordinieren [Reiter, 1986]. Von Melatonin beeinflusst werden sowohl der circadiane Schrittmacher SCN (suprachiasmatischer Nucleus) [Stehle et al., 2002; Jin et al., 2003] als auch weitere zentralnervöse Strukturen [Poirel et al., 2003] und viele periphere Organe, in denen Rezeptoren und andere Bindungsstellen für Melatonin zu finden sind [Hardeland und Poeggeler, 2003], z.B. Leber, Herz und endokrines Pankreas [Peschke et al., 2000, 2002]. Über die Bedeutung und Funktion des zentralen circadianen Oszillators liegt inzwischen eine Reihe von schlüssigen Erkenntnissen vor [Cermakian et al., 2000; Balsalobre, 2002; Stehle et al., 2002]. Die Bedeutung eines circadianen (endogenen) Oszillators für die Ausschüttung des zentralen Hormons der Glucose-Homöostase, dem Insulin, konnte von Peschke u. Mitarb. [1998] in einer ex vivo-Studie an isolierten pankreatischen Inseln der Ratte aufgezeigt werden. Diese Ergebnisse führten zu der Erkenntnis, dass das Inselorgan eine weitgehende Autonomie bezüglich der endogenen circadianen Oszillation aufweist. Damit war es gelungen, die Bedeutung von Melatonin für die Insulinsekretion zu konkretisieren [Peschke et al., 2000, 2002]. Weiterhin war der Frage nachzugehen, ob pankreatische β -Zellen möglicherweise über Melatonin-Rezeptoren verfügen und über welche intrazelluläre(n) Signaltransduktionskaskade(n) die Effekte erklärbar sein könnten [Peschke et al., 2006; Peschke, 2008]. Sie wird vor allem von Befunden an verschiedenen „knockout“-Mausmodellen unterstützt, bei denen die Melatoninrezeptoren (MT1 + MT2) inaktiviert wurden. Diese „knockout“-Mäuse sind also Melatoninrezeptor-defizient. Es soll festgestellt werden, welche Rezeptor-Defizienz (MT1 oder MT2) für die Fragestellung „Melatonin-Einfluss auf die Insulin-Sekretion“, entscheidend ist. Zwei weitere Mausmodelle sollen bei der Klärung der Fragestellung helfen, nämlich die Melatonin-profiziente C3H- und die Melatonin-defiziente C57BL-Maus. Alle Linien zusammen sollen dazu beitragen, die Melatonin-Rezeptor und/oder Melatonin-Bedeutung für die Insulinsekretion zu erfassen. Inzwischen konnte mittels zellphysiologischer, immunhistochemischer, biochemischer sowie molekularbiologischer Methoden die Bedeutung chronobiologischer Aspekte für die Diabetogenese unterstrichen werden. Außerdem wurden verschiedene Methoden für die Bestimmung von Melatonin im Plasma oder Serum entwickelt, wie z.B. GC-MS und HPLC [Cattabeni et al., 1972; Lewy und Markey, 1978; Goldman et al., 1980]. Die Nachteile sind ein hoher apparativer Aufwand, hohe Störanfälligkeit, aufwendige Probenvorbereitungen sowie ein hohes Probenvolumen und geringe

Sensitivität. Als Alternative boten sich Radio- und Enzymimmunoassays an [Arendt et al., 1975; Levine und Riceberg, 1975; Kennaway, 1977; Manz et al., 1989; Vaughan, 1993]. Eine große Anzahl von radioimmunologischen Methoden wurde veröffentlicht [Rollag, 1981]. Diese Assays unterscheiden sich z.B. in den Probenvorbereitungen. Die meisten RIA benötigen einen aufwendigen Extraktionsschritt, um den Analyten aus der Matrix zu isolieren und ihn dann wieder in einer Protein-freien Matrix aufzunehmen. Außerdem ist für die Extraktion ein hohes Probenvolumen notwendig [Vakkuri et al., 1984; Kennaway et al., 2003]. Bei der Gewinnung von brauchbaren Melatonin-Antikörpern werden verschiedene Synthesewege für die Herstellung von Immunisierungskonjugaten mit unterschiedlichem Erfolg bei der Spezifität gewählt [Goodfriend et al., 1964; Grota und Brown, 1973; Arendt et al., 1975; Manz et al., 1989]. Einige Testmethoden sind geeignet, nur das freie Melatonin zu analysieren, wogegen Assays für die Gesamt-Melatoninbestimmung aufwendige Probenvorbereitungsschritte zum Trennen von proteingebundenen Melatonin benötigen [Cardinali et al., 1972; Di et al., 1998; Kennaway et al., 2002]. Die häufigsten RIA zur Bestimmung von Melatonin verwenden [^3H]-Melatonin als Tracer [Vakkuri et al., 1984; Webley et al., 1985]. Mit dieser Form der Markierung ist aber nur eine niedrige spezifische Aktivität erreichbar und die Markierungsmethode ist kompliziert. Die meisten der genannten Testverfahren sind für die Detektion von Melatonin in Mausproben ungeeignet, benötigen große Probenmengen oder sind zu aufwendig in der Durchführung.

1.2 Das Epiphysenhormon Melatonin

1.2.1 Allgemeine Grundlagen

Melatonin, (N-Acetyl-5-methoxytryptamin), $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2$, MG 232,27, bestehend aus blassgelben Blättchen, weist einen Schmp. von 118 bis 119 °C auf [Römpp, 1995] und ist das Hauptsekretionsprodukt der Epiphyse, das 1958 von Lerner u. Mitarb. aus Rinderepiphysen extrahiert werden konnte.

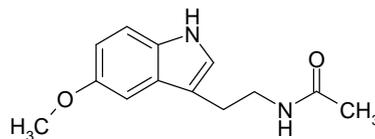


Abb. 1: Strukturformel von Melatonin

Sein Name rührt von seiner Entdeckung her, den Melanophoren des Krallenfrosches *Xenopus Laevis*. Aaron Lerner beobachtete, dass sich Krallenfrosch-Melanophoren unter den Einfluss von Melatonin zusammenziehen (Tonus). Nach seiner Fähigkeit, die Pigmentation der Haut von Amphibien aufzuhellen, wurde das Hormon Melatonin genannt [Lerner et al., 1958].

1.2.2 Synthese, Metabolisierung und Pharmakokinetik

Nach Aufnahme von Tryptophan aus dem Blut in die Pinealozysten durch aktiven Transport – die Epiphyse gehört zu den zirkumventrikulären Organen und besitzt folglich keine Blut-Hirn-Schranke – kommt es zur Bildung von 5-Hydroxytryptophan durch das mitochondriale Enzym Tryptophan-5-hydroxylase. Da das Enzym in hohen Konzentrationen in der Epiphyse vorliegt, ist die Verfügbarkeit

von Tryptophan der limitierende Faktor. Die Aktivität des Enzyms erhöht sich in der Dunkelheit um das Zweifache. Durch die aromatische Aminosäuredecarboxylase im Zellplasma wird 5-Hydroxytryptophan zu 5-Hydroxytryptamin, dem Serotonin decarboxyliert. Die Konzentration des Serotonins in der Epiphyse unterliegt circadianen Schwankungen und ist nachts am niedrigsten. Als nächstes erfolgt die N-Acetylierung des Serotonins durch die Arylalkylamin-N-Acetyltransferase (AA-NAT) zu N-Acetylserotonin. Dieses Enzym ist im Zytoplasma der Pinealozysten lokalisiert und benötigt als Kofaktor Acetyl-CoA. Die Aktivität des Enzyms in der Epiphyse der Ratte ist nachts um das 30- bis 70-fache und in der Epiphyse des Rhesusaffen um das 4-fache höher als tagsüber, während die AA-NAT-mRNA-Konzentration tags wie nachts gleich hoch ist. Dies weist darauf hin, dass die posttranskriptionelle Kontrolle des Enzyms eine dominante Rolle in der Regulation der Melatoninsynthese spielt [Klein et al., 1998; Coon et al., 2002], also der limitierende Schritt der Melatoninsynthese ist. Die Höhe der nächtlichen AA-NAT-Konzentration ist sehr speziesspezifisch. In einem abschließenden Schritt wird eine Methylgruppe vom S-Adenosyl-Methionin (SAM) durch das zytosolische Enzym Hydroxyindol-O-Methyltransferase (HIOMT) auf das N-Acetylserotonin übertragen, so dass N-Acetyl-5-methoxytryptamin, das Melatonin, entsteht. Die Tag-Nacht-Schwankung von HIOMT ist nur gering ausgeprägt [Klein et al., 1981], graduelle Unterschiede sind nur über Perioden von Tagen oder Wochen erkennbar [Sugden, 1989]. Die rhythmische Melatoninproduktion zeigt abhängig von der Spezies um das 2- bis 15-fache erhöhte Melatoninmengen während der Dunkelperiode, unabhängig davon, ob die Tiere tag- oder nachtaktiv sind. Unterschiedliche Spezies zeigen auch verschiedene Sekretionsmuster [Reiter, 1986]. Das Sekretionsmuster während der Nacht zeigt meist zwei bis drei Peaks im Blut. Die nächtliche Melatoninsekretion des Menschen ist beim Säugling bis zu drei Monaten kaum messbar niedrig. Vermutlich beginnt die circadiane Melatonin-Rhythmik erst postnatal, nachdem die postganglionären sympathischen Nervenfasern in die Epiphyse eingewachsen sind [Rollag, 1981]. Die Sekretion erreicht in der frühen Kindheit mit ein bis drei Jahren ein Maximum, um danach bis zum Ende der Adoleszenz abzufallen. Eine weitere moderate Abnahme der Sekretion findet bis ins Senium statt [Waldhauser et al., 1988; Touitou, 2001]. Die Metabolisierung des Hormons erfolgt zunächst in der Leber zu 6-Hydroxymelatonin. Das hydroxylierte Produkt kann dann sulfatiert oder glukuronidiert mit dem Harn ausgeschieden werden. Letzteres findet vor allem bei Nagetieren und Menschen statt. Melatonin besitzt bei Nagetieren und dem Menschen eine kurze Halbwertszeit, die etwa 2 bis 45 Minuten beträgt [Arendt, 1995].

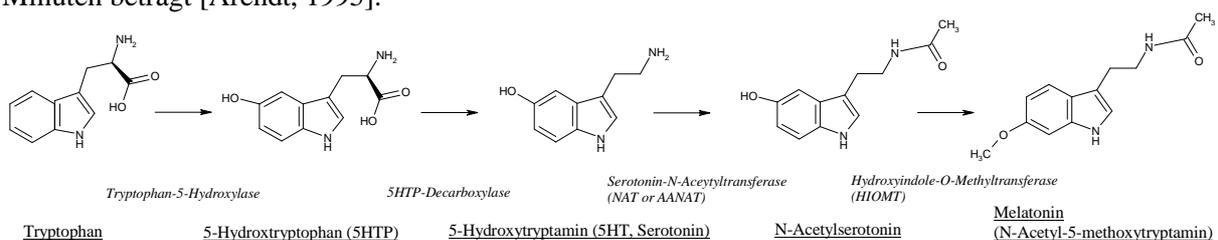


Abb. 2: Biosynthese von Melatonin (nach Arendt, 1995)

1.2.3 Wirkung und mögliche therapeutische Einsatzgebiete

Die physiologische Wirkung von Melatonin im Organismus wird über Melatoninrezeptoren vermittelt und ist außerordentlich vielfältig. Zu den Zielgeweben von Melatonin zählen u.a. der Hypothalamus, die Hypophyse und periphere Gewebe wie Ovar, Magen-Darm-Trakt und Blutgefäße. Der Rhythmus der Melatoninproduktion ist bei Säugetieren unter der Kontrolle des Nucleus suprachiasmaticus (SCN) im Hypothalamus, dem so genannten zentralen Schrittmacher („major oscillator“, „biologische Uhr“). Der SCN wird durch den täglichen Licht-Dunkel-Zyklus synchronisiert („entrained“). Über einen direkten Weg von der Retina über den retinohypothalamischen Trakt (RHT) werden dem SCN Informationen über die Lichtverhältnisse vermittelt. Die Epiphyse vermittelt über die Sekretion von Melatonin Informationen über die Tageslänge. Durch den Anstieg von Melatonin in der Nacht wird dem Organismus eine endogene circadiane Rhythmik vermittelt, die durch exogene Einflüsse aus der Umwelt wie Temperatur, soziale Regel, Fütterungszeiten oder L:D-Wechsel synchronisiert wird. Licht genügend hoher Intensität ist der bedeutendste Synchronisator für circadiane und circannuale (saisonale) Rhythmen. Dies wird Photoperiodizität genannt [Carter, 1978]. Es finden saisonale Veränderungen in der Physiologie und dem Verhalten statt. Der Reproduktionszyklus von sich saisonal fortpflanzenden Tieren wird primär über die Tageslänge gesteuert. Bei Schafen führen exogene Gaben von Melatonin während Langtag zu einem vorzeitigen Anstieg der Gonadotropin-Sekretion und einem frühen Beginn der Paarungszeit. Gleichzeitig nimmt die Prolaktin-Sekretion ab. Auch die Fellbeschaffenheit, der Appetit und das Körpergewicht verändern sich im Verlaufe eines Jahres [Arendt, 1995]. Beim Menschen sind ebenfalls saisonale Muster in der Konzeptionsrate und der Menarche zu erkennen, wobei dies von soziokulturelle Faktoren maskiert nicht so ausgeprägt wie bei vielen Tieren auftritt [Arendt et al., 1975]. Störungen des circadianen Systems führen zu einer verkürzten Lebensspanne, parallel dazu nimmt die Synthese und Freisetzung von Melatonin im Alter stark ab [Brzezinski, 1997; Pang et al., 2005]. Es wurde gezeigt, dass exogene Melatoningaben die circadiane Kopplung, also die Manifestierung geregelter Rhythmen, verstärkt [Pierpaoli und Regelson, 1994; Anisimov, 2003]. Außerdem haben Pierpaoli u. Mitarb. [1994] festgestellt, dass die Lebensspanne von Mäusen durch Melatoninsubstitution verlängert werden kann. Sie berichten über eine um 20 % verlängerte Lebensdauer nach täglicher Applikation von Melatonin im Trinkwasser oder Transplantationen junger Epiphysen in alte Mäuse. Nicht beachtet wurde jedoch, dass bei den Versuchen auch Melatonin-defiziente Stämme eingesetzt wurden. Es können auch weitere, altersbedingte Veränderungen durch diese Substitution verhindert oder zumindest abgemildert werden [Reiter, 1986; Koster-Van Hoffen et al., 1993].

1.2.4 Melatonin und Diabetes

Die Bedeutung eines funktionierenden Glucosestoffwechsels wird an der am häufigsten verbreiteten Stoffwechsellentgleisung der Gegenwart deutlich: dem Diabetes mellitus Typ2. Im Jahr 2006 gab es nach Angaben der WHO in Deutschland acht Millionen an Diabetes Erkrankte, bis 2010 wird diese

Zahl auf mindestens zehn Millionen steigen (Deutsche Diabetes-Union: Gesundheitsbericht Diabetes 2007).

Tabelle 1: Menschen mit Diabetes weltweit

Jahr	Menschen mit Diabetes weltweit	Anteil an der Weltbevölkerung	Schätzung	Quelle
1994	110 Millionen	/	2010: 239 Millionen	International Diabetes Institute
1995	135 Millionen	/	2025: 299 Millionen	WHO
2000	150 Millionen	/	2025: 300 Millionen	Diabetologie kompakt, 4. Auflage 2006
2003	194 Millionen	5,1 %	2025: 333 Millionen	IDF Diabetes Atlas 2003
2006	246 Millionen	6,0 %	2025: 380 Millionen	IDF Diabetes Atlas 2006

Neuere Befunde zeigen, dass Melatonin auch die Insulinsekretion beeinflusst. Zellphysiologische, autoradiographische sowie molekularbiologische Untersuchungen haben ergeben, dass Melatonin die Insulinsekretion senkt [Peschke und Peschke, 1998; Peschke et al., 2002]. Zusätzlich vermag Melatonin unter bestimmten Bedingungen die Insulinsekretion zu stimulieren [Bach et al., 2005]. Ferner konnte nachgewiesen werden, dass die Insulinsekretion ebenso wie die Expression pankreatischer Uhrengene circadianrhythmisch erfolgt und dass Melatonin ein potenter Radikal-Scavenger ist [Brömme et al., 2000; Ebelt et al., 2000; Peschke et al., 2000]. Jüngste Ergebnisse belegen, dass die bisherigen Befunde auf den Menschen übertragbar sind (die menschliche Insel verfügt ebenso wie die der Ratte und der Ratten-Insulinomazelle INS1 über MT1 und MT2-Rezeptoren) und dass Typ2-Diabetiker ebenso wie Typ2-diabetische Goto-Kakizaki-Ratten (GK) erniedrigte Melatonin-Spiegel bei erhöhter MT1-Rezeptorexpression aufweisen [Peschke et al., 2006]. Daraus resultiert, dass es einen engen Zusammenhang zwischen Melatonin- und Insulin-Sekretion gibt und dass diabetische Stoffwechselstörungen im Alter von starker Senkung der Melatonin-Synthese und -Freisetzung begleitet sind. Hinzu kommt, dass bei steigender Typ2-Diabetes-Inzidenz mit zunehmendem Alter die Melatonin-Synthese abfällt.

1.2.5 Nachweismethoden für Melatonin

Die Bestimmung von Melatonin in verschiedenen biologischen Untersuchungsmaterialien erfordern sensitive und zuverlässige Methoden. In der Literatur sind viele Methoden beschrieben, die auf physikalisch-chemischer, z.B. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) und Massenspektrometrische Detektion (GC-MS) [Cattabeni et al., 1972; Wilson et al., 1977; Lewy und Markey, 1978; Leone et al., 1979; Goldman et al., 1980; Iinuma et al., 1999; Vieira et al., 2000] oder auf immunologischer Basis (RIA, ELISA bzw. LIA) [Arendt et al., 1975; Levine und Riceberg, 1975; Kennaway, 1977; Thoreson, 1978; Vakkuri et al., 1984; Ferrua und Masseyeff, 1985; Manz et al., 1989; Rebolgar, 1999] beruhen. Immunoassays basieren auf einer Antikörper-Antigen-Reaktion. Die Bindung zwischen Antikörper und Antigen unter Ausbildung eines Komplexes ist äußerst selektiv

(Schlüssel-Schloss-Prinzip) und kann daher für den quantitativen Nachweis (pico- bis femtomolare Konzentration, 10^{-12} bis 10^{-15} M) des Antigens benutzt werden. Ein weiterer Vorteil ist, dass die Spurenbestimmung in komplexen Matrices (Serum, Plasma) ohne vorherige Abtrennung der Matrix möglich ist [Keller, 1991].

1.3 Immunoassays

1.3.1 Allgemeine Grundlagen über Immunoassays und immunochemische Methoden

Als Immunoassays werden zusammenfassend eine Reihe von Methoden in der Bioanalytik bezeichnet, deren gemeinsames Grundprinzip die Erkennung und damit der Nachweis eines Analyten in einer flüssigen Phase durch die Bindung eines Antigens an einen Antikörper ist. Je nach Konfiguration des Assays können sowohl Antigen als auch Antikörper der nachzuweisende Analyt sein. Bei der Durchführung von Immunoassays wird die hohe Spezifität und Bindungsstärke zwischen Antigenen und Antikörpern genutzt.

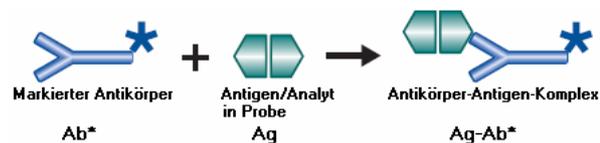


Abb. 3: Antikörper als Tracer (schematisiert)

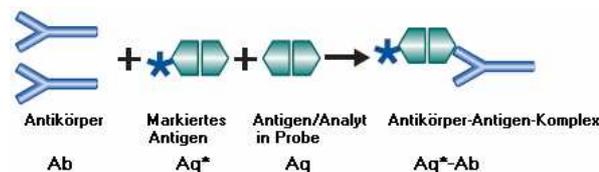


Abb. 4: Antigen als Tracer (schematisiert)

Antikörper sind lösliche Glykoproteine aus der Klasse der Immunglobuline, die im Wirbeltierorganismus als Reaktion auf einen Fremdstoff (Antigen) gebildet werden. Ein Antikörper bindet nur an einen kleinen Bereich der Antigenoberfläche, die sogenannte antigene Determinante. Als Antigen werden vom Immunsystem nur Makromoleküle wie Proteine, Polysaccharide, Nukleinsäuren oder auch synthetische Polymere erkannt. Kleine Moleküle (Haptene), wie z.B. Melatonin, müssen, damit sie eine Immunreaktion erzeugen können, mit einem Makromolekül konjugiert werden. Antikörper können durch die direkte Immunisierung eines Wirbeltiers (z.B. Kaninchen, Ziege, Schaf) erzeugt werden. Die aus dem Serum der Tiere gewonnenen Antikörper sind polyklonal, d.h. sie spiegeln das gesamte Spektrum der erzeugten Immunantwort wider [Emon van et al., 1998]. Immunoassays sind die am weitesten verbreitete Anwendung der immunochemischen Analytik. Es gibt eine Vielzahl an Varianten, grundsätzlich lassen sie sich in zwei Gruppen, in die kompetitiven und nichtkompetitiven Immunoassays einteilen [Wild, 2005].

1.3.2 Assay Prinzipien

a) Kompetitiver Assay

Ein kompetitiver Assay wird zum Nachweis eines Antigens genutzt, wenn für dieses entweder nur ein einzelner spezifischer Antikörper zur Verfügung steht oder wenn das Antigen nicht über ausreichende Bindungsstellen für die ungehinderte Bindung von zwei Antikörpern verfügt. Diese Assay-Variante eignet sich damit auch zum Nachweis von Haptenen. Das in der Probenlösung in unbekannter Konzentration vorliegende unmarkierte als auch das markierte Antigen konkurrieren um die Bindungsstellen des Antikörpers. Je höher die Konzentration des Antigens in der Probe ist, umso weniger markiertes Antigen wird demzufolge an den Antikörper gebunden. Über die Erkennung und gegebenenfalls eine quantitative Bestimmung der Markierung ist damit der Nachweis des Antigens und die Messung seiner Konzentration möglich [Edwards, 1996; Davies, 2005].

b) Nicht-kompetitiver Assay

Für den Nachweis eines Antigens mittels eines auch als Sandwich-Assay bezeichneten nicht-kompetitiven Assays werden zwei verschiedene Antikörper benötigt, die das Antigen erkennen und sich dabei nicht in ihrer Bindung an das Antigen gegenseitig behindern. Von Vorteil beim Vergleich mit dem kompetitiven Format ist insbesondere die bei den meisten Anwendungen höhere Sensitivität [Davies, 2005].

1.3.3 Detektionstechniken

Zum Nachweis und zur quantitativen Bestimmung ist in Immunoassays der Einsatz von markierten Reagenzien notwendig. Je nach Assayformat, Anwendung und gewünschter Sensitivität sind dabei verschiedene Markierungen möglich. Weit verbreitet ist die Markierung mittels Enzymen, die eine chemische Reaktion katalysieren, bei der entweder durch ein Substrat eine bestimmte Farbe entsteht (chromogenes Substrat) oder aber über Chemilumineszenz Licht abgegeben wird. Ein weiteres optisches Verfahren ist die Markierung mit Fluoreszenz-Farbstoffen. Sowohl die Farbintensität bei chromogenen Substraten als auch die Lichtintensität bei lumineszenten und fluoreszenten Substraten ist in entsprechenden Geräten messbar. Auf Enzymmarkierungen basierende Assays werden als Enzyme-Linked Immunosorbent-Assays (ELISA) bezeichnet. In Radioimmunoassays (RIA) werden schwachradioaktive Substanzen zur Markierung verwendet, der Nachweis und die Quantifizierung erfolgt dann durch Messung der Radioaktivität [Strobach, 1994].

1.3.4 Radioimmunoassay (RIA)

Seit der Entwicklung des ersten Radioimmunoassays für Insulin [Berson und Yalow, 1968] nahm die Anwendung radiometrischer Verfahren für analytische Untersuchungen und Bestimmungen biologisch wichtiger Substanzen wie Enzyme, Hormone, Steroide und Vitamine in Blut, Urin, Speichel oder anderen Körperflüssigkeiten einen starken Aufschwung. Die Vorteile der Verwendung von radioaktiven Isotopen als Marker (Tracer) sind die geringe Größe (dadurch keine oder nur

unwesentliche Beeinflussung der Immunreaktion), die Nachweisbarkeit der Isotope bereits in geringsten Mengen und die zu vernachlässigende Störanfälligkeit durch biologische Substanzen in der Testflüssigkeit. Den radiometrischen Verfahren ist die auf einer spezifischen Bindungsreaktion beruhende Analytik gemeinsam, bei der mindestens ein Reaktionspartner radioaktiv markiert und durch die Messung der Radioaktivität des Reaktionsprodukts der Rückschluss auf die Menge oder Konzentration der zu bestimmenden Substanz möglich ist. Bei der direkten Methode reagiert die zu bestimmende Substanz A mit einem markierten Bindungsprotein P* zum Komplex A-P*. Zu dieser Radioreagenzmethode gehört der Immunradiometrische Assay (IRMA), bei dem ein markierter Antikörper eingesetzt wird. Indirekte Methoden nutzen die Konkurrenz zwischen markiertem A* (Tracer) und unmarkierter Substanz A (Probe) um die begrenzten Bindungskapazitäten des Bindungsproteins P. Zu dieser Gruppe der kompetitiven Radioassays zählen kompetitive Proteinbindungsassays (CPBA), Radioimmunoassays (RIA) und Radiorezeptorassays (RRA) [Friemel, 1991]. Die am weitesten verbreitete Methode der nuklearmedizinischen in-vitro-Verfahren stellt der Radioimmunoassay (RIA) dar. Grundlage bildet die quantitative Erfassung der Antigen-Antikörper-Reaktion zwischen Antigen aus der Probe und Antikörper unter Verwendung des markierten Liganden (radioaktiv markiertes Antigen) [Kunkel, 1988]. Bei dieser indirekten immunologischen Reaktion konkurrieren das Antigen aus der Probe mit dem in konstanter Konzentration vorhandenen radioaktiv markierten Liganden um die ebenfalls in konstanter Anzahl vorhandenen Bindungsstellen des Antikörpers. Je höher die Antigen-Konzentration in der Probe ist, umso geringer ist die zu messende Radioaktivität. Die Bestimmung der absoluten Antigenmenge erfolgt durch Vergleich mit einer Standardkurve. Als Tracer im Radioimmunoassay sind Gammastrahlen-emittierende Isotope besonders geeignet. Allerdings sind diese Verbindungen nur kurzzeitig lagerfähig. Betastrahlen-emittierende Isotope sind wesentlich stabiler und benötigen zur Messung ein Flüssigkeitsszintillationssystem. Dies erfordert eine zeitaufwändige Probenvorbereitung und zusätzlich längere Messzeit wegen der geringeren spezifischen Aktivität (Radioaktivität pro Gewichtseinheit). Radioaktives Jod ist für die Herstellung von Tracer besonders geeignet [Bolton und Hunter, 1973]. Dabei sind [¹²⁵I] und [¹³¹I] die am besten geeigneten Isotope. Der in dieser Arbeit entwickelte Test enthält Material zur quantitativen Bestimmung von Melatonin in Mausproben. Die Durchführung des RIA-Tests folgt den Grundprinzipien des Radioimmunoassays. Radioaktiv markiertes Antigen und nicht markiertes Antigen binden kompetitiv an eine definierte Anzahl von Antikörperbindungsstellen. Anschließend werden die Antigen-Antikörper-Komplexe mit einem zweiten Antikörper in Anwesenheit von Polyethylenglykol (PEG) gefällt. Das Präzipitat wird nach Zentrifugation und Dekantieren des Überstands in einem Gamma-Counter gemessen. Die Menge an radioaktiv gebundenem Antigen ist indirekt proportional zur Antigenkonzentration der Probe. Die Konzentrationen in den Proben werden mit Hilfe einer Standardkurve ermittelt.

1.3.5 Nachteile eines RIA

Je mehr radioaktives Jod während der Markierungsreaktion in eine Substanz eingebaut wird, desto höher ist die spezifische Aktivität, wodurch beim RIA die Messdauer verkürzt werden kann. Allerdings sind solche hochmarkierten Verbindungen weniger stabil und können zur Zerstörung der molekularen Struktur (Radiolyse) und damit zum Verlust des Bindungsvermögens am spezifischen Antikörper führen [Friemel, 1991]. Aufgrund der sich aus dem Aktivitätsverlust und der Radiolyse und somit der nur geringen Haltbarkeit ergebenden Nachteile – zusätzlich zu den Gefahren im Umgang mit radioaktivem Material und der Problematik der Entsorgung – wurde intensiv nach anderen Markierungssystemen gesucht.

1.3.6 Mathematische Grundlagen und Kurvenanpassung bei einem RIA

Bei den Methoden des Gamma Counters LB 2111 zur Kurvenanpassung wird entweder ein LCF-Verfahren oder eine Spline- Funktion verwendet [Rodbard und Lewald, 1970]. Beim LCF-Verfahren wird eine lineare, eine quadratische und eine kubische Regression durchgeführt und anhand einer Prüfgröße die beste Kurve automatisch ausgewählt [Yeh und Kwan, 1978]. Beim Spline-Verfahren wird die beste Funktion automatisch derart bestimmt, dass zunächst mit einem sehr kleinen Glättungsfaktor gerechnet wird und der Glättungsfaktor so lange verdoppelt wird, bis die Kurve im Lin-Log-Bereich (Sigmoid als Kurvenform) keinen Extremwert und nur einen Wendepunkt aufweist.

1.4 Störungen bei Immunoassays

Störungen bei Immunoassays sind vielfältiger Natur. Sehr häufig treten Kreuzreaktivitäten, unspezifische Bindungen und Matrixeffekte auf. Außerdem können so genannte Störfaktoren in mehr oder weniger großen Konzentrationen in Realproben vorkommen und direkt mit dem Analyten oder mit dem Fänger- bzw. Detektionsantikörper interagieren [Butler, 1995; Selby, 1999].

1.4.1 Unspezifische Bindungen

Unter unspezifischer Bindung versteht man die Bindung an Substanzen, die entweder in weitaus höheren Konzentrationen als der Zielanalyt vorkommen (z.B. unspezifische Bindungen an Albumine oder Immunglobuline) oder an Oberflächen (z.B. ELISA-Wells). Besonders betroffen sind Assays mit schlechter Blockierung oder in problematischen Matrices, die z.B. starke Albuminanteile oder hohe Konzentrationen endogener Störfaktoren enthalten.

1.4.2 Kreuzreaktivitäten

Kreuzreaktivitäten sehen ähnlich aus wie unspezifische Bindungen. Bei Kreuzreaktivitäten erhält man Bindungen an unerwünschten Stellen wie an falsche Substanzen. Im Gegensatz zur unspezifischen Bindung spricht man von Kreuzreaktivitäten, wenn der Kreuzreaktant bekannt ist und dessen kreuzreagierende Eigenschaft. Mit Kreuzreaktivität ist also die Fähigkeit des Antikörpers gemeint, auch an andere Strukturen als die des eigentlichen Zielanalyten zu binden. Oftmals handelt es sich um Strukturen die eine hohe Ähnlichkeit zum Analyten haben, z.B. Metabolite.

1.4.3 Matrixeffekte

Der Begriff Matrixeffekt ist sehr schwierig zu beschreiben und deshalb am wenigsten definiert. Matrixeffekte sind die Summe der Störeffekte aller Komponenten, die in einer Probe vorkommen und die Messung des Zielanalyten beeinflussen. Wenn die genaue molekulare Ursache einer Störung nicht bekannt ist, aber mit der Zusammensetzung der zu bestimmenden Probe in Verbindung gebracht werden kann, spricht man im Allgemeinen von einem Matrixeffekt. Für solche Effekte können endogene Störungen, pH-Wert oder Salzkonzentrationen verantwortlich sein. Die Übergänge zu den einzelnen anderen Störeffekten können fließend sein.

1.5 Extraktionsmethoden

Um mögliche Störungen bei Messungen mit Immunoassays entgegenzuwirken, werden u.a. folgende Extraktionsmethoden angewendet:

1.5.1 Flüssig-Flüssig-Extraktion

Unter Flüssig-Flüssig-Extraktion wird das Abtrennen gelöster Extraktionsstoffe aus flüssigen Extraktionsgütern (Abgeber) durch flüssige Extraktionsmittel (Aufnehmer) verstanden. Das Verfahren beruht auf der unterschiedlichen Löslichkeit des Extraktionsstoffes in zwei flüssigen Phasen. Hierbei kann es sich sowohl um einen Feststoff als auch um einen flüssigen Stoff handeln. Voraussetzung muss sein, dass sich dieser Stoff in dem Lösungsmittel besser löst als in der Flüssigkeit, in der er ursprünglich gelöst ist [Mersmann, 1980; Grassmann, 1997]. Für die Flüssig-Flüssig-Extraktion lassen sich nur solche Stoffgemische verwenden, die eine Mischungslücke aufweisen, wobei eine teilweise Löslichkeit des einen Lösungsmittels in dem anderen nicht störend wirkt. Nach erfolgter Extraktion wird die verarmte Trägerflüssigkeit als Raffinat, das beladene Extraktionsmittel als Extrakt bezeichnet [Alders, 1955; Treybeal, 1963; Müller, 1971; Patat-Kirchner, 1986].

1.5.2 Festphasenextraktion

Eine verbreitete Probenvorbereitungsmethode in Bezug auf eine mögliche Anreicherung, „Aufkonzentration“ oder Isolation eines Analyten ist die Festphasenextraktion (engl. *solid phase extraction*, kurz SPE). Es handelt sich dabei um einen physikalischen Extraktionsprozess, der zwischen einer flüssigen und einer festen Phase (Sorbens) stattfindet. Der Begriff umfasst eine ganze Reihe von Sorbens-/Isolat-Wechselwirkungen: polare und unpolare Wechselwirkungen, ionische Wechselwirkungen, Wechselwirkungen über kovalente Bindungen sowie multiple Wechselwirkungen [Thurman, 1998]. Die zu analysierende Komponente (Isolat) ist in einem Lösungsmittel gelöst. Mit Hilfe der SPE ist es möglich, die zu bestimmende Komponente aus sehr verdünnten Lösungen für die eigentliche Analyse anzureichern. Wird das Lösungsmittel beziehungsweise die Probenlösung durch das Sorbens geleitet, reichert sich das Isolat auf dem Sorbensbett an, wobei das Lösungsmittel das Sorbens ungehindert passiert. Die Auswahl des Sorbens hat großen Einfluss auf die Extraktion. Die gebräuchlichste SPE-Methode besteht darin, das Sorbens in eine Art Säule zu packen und die Probenlösung durch das Sorbens zu leiten. Durch ein geeignetes Lösungsmittel wird das Isolat vom

Sorbens heruntergelöst (Elution). Anschließend kann dieses Eluat weiter verarbeitet oder analysiert werden [Simpson, 2000]. Eine typische SPE besteht aus vier Grundschritten. Als erstes wird die SPE-Kartusche mit einem nichtpolaren oder schwachpolaren Lösungsmittel durchspült. Danach wird mit Reinstwasser oder einem Puffer das Sorbens gewaschen. Es folgt die Zugabe der Probe auf die Säule. Während die Probe durch die stationäre Phase wandert, interagiert der Analyt in der Probe mit dem Sorbens und wird zurückgehalten, wobei die Matrix, Salze und Verunreinigungen durch die Säule laufen. Zum Entfernen weiterer Verunreinigungen wird die Säule mit einem Puffer oder Wasser/Lösungsmittelgemisch gewaschen. Danach erfolgt die Elution des Analyten mit einem nichtpolaren Lösungsmittel. Die Reversed Phase SPE basiert auf Polarität des Analyten. Die stationäre Phase bei einer Reversed Phase SPE Kartusche ist derivatisiert mit verschiedenen Ketten, z.B. Octadecyl, Octyl, Ethyl, Phenyl, welche die Komponenten mit mittlerer oder niedriger Polarität durch hydrophobe Wechselwirkung zurückhalten. Der Analyt kann durch Waschen der Säule mit nichtpolarem Lösungsmittel, welches die Interaktion zwischen Analyten und stationärer Phase aufhebt, eluiert werden [Fritz, 1999].

1.6 Validierung

1.6.1 Allgemeine Grundlagen der Validierung

Die Qualitätsanforderungen in der biochemischen Analytik sind in den letzten Jahren stark gestiegen, da vom Gesetzgeber schon seit langem sehr strenge Normen und Richtlinien (GMP, Good Manufacturing Practice; GLP, Good Laboratory Practice; Guidance for Industry) vorgegeben sind. Unter Validierung versteht man ganz allgemein die Sicherstellung, dass ein Analysenverfahren reproduzierbare und verlässliche Resultate liefert, die für den beabsichtigten Einsatzbereich genau genug sind [Guidance for Industry, 2001]. Die Vorgehensweise bei der Validierung ist von verschiedenen Faktoren abhängig und nicht allgemeingültig definiert. Der Umfang der Validierung ist dabei eng mit dem Zweck bzw. Anspruch an das Verfahren verknüpft [DIN 32645; DIN ISO 8402; DIN ISO 5725-1]. Durch die Validierung von analytischen Verfahren wird ein Qualitätsstandard erreicht, der die Vergleichbarkeit von Analysendaten verbessert und das besonders beim Einsatz neuer Verfahren bzw. bei der Übernahme von Verfahren von entscheidender Bedeutung für die Zuverlässigkeit der Ergebnisse ist.

1.6.2 Grundprinzip und Grundelemente der Validierung

Jede Verfahrensvalidierung besteht grundsätzlich aus 3 Schritten:

1. Festlegung der zu erfüllenden Vorgaben: Im einfachsten Fall sind diese durch den Auftraggeber oder eine behördliche oder sonstige Vorgabe bereits festgelegt.
2. Ermittlung der Validierungsparameter: Es werden 3 Fälle unterschieden, nämlich
 - a) genormtes Prüfverfahren, wird exakt so eingesetzt, wie dies in der Norm beschrieben ist.
 - b) modifiziertes Normverfahren, es werden gegenüber der in der Norm beschriebenen Arbeitsweise Abänderungen vorgenommen

- c) in-house-Verfahren, es handelt sich um ein Verfahren, das im Labor ausgearbeitet wurde und das in Normen- oder offiziellen Methodensammlungen nicht zu finden ist.
3. Bewertung der Validierungsergebnisse durch Vergleich der ermittelten Verfahrenskenndaten mit den Vorgaben und Entscheidung über Eignung des Verfahrens für den vorgesehenen Einsatzzweck.

Für das in dieser Arbeit beschriebene Verfahren zur Detektion von Melatonin in Mausproben existieren keine Vorgaben durch einen Auftraggeber oder einer Behörde. Es handelt sich um ein in-house-Verfahren und ist aus diesem Grund im Labor ausgearbeitet worden.

1.7 Zielstellung

Zurzeit werden Melatoninkonzentrationen in den verschiedensten biologischen Proben vornehmlich mit chromatografischen, massenspektrometrischen oder immunologischen Methoden nachgewiesen. Gerade die Bestimmung von Melatonin in Mausproben gestaltete sich als sehr schwierig, da bei einigen Verfahren eine aufwendige Durchführung zur Isolierung des Analyten aus der Matrix notwendig, bei anderen ein hohes Probenvolumen Voraussetzung ist oder sie sich durch eine geringe Sensitivität auszeichnen. Ziel dieser Arbeit ist, einen sensitiven und spezifischen Radioimmunoassay für die direkte quantitative Bestimmung von Gesamt-Melatonin bei verschiedenen Mauslinien zu entwickeln und zu validieren. Im Folgenden sind die Methoden mit ihren Einzelzielen der Arbeit dargestellt:

Vorversuche

- Auswahl und Herstellung einer geeigneten Mausausgleichsmatrix um die Beeinflussung von Messergebnissen aufgrund unterschiedlicher Zusammensetzung zwischen Standards und Probenmatrix zu verringern
- Generierung eines spezifischen Antikörpers gegen Melatonin, sowie Einstellung eines geeigneten Antikörpertiters
- Bestimmung des Gesamt-Melatonins
- Markierung und Herstellung eines [¹²⁵I]-Melatonin-Tracers

Validierung

- Validierung des Radioimmunoassays nach festgelegten Validierungsparametern und Überprüfung der Einhaltung der vorgegebenen Akzeptanzkriterien

Anwendungen

- Erstellung eines 24-h Profils von Melatonin bei Kontroll-Mäusen mit dem „Direkt-RIA“
- Vergleich des „Direkt-RIA“ und einem RIA mit etablierten Extraktionsmethoden als Probenvorbereitung
- Vergleich des entwickelten „Direkt-RIA“ mit einem kommerziell erhältlichen direkt RIA
- Anwendung des validierten „Direkt-RIA“ für die Bestimmung von Melatonin bei unterschiedlichen Mauslinien

2. Materialien und Methoden

2.1 Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 2: Verwendete Chemikalien und Reagenzien. Alle Reagenzien sind vom analytischen Reinheitsgrad

Chemikalien	Summenformel	CAS-Nr.	Bezugsquelle
5-Methoxytryptamin (98 %)	$C_{11}H_{14}N_2O$	608-07-1	Sigma Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Germany)
5-Sulfosalicylsäure Dihydrat	$C_7H_6O_6S \cdot 2H_2O$	5965-83-3	Sigma Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Germany)
Ascorbinsäure	$C_6H_8O_6$	50-81-7	Sigma Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Germany)
Bilirubin	$C_{33}H_{36}N_4O_6$	635-65-4	Sigma Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Germany)
[¹²⁵ I]-Bolton-Hunter-Reagent (monoiodinated)	/	/	Perkin Elmer Life Sciences (Boston, USA)
Chloroform	$CHCl_3$	67-66-3	Merck (Darmstadt, Germany)
Dichlormethan	CH_2Cl_2	75-09-2	Sigma Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Germany)
Diethylether	$C_4H_{10}O$	60-29-7	Sigma Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Germany)
Di-Natriumphosphat Dihydrat	$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	/	Merck (Darmstadt, Germany)
Kaliumchlorid	KCl	7447-40-7	Merck (Darmstadt, Germany)
Kaliumdihydrogenphosphat	K_2HPO_4	7758-11-4	Sigma Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Germany)
Kaliumhydroxid (Plätzchen)	KOH	1310-58-3	Merck (Darmstadt, Germany)
Melatonin	$C_{13}H_{16}N_2O_2$	73-31-4	Sigma Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Germany)
Methanol (wasserfrei, 99,8 %)	CH_3OH	67-56-1	Sigma Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Germany)
Natriumazid	NaN_3	26628-22-8	Sigma Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Germany)
Natriumchlorid	NaCl	7647-14-5	Merck (Darmstadt, Germany)
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat	$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$	13472-35-0	Merck (Darmstadt, Germany)
Norit	/	7440-44-0	Sigma Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Germany)
PEG 6000	$HO(C_2H_4O)_nH$	25322-68-3	Merck (Darmstadt, Germany)
Phenolrot	$C_{19}H_{13}O_5S$	143-74-8	Sigma Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Germany)
Pro Clin 300	$C_8H_9ClN_2O_2S_2$	96118-96-6	Supelco (USA)
Pyridin (wasserfrei 99,8 %)	C_5H_5N	110-86-1	Sigma Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Germany)
Salzsäure (32 %)	$HCl_{(aq)}$	7647-01-0	Merck (Darmstadt, Germany)
Tert. Butylmethylether	$C_5H_{12}O$	1634-04-4	Sigma Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Germany)
Tricin	$C_6H_{13}NO_5$	5704-04-1	Sigma Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Germany)
Trichloressigsäure	$C_2HCl_3O_2$	76-03-9	Merck (Darmstadt, Germany)
Trishydroxymethyl-aminomethan (TRIS)	$C_4H_{11}NO_3$	77-86-1	Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Germany)
Triton X-100	$C_8H_{17}C_6H_4(OCH_2CH)_nOH$		Merck (Darmstadt, Germany)
Ziege-Anti-Kaninchen Antiserum	/	/	Europa Bioproducts IgG (Fc) (Cambridge, UK)

2.2 Verwendete Geräte

Tabelle 3: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Analysenwaage	Sartorius (Göttingen, Germany)
Diverse Pipetten	Eppendorf (Hamburg, Germany)
DRI-Block DB 3D Heizblock	Techne (Cambridge, England)
Gefriertrocknungsanlage	Zirbus Technology GmbH (Bad Grund, Germany)
Megafuge 10	Heraeus (Osterode, Germany)
Millipore Reinstwasseranlage RIOS 30	Millipore GmbH (Schwalbach, Germany)
Multi-Kristall-Gammazähler LB2111	Berthold Technologies GmbH & Co KG (Wildbach, Germany)
Orbitalschüttler Rotamax 120	Heidolph (Kelheim, Germany)
Rollenmischer	Ingenierbüro CAT (Staufen, Germany)
Sample Concentrator FSC 400D	Techne (Cambridge, England)
Vakuumpumpe	Heidolph (Kelheim, Germany)
Visiprep SPE Vacuum Manifold	SUPELCO (Sigma-Aldrich)
Vortex Genie 2	Scientific Industries (Bohemia, USA)
Vortex Genius 3	IKA (Staufen, Germany)
Zentrifuge 5403	Eppendorf (Hamburg, Germany)
Zentrifuge Rotanta 460R	Hettich (Tuttlingen, Germany)

2.3 Verwendete Verbrauchsmaterialien

Tabelle 4: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Borosilikatglasröhrchen	Sarstedt (Nümbrecht, Germany)
Doppelkanüle für Blutabnahme, Kanüle 20Gx11/2	Sarstedt (Nümbrecht, Germany)
Glasflaschen (10 ml)	Schott Glaskontor (Germany)
Mikroschraubgefäße (2 ml)	Sarstedt (Nümbrecht, Germany)
Polystyrol-RIA-Röhrchen (4 ml, Spitzboden)	Sarstedt (Nümbrecht, Germany)
Probensammelgefäße (50 ml)	Sarstedt (Nümbrecht, Germany)
S-Monovette 1,2 ml K3E; EDTA, 1,2 ml	Sarstedt (Nümbrecht, Germany)
S-Monovette 1,2 ml Z	Sarstedt (Nümbrecht, Germany)
SPE C ₁₈ Octadecyl (100 mg, 1ml)	J.T. Baker (Deventer, The Netherlands)
Spritzenfilter (0,2 µm) Typ FP30/0.2 CA, D=30 mm	Whatman GmbH (Dassel, Germany)
Zap Cap-S, 0,45 µm Cellulose Acetat Sterilfilter	Whatman GmbH (Dassel, Germany)

2.4 Mausproben für die Ausgleichsmatrix

Tabelle 5: Mausproben für die Ausgleichsmatrix

Probe	Spezifikation	Charge	Bezugsquelle
Mausserum 1,	Totalprotein (Biuret): 6,2 g/dl Hämoglobin (Oxy-Hgl): 33 mg/dl pH (potentiometrische Methode): 7,4	8070412-01	Kraeber (Hamburg, Germany)
Mausplasma 1 (EDTA), unsteril	Totalprotein (Biuret): 6,1 g/dl Hämoglobin (Oxy-Hgl): 28 mg/dl pH (potentiometrische Methode): 7,4	MP240511	
Mausserum 2, Mausplasma 2 (EDTA), unsteril	Keine weiteren Angaben	MSEBREC.47676 MSEBREC.48153	Bioreclamation Inc. (Hicksville, New York, USA)

2.5 EDTA-Plasma- und Serum-Konrollproben

Kontrollproben mit endogenem Melatonin wurden aus den unter 2.4 genannten Mausplasma und Mausserum hergestellt. Dazu wurde eine zweite Charge (Mausserum 8070412-02 und MSEBREC.60482) über Spritzenfilter sterilfiltriert, zu 1,25 mL aliquotiert, bei -80 °C eingefroren und

lyophilisiert. Die Lagerung der Proben erfolgte bei 4 bis 8 °C. Diese Proben wurden für Aufstockungsversuche verwendet.

2.6 Haltung der Kontroll-Mäuse

Männliche Mäuse (8 bis 10 Wochen alt, Körpergewicht zwischen 20 und 25 g) wurden berücksichtigt. Insgesamt wurden 30 Mäuse in 2 Gruppen von 15 Tieren zugeteilt, Gruppe 1 sind die „Tagtiere“ und Gruppe 2 die „Nachttiere“. Die Mäuse wurden unter einem L:D = 12:12, Beginn der Lichtphase um 8.00 Uhr 10 Tage, gehalten. Den Tieren stand handelsübliches Futter und Leitungswasser *ad libitum* zur Verfügung. Die Blutabnahmen bei den Mäusen erfolgten in Übereinstimmung mit den Richtlinien für Tierversuche nach Maßgabe der Europäischen Gemeinschaft (Direktive 86/609/EEC). Um Stress bei den Tieren zu minimieren und einen Effekt auf den Analyten zu vermeiden wurden die Mäuse mit Ether betäubt und anschließend durch zervikale Dislokation getötet [Hoff, 2000]. Die Blutabnahme, sowohl Serum, als auch EDTA-Plasma, erfolgte alle 2 h über einen Zeitraum von 24 h durch Herzventrikel Punktion. Die Blutabnahme bei den „Nacht-Tieren“ fand bei Rotlicht statt. Danach wurde das Blut 10 min bei 1500 g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und bis zur weiteren Bearbeitung bei 4 bis 8 °C gelagert.

2.7 Puffer und Lösungen

Tris-Puffer (20-fach Konzentrat)

121,1 g Tris, 4 g Natriumazid und 20 g Ascorbinsäure pro 1 Liter. pH-Wert mit 32 % HCl bei 7,5 einstellen.

PBS-Puffer (10-fach Konzentrat)

4,5 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 12,6 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 80,7 g NaCl und 2,0 g KCl pro 1 Liter. pH-Wert mit NaOH bei 7,2 einstellen.

Noritlösung

50g Norit in 2 Liter Reinstwasser suspendieren und durchmischen. Nach 10 min ist Norit sedimentiert, Überstand absaugen und Bodensatz in 500 mL Reinstwasser aufnehmen.

Tritonlösung (25 %)

125 g Tritin X-100 in 375 mL Reinstwasser aufnehmen.

Patentblau

2 mL PBS 10-fach Konzentrat, 120 mg Patentblau V, 20 μL Pro Clin 300 in 18 mL Reinstwasser.

RIA Antikörperverdünnungspuffer

100 mL PBS 10-fach Konzentrat, 200 mg γ -Globulin, 200 mg Natriumazid in 900 mL Reinstwasser.

Tracerpuffer

250 mL Tris-Puffer (20-fach Konzentrat), 20 mL 0,5 % Phenolrot-Lösung in 4750 mL Reinstwasser.

Herstellung von Probenvorbereitungsgefäßen für die Proteinfällung

Fällungsreagenz 1: Trichloressigsäure (TCA): 4 g TCA in 10 mL Aceton lösen (40 %)

Fällungsreagenz 2: 5-Sulfosalicylsäure Dihydrat: 2 g 5-Sulfosalicylsäure Dihydrat in 10 mL Aceton lösen (20 %). Davon jeweils 50 µL in ein Mikroschraubgefäß pipettieren und nicht verschließen. Das Lösungsmittel unter einem Abzug vollständig verdampfen lassen.

2.8 Testkomponenten für den Melatonin „Direkt-RIA“

Standards und Kontrollen

Die Melatoninstandards wurden aus einer Methanol-Stammlösung mit einer Konzentration von 1 mg/mL hergestellt. Stammlösungen zu 100 µL Aliquots bei -20 °C einfrieren. Über weitere Verdünnungsschritte mit Tris-Puffer wurden die Standards und Kontrollen eingestellt. Die Endkonzentrationen sind: A = 0 pg/mL; B = 30 pg/mL; C = 100 pg/mL; D = 300 pg/mL; E = 1000 pg/mL; F = 3000 pg/mL; G = 10000 pg/mL; K1 = 200 pg/mL; K2 = 600 pg/mL.

Melatonin Assaypuffer

363 g Tris in 1 L Reinstwasser lösen und den pH-Wert mit 32 % HCl bei 7,7 einstellen. Lagerung bei 4 bis 8 °C.

Melatonin Enzym

3 g Pepsin und 16,2 g Natriumchlorid in 150 mL Reinstwasser lösen. Danach gefriertrocknen.

Melatonin Enzympuffer

Als Enzympuffer wurde eine 1 M Hydrochloridlösung verwendet.

Melatonin Präzipitierendes Antiserum

170,1 g KH_2PO_4 und 225 g NaCl in 20 L Reinstwasser lösen. pH-Wert mit KOH bei 7,4 einstellen. 22,5 g Natriumazid hinzufügen und mit Reinstwasser auffüllen. 1250 g PEG 6000 und 50 mL 25 % Tritonlösung hinzufügen. 1 h gut durchmischen. 1 L Ziege-Anti-Kaninchen Antiserum hinzugeben und das Präzipitationsreagenz über einen Grobfilter filtrieren.

2.9 Pipettierschema

Tabelle 6: Pipettierschema für die Bestimmung von Melatonin im Mausserum und Mausplasma

1.	Jeweils 20 µL Standard A in die Röhren für die NSB pipettieren.
2.	Jeweils 20 µL Standards und Kontrollen in die entsprechenden Röhren pipettieren.
3.	50 µL Ausgleichsmatrix in die Röhren mit NSB, Standards und Kontrollen pipettieren.
4.	Jeweils 50 µL Probe in die entsprechenden Röhren pipettieren.
5.	In die Röhren mit den Proben jeweils 20 µL Standard A dazu pipettieren.
6.	25 µL Enzymlösung in alle Röhren (außer Totalaktivität T) pipettieren.
7.	1 h bei RT (20 bis 25 °C) inkubieren.
8.	50 µL Assaypuffer in alle Röhren (außer Totalaktivität T) pipettieren und danach mischen.

9.	25 µL Melatonin-Antikörper in alle Röhren (außer Totalaktivität T und NSB) pipettieren und mischen.
10.	1 h bei RT (20 bis 25 °C) inkubieren.
11.	50 µL ¹²⁵ I-Melatonin in alle Röhren pipettieren und gründlich mischen.
12.	Röhren abdecken und 20 bis 24 h bei RT (20 bis 25 °C) inkubieren.
13.	Das vorgekühlte (2 bis 8 °C) Präzipitationsreagenz gründlich aufschütteln und jeweils 1 mL in alle Röhren (außer T) pipettieren. Röhren kurz mischen.
10.	20 min bei 2 bis 8 °C inkubieren.
11.	20 min bei 3000 x g zentrifugieren (möglichst mit Kühlung).
12.	Überstand absaugen <i>oder</i> vorsichtig dekantieren (<i>außer T</i>). Röhren ausklopfen und für 2 min umgedreht stehen lassen.
13.	Röhren 1 min in einem Gamma-Counter messen.

2.10 Vorversuche

Vor der Validierung des RIA für die Bestimmung von Melatonin im Mausserum und Mausplasma wurden Vorversuche durchgeführt. Als Grundlage für die Entwicklung eines RIA zur quantitativen Bestimmung von Melatonin in Mausproben diente ein kommerziell erhältliches Testkit von der Firma Labor Diagnostika Nord, Nordhorn mit der Referenznummer BA 3300 RIA zur quantitativen Bestimmung von Melatonin in humanen Serumproben [Manz et al., 1989] bzw. zur Bestimmung von Melatonin in Rattenproben BA 3500. Anhand dieses Testkits wurden einige Modifizierungen durchgeführt:

- Herstellung einer geeigneten Mausausgleichsmatrix
- Einstellung des optimalen Antikörpertiters
- Bestimmung des Gesamt-Melatonins
- Herstellung und Überprüfung der Reproduzierbarkeit des Melatonin-Tracers

Die Vorversuche sollen zeigen, welche Mausausgleichsmatrix die richtige für den Assay und welcher Titer für den Antikörper der optimale ist. Außerdem soll geklärt werden, ob das Gesamt-Melatonin in der Probe bestimmt wird und die Markierung mit dem Bolton-Hunter-Reagenz einen reproduzierbaren Melatonin-Tracer liefert.

2.10.1 Auswahl eines Mausserums bzw. Mausplasmas für die Herstellung einer Mausausgleichsmatrix

Für die Herstellung einer Melatonin-freien Mausausgleichsmatrix standen Mausserum und Mausplasma von zwei Anbietern (Mausserum 1 und 2 bzw. Mausplasma 1 und 2) zur Verfügung. Zum Entfernen von Melatonin [Carter, 1978] wurden diese Proben mit einer Noritlösung versetzt (Verhältnis Noritlösung:Probe ist 1:10) [Skubitz et al., 1982]. Dazu wurde die Noritlösung in ein Probensammelgefäß gegeben und bei 4000 rpm 5 min zentrifugiert. Danach wurde der wässrige Überstand entfernt und das Probenmaterial (Mausserum oder Mausplasma) hinzugegeben. Das Probensammelgefäß wurde mit der Suspension ca. 40 h bei 4 bis 8 °C auf einen Rollenmischer

bewegt. Anschließend wurde der Inhalt bei 4000 rpm in 5 Schritten jeweils 120 min zentrifugiert. Nach jedem Schritt wurde das Gefäß gewechselt. Nach dem letzten Schritt wurde der klare Überstand mit Hilfe einer Vakuumpumpe durch ZapCap-S Sterilfilter filtriert. Das Filtrat wurde zu 1,25 ml aliquotiert, bei -80 °C eingefroren und anschließend gefriergetrocknet. Die Lagerung der Ausgleichsmatrix erfolgte bei 4 bis 8 °C. Die Eignung als Ausgleichsmatrix sollte mit der Erstellung einer Standardkurve festgestellt werden. Die Totalcounts [cpm], die Nicht-Spezifische-Bindung [%], die absolute Bindung [%] und die prozentuale Bindung der Standardpunkte von den Mausproben wurden miteinander verglichen. Als Voraussetzungen für die Totalcounts (T) gelten 30000 bis 90000 cpm, für die NSB 0,5 bis 2,5 %, für die absolute Bindung 15 bis 35 % sowie eine eindeutige Abstufung zwischen den Standardpunkten, damit geringe Melatoninkonzentrationsunterschiede detektiert werden können. Zur Überprüfung der vollständigen Adsorption von Melatonin durch Aktivkohle wurden Mausproben einer anderen Charge vor und nach Behandlung mit der vorher hergestellten Ausgleichsmatrix gemessen und die Melatoninkonzentrationen in den Mausproben miteinander verglichen. Dazu wurden von jeder Mausprobe zwei Proben gewonnen. Die eine Menge wurde unbehandelt gelassen, die andere wurde wie oben beschrieben mit Aktivkohle behandelt, um das gesamte Melatonin zu entfernen. Welchen Einfluss die Aktivkohlebehandlung auf andere Blutbestandteile haben könnte wurde durch die Quantifizierung von Gesamtbilirubin (Test von Roche, Messbereich = 0,1 bis 30 mg/dL; analytische Sensitivität = 0,1 mg/dL), Gesamteiweiß (Test von Roche, Messbereich = 0,2 bis 15 g/dL; analytische Sensitivität = 0,2 g/dL) und Triglyceride (Test von Roche, Messbereich = 4 bis 4000 mg/dL; analytische Sensitivität = 4 mg/dL) untersucht. Diese Parameter wurden im Mausserum und Mausplasma sowohl vor als auch nach Aktivkohlebehandlung analysiert und mit verschiedenen Mauslinien verglichen. Für den Nachweis, dass mit der hergestellten Ausgleichsmatrix richtige Werte ermittelt wurden oder ob Hintergrundstörungen einen Einfluss auf die Detektion von Melatonin haben, wurden unbehandelte und behandelte Mausproben mit einer definierten Melatoninkonzentration (A = 0, B = 12, C = 40, D = 120, E = 400, F = 1200 und G = 4000 pg/mL) aufgestockt. Dazu wurden in aufsteigender Reihenfolge 20 µL jeweils vom Standard A bis G in vorbeschriftete Polystyren-Röhrchen pipettiert, danach folgten 50 µL von den Mausserum- bzw. Mausplasmaproben. Es wurde die Wiederfindung von Melatonin in unbehandelten und behandelten Mausproben mit den entsprechenden Ausgleichsreagenzien bestimmt. Als Anforderungen für eine optimale Ausgleichsmatrix gilt eine Wiederfindungsrate von 100 ± 20 % und ein VK von < 20 %.

2.10.2 Gewinnung eines Melatonin spezifischen Antikörpers und Einstellung des optimalen Antikörpertiters

Sollen brauchbare Antikörper gegen Verbindungen hergestellt werden, muss das Molekül zunächst durch ein geeignetes Syntheseverfahren kovalent an ein großes Carriermolekül wie Albumin oder Hämocyanin gebunden werden. Bei der Kopplung lässt man einen Substituenten des Haptens mit einem Substituenten des Carriers reagieren. Bevorzugt werden dabei Carboxy- und Aminogruppen [Goodfriend et al., 1964; Grota et al., 1973]. Als Antigen wurde 12,5 mg 5-Methoxytryptamin über

Carbodiimid an 100 mg BSA konjugiert [Arendt et al., 1975; Manz et al., 1989]. Die Reaktionsgemische wurden 48 h gegen physiologische Kochsalzlösung dialysiert und durch Zentrifugation von unlöslichen Reaktionsprodukten befreit. Das Immunisierungskonjugat hatte ein Verhältnis von 8:1 für Hapten:BSA. Ein mg des Immunogens und die gleiche Menge des kompletten Freund Adjuvans wurden in mehrere Kaninchen subkutan injiziert. Vier Wochen nach der Primärimmunisierung folgte eine Boosterung mit 1 mg Immunogen und 0,5 mL inkompletten Freund Adjuvans subkutan. Anschließend wurden die Boosterungen alle 2 Wochen wiederholt. Der Antikörpertiter wurde nach jeder Boosterung überprüft (Daten nicht angegeben). Nach der sechsten Boosterung entwickelten 5 Kaninchen Melatonin-Antikörper. Das Kaninchen mit dem höchsten Titer wurde entblutet und das Serum nach Abzentrifugieren bei -20 °C eingefroren. Die gebrauchsfertige Verdünnung für den Assay musste optimiert werden. Dazu wurden drei Standardkurven erstellt, wobei der Antikörper mit drei unterschiedlichen Titern, nämlich 1:4000, 1:5000 und 1:6000, im Assay verwendet wurden. Der Antikörper wurde mit dem Antikörperverdünnungspuffer verdünnt. Für die Einstellung des richtigen Titers wurden die Bindung B₀ [%] und die Abstufung der einzelnen Standardpunkte betrachtet. Die Spezifität des Antikörpers wurde im Rahmen der Validierung überprüft.

2.10.3 Bestimmung des Gesamt-Melatonins (freies und gebundenes Melatonin)

In-vitro-Experimente mit [³H]-Melatonin, zugegeben in Human- und Rattenplasma, deuteten an, dass 61 bis 78 % des Melatonins reversibel an Albumine gebunden sei [Cardinali et al., 1972; Di et al., 1989]. Für den Nachweis von Gesamt-Melatonin in Mausproben wurden drei Methoden für die Abspaltung von Melatonin von Serum- bzw. Plasmaproteine als Probenvorbereitungen angewendet, mit dem Verdauungsenzym Pepsin (EC 3.4.23.1), dem Fällungsreagenzien Trichloressigsäure (TCA) und schließlich 5-Sulfosalicylsäure Dihydrat. Für die Bestimmung des Gesamt-Melatonins mit Pepsin als Probenvorbereitung gilt folgende Durchführung: Für die Standardkurve wurden 20 µL von den Standards A bis G und K1 bzw. K2 in Spitzbodenröhrchen pipettiert. Danach folgten 50 µL von der Mausserum- bzw. Mausplasmaausgleichsmatrix und 25 µL vom vorbereiteten Enzym. Die Inkubationszeit beträgt 1 h bei RT. Die Vorgehensweise bei der Proteinfällung mit den beiden Fällungsreagenzien ist identisch. Für jeden Standard und für jede Probe wurde ein Probenvorbereitungsgefäß (siehe 2.7) für die Proteinfällung genommen. Für die Standardkurve wurde jeweils 20 µL von den Standards A bis G und K1 und K2 in die Probenvorbereitungsgefäße gegeben, anschließend folgten 50 µL Mauseausgleichsmatrix. Zur Bestimmung der Wiederfindung wurden aktivkohlebehandelte Mausserum- und Mausplasmaausgleichsmatrixproben mit 80 pg/mL Melatonin angereichert, damit von einer definierten Menge ausgegangen werden konnte. Vor der Anreicherung wurden die Proben gemessen, um festzustellen, ob auch das gesamte Melatonin extrahiert wurde. Anschließend wurden die Proben mit 12, 40, 120, 400, 1200 und 4000 pg/mL aufgestockt, danach die Vorbereitungsgefäße gut gemischt (10 min vortexen) und anschließend 10 min bei 3000 x g zentrifugiert (gekühlt bei 4 °C). Für den RIA wurde der gesamte Überstand vorsichtig in die

vorbereiteten Spitzbodenröhrchen gegeben. Der anschließende RIA ist für die drei Probenvorbereitungsmethoden identisch und setzt sich bei der Zugabe des Assaypuffers fort. Für die Entscheidung, welche Probenvorbereitung die geeignete für die Bestimmung des Gesamt-Melatonin ist, wurden die Standardkurven und die Wiederfindungsraten von Melatonin in unbekanntem Mausproben miteinander verglichen. Zur Überprüfung der gewählten Probenvorbereitung und um festzustellen, ob es einen Unterschied in der Melatoninkonzentration zwischen enzym- und nicht-enzymbehandelten Proben gibt, sollte die Melatoninkonzentration in unbekanntem Mausserum- und Mausplasma (behandelt und unbehandelt) mit und ohne Probenvorbereitung gemessen werden.

2.10.4 Herstellung und Überprüfung der Reproduzierbarkeit des Melatonin-Tracers

Die Markierung erfolgt durch direkte kovalente Bindung von [¹²⁵I] an ein Kohlenstoffatom des Antigens, häufiger aber durch Einführung eines [¹²⁵I]-haltigen Substituenten in das Molekül [Bolton et al., 1973]. 5-Methoxytryptamin wurde mit [¹²⁵I]-Bolton-Hunter-Reagenz iodiert. Zusammengefasst: Für die Synthese wurden 5 µg 5-Methoxytryptamin und 200 µCi [¹²⁵I]-Bolton-Hunter-Reagenz in einem Mikroschraubgefäß mit Pyridin gelöst. Die Reaktion verläuft über Nacht (24 h) bei RT. Das Iod-markierte Melatonin wurde anschließend mit Hilfe der HPLC über C₁₈ Silica-Gel als stationäre Phase gereinigt. Der konzentrierte Tracer wurde bei 4 bis 8 °C aufbewahrt. Um die Reproduzierbarkeit der Markierung zu überprüfen wurden zwei Tracer mit unterschiedlichen Produktionschargen verglichen. Tracer 1 hat die Charge 5908 und Tracer 2 die Charge 6074. Mit beiden Tracern wurde anschließend nach der Markierung und kurz vor Ablauf (nach ca. 105 Tagen) eine Standardkurve erstellt und die Wiederfindung von Melatonin im Mausserum und Mausplasma bestimmt. Der gebrauchsfertige Tracer wurde bei max. 90000 cpm eingestellt. Das bedeutet, dass nach 105 Tagen noch mindestens 28000 cpm (Iodine-125 Decay Chart, Half Life = 60 days) messbar sind.

2.11 Validierung

2.11.1 Typische Standardkurve und Arbeitsbereich

Eine Standardkurve, mit deren Hilfe die Melatoninkonzentration der unbekanntem Proben ermittelt werden kann, wurde nach Auftragen der gemessenen %B/B₀ für die 7 Standards im linearen Maßstab auf der y-Achse gegen die entsprechende Konzentration im logarithmischen Maßstab auf der x-Achse erstellt. Für die Berechnung der Standardkurve wurde das LCF- bzw. Spline-Verfahren verwendet. Die Größen B₀ und NSB sind Bezugswerte, die bei der Darstellung der Standardkurve und bei der späteren Berechnung der Analysenergebnisse in jeden Wert eingehen. Um die Fehler so gering wie möglich zu halten, wurde der Test und die Analyse der unbekanntem Proben in Doppelbestimmung durchgeführt. Die Konzentration des unmarkierten Antigens wurde logarithmisch auf der Abszisse aufgetragen. Aus den gemessenen Größen wird nach

$$\% \text{ Bindung} = \frac{(B - NSB) * 100}{(B_0 - NSB)}$$

mit: B = Standard [cpm]
 B₀ = maximale Bindung [cpm]
 NSB = Nicht Spezifische Bindung [cpm]

die Bindung des markierten Antigens in Prozent der maximalen Bindung berechnet und die Werte linear auf der Ordinate aufgetragen [Strobach, 1994].

Für die Bestimmung der unbekannt Melatoninkonzentrationen in den Mausproben soll ein weiterer Arbeitsbereich von 0, 12, 40, 120, 400, 1200, 4000 pg/mL, entspricht 0; 51,6; 172; 516; 1720; 5160 pmoL/L, gewählt werden, um niedrige Tag- als auch hohe Nachtwerte zu erfassen. Die dabei verwendeten Standardlösungen wurden einzeln durch das Verdünnen ein und derselben Stammlösung hergestellt (siehe auch Punkt 2.1.8).

Folgende Anforderungen soll die Standardkurve erfüllen:

- Einen weiten Arbeitsbereich, der es ermöglicht, sowohl niedrige als auch hohe Melatoninkonzentrationen in Mausproben zu detektieren
- Eine steile sigmoidverlaufende Standardkurve mit eindeutig voneinander unterscheidbaren Standardpunkten, die auch die Messung von kleineren Melatoninkonzentrationsunterschiede ermöglicht
- Die zu erwartenden Melatoninkonzentrationen sollen im linearen Bereich der Standardkurve liegen.

2.11.2 Nachweisgrenze

Es soll die kleinste nachweisbare Menge bestimmt werden. Das ist nichts Anderes als die Entscheidung für die Frage: Analyt vorhanden: ja oder nein. Für die Ermittlung der Nachweisgrenze wurden mit dem „Direkt-RIA“ 40 Blindwertmessungen durchgeführt, d.h. der Nullstandard wurde in N = 40 Einzelbestimmungen detektiert. Dazu wurde in 40 Spitzbodenröhrchen 20 µL Standard A und jeweils 50 µL Mausserum- bzw. Mausplasmaausgleichsmatrix pipettiert und der RIA nach Pipettierschema fortgesetzt. Die Nachweisgrenze wird nach folgender Formel berechnet [Kromidas, 2003]:

$$NWG = \bar{x}_{\text{Blind}} + 3s_{\text{Blind}}$$

mit: \bar{x}_{Blind} = Mittelwert aus 40 Blindwertmessungen
 s_{Blind} = Standardabweichung bei der 40-fachen Messung des Blindwertes

Bei der Bestimmung der Nachweisgrenze soll die Grenze festgelegt werden, ab der eindeutig festgestellt wird, ob der Analyt vorhanden ist oder nicht.

2.11.3 Wiederfindungsrate

Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate wurden Mausplasma- und Mausserumproben mit einer definierten Melatoninkonzentration aufgestockt. Die hinzugefügten Melatoninkonzentrationen waren: 12, 40, 120, 400, 1200 und 4000 pg/mL. Dazu wurden 20 µL der bekannten Kalibriersubstanz

(Standard A bis G) in Spitzbodenröhrchen und anschließend 50 µL Mausserum bzw. Mausplasma hinzupipettiert. Es wurden 7 Messungen in Doppelbestimmung, einschließlich Leerprobe (Mausprobe mit nativ vorhandenem Melatonin plus Standard 0), durchgeführt. Weitere Schritte sind dem RIA Pipettierschema zu entnehmen. Die Wiederfindungsrate der aufgestockten Melatoninkonzentrationen im Mausserum und Mausplasma wurde nach Vergleich des Ist-Werts mit dem Soll-Wert in Prozent angegeben. Davon wurden die mittlere Wiederfindungsrate, die Standardabweichung und der Variationskoeffizient berechnet. Die Wiederfindungsrate wird berechnet nach:

$$W = \frac{\bar{x}}{x_R} * 100 \quad \text{mit: } W = \text{Wiederfindungsrate in \%}$$

$$\bar{x} = \text{gemessener Mittelwert}$$

$$x_R = \text{richtige Wert}$$

Für die Überprüfung eines Matrixeffekts sollten systematische Abweichungen aufgedeckt werden. Dazu wurden die Vertrauensbereiche von a_f und b_f ermittelt [Funk et al., 1992]:

$$VB(a_f) = a_f \pm t_{(P,f)} * s_{af}$$

$$VB(a_f) = a_f \pm t_{(P,f)} * s_{yf} * \sqrt{\frac{1}{N_f} + \frac{\bar{x}_c^2}{Q_{xx}}}$$

$$\text{Mit } s_{yf} = \sqrt{\frac{\sum [x_{if} - (a_f + b_f * x_{ic})]^2}{N_f - 2}}$$

$$s_{bf} = \frac{s_{yf}}{\sqrt{Q_{xx}}}$$

$$s_{af} = s_{yf} * \sqrt{\left(\frac{1}{N_f} + \frac{\bar{x}_c^2}{Q_{xx}}\right)}$$

$$Q_{xx} = \sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{N}$$

mit N_f = Anzahl des Konzentrationsniveaus

Der Vertrauensbereich für b_f ergibt sich zu

$$VB(b_f) = b_f \pm t_{(P,f)} * s_{bf}$$

$$VB(b_f) = b_f \pm \frac{t(P, f) * s_{yf}}{\sqrt{Q_{xx}}} \quad (t = \text{Student-t-Faktor: } P = 95\%; f = N_f - 2)$$

Die Akzeptanzkriterien für die Wiederfindungsrate wurden wie folgt festgelegt:

- Der Gesamtmittelwert der Wiederfindungsrate muss zwischen 80 und 120 % liegen.
- Der Variationskoeffizient über den gesamten Wiederfindungsbereich muss < 20 % sein.
- Es dürfen keine systematischen Abweichungen vorliegen.

2.11.4 Linearität

Linearität ist die Fähigkeit einer Methode innerhalb eines gegebenen Konzentrationsbereichs Ergebnisse zu liefern, die der Konzentration des Analyten direkt proportional sind. Beim Testen dieser Eigenschaft ging es darum, eine Serum- oder Plasmaprobe mit relativ hoher Melatoninkonzentration in definierten Schritten zu verdünnen, um dann bestimmen zu können, ob die gemessenen Werten den Gesetzen der Linearität folgen. Als Ausgangskonzentration zur Bestimmung der Linearität wurde eine

Stocklösung aus 100 µL Standard F = (1200 pg/mL) + 250 µL Mausserum bzw. Mausplasma mit einer sehr niedrigen (≤ 10 pg/mL) nativen Melatoninkonzentration hergestellt. Für die weiteren Verdünnungen wurde ausschließlich Norit-behandeltes Mausserum bzw. Mausplasma verwendet. Die Proben wurden 1:1 verdünnt und die Wiederfindung berechnet. Als Akzeptanzkriterium gilt eine gute Korrelation zwischen den Soll- und Istwerten, ein Bereich über alle Verdünnungen von 80 bis 120 %, sowie ein VK ≤ 20 %.

2.11.5 Präzision

Zur Überprüfung der Streuung von Analyseergebnissen, ermittelt mit dem entwickelten RIA, wurden folgenden Präzisionsarten angewendet:

a) Intra-Assay-Präzision

Die zwischen voneinander unabhängigen ermittelten Ergebnisse wurden mit einem RIA, mit denselben Proben unterschiedlicher Melatoninkonzentrationen, im selben Labor, durch denselben Bearbeiter, aber in drei verschiedenen Serien (am selben Tag kurz hintereinander) bestimmt. Dazu wurden Mausserum- und Mausplasma-Proben mit unterschiedlichen Melatoninkonzentrationen (Leerwert, + 40 pg/mL und + 400 pg/mL) in drei verschiedenen Läufen (Set 1 bis Set 3) gemessen. Von jeder Konzentration wurden pro Set 30 Einzelbestimmungen durchgeführt. Für die Analyseergebnisse wurden als Maß für die Streuung der Mittelwert, die Standardabweichung und der Variationskoeffizient berechnet.

b) Inter-Assay-Präzision

Zu Angaben der Inter-Assay-Präzision wurden folgende Wiederholbedingungen für die Bestimmung von unabhängigen Ermittlungsergebnissen eingehalten: Derselbe RIA, identische Proben, im selben Labor, durch denselben Bearbeiter und mit derselben Geräteausrüstung. Dazu wurden an 10 verschiedenen Tagen jeweils eine Standardkurve für Mausserum und Mausplasma pro Tag erstellt (Set 1 bis 10). Anhand jeder Standardkurve wurden Mausserum- und Mausplasma-Proben mit den drei unterschiedlichen Melatoninkonzentrationen (Leerwert + 40 pg/mL sowie + 400 pg/mL) gemessen (jede Konzentration 10 x). Aus jedem Lauf und aus den ermittelten Melatoninkonzentrationen wurden der Mittelwert, die Standardabweichung und der Variationskoeffizient errechnet. Zur Erstellung des Präzisionsprofils wurden Mausproben mit niedrigen Melatoninkonzentrationen so aufgestockt, dass die endgültigen Konzentrationen in der Nähe der Standardkonzentrationen liegen. Jede Konzentration wurde 10 x analysiert, woraus dann der Variationskoeffizient bestimmt und grafisch dargestellt wurde. Für die Bestimmung der Präzision gelten folgende Akzeptanzkriterien: Die höchste Präzision soll im linearen Standardkonzentrationsbereich liegen mit einem VK von < 10 %. Die höchste „Unpräzision“ soll 20 % nicht überschreiten. Aus den gewonnenen Messwertreihen soll die Frage geklärt werden, ob die Werte normalverteilt sind. Die Werte sind mit einer vorgegebenen Wahrscheinlichkeit ($P = 99$ %) normalverteilt, wenn sich der Quotient aus Spannweite [R] und Standardabweichung [s] innerhalb der von David vorgegebenen Grenzwerte befindet:

$$PG = \frac{\text{GrößterWert} - \text{KleinsterWert}}{S \text{ tan dardabweichung}} = \frac{R}{s}$$

Auffallend stark abweichende Werte sollen auf Ausreißer oder zufällige Abweichungen überprüft werden. Dazu wird der Grubbs-Test angewendet:

$$Q = \frac{|x_1 - \bar{x}|}{s} \quad \text{mit: } x_1 = \text{ausreißerverdächtiger Wert}$$

$$\bar{x} = \text{Mittelwert}$$

$$s = \text{Standardabweichung}$$

Man bildet die Prüfgröße [Q] und vergleicht diese mit dem Tabellenwert. Es gilt der Wert als Ausreißer, wenn die berechnete Größe [Q] größer ist als der entsprechende Tabellenwert bei einem Signifikanzniveau $P = 0,99$. Für die zulässige Obergrenze des VK gilt als Forderung, dass der Vertrauensbereich (die zweifache Messunsicherheit) für den Wert nicht größer sein sollte als der halbe Toleranzbereich aus den vorgegebenen Spezifikationsgrenzen:

$$u = t * \frac{s}{\sqrt{n}} \quad 2 * u = t * \frac{2 * s}{\sqrt{n}} \leq \frac{(OSG - USG)}{2}$$

$$\text{es gilt: } s = \frac{VK * \bar{x}}{100}$$

in die obige Formel s einsetzen und nach VK auflösen und erhält:

$$VK \leq \frac{(OSG - USG) * \sqrt{n} * 100}{4 * t * \bar{x}} \quad \text{mit: } OSG = \text{obere Spezifikationsgrenzen}$$

$$USG = \text{untere Spezifikationsgrenzen}$$

$$u = \text{Messunsicherheit}$$

für $t(95\%; f \rightarrow \infty) = 1,96$ (t-Tabelle).

2.11.6 Probenstabilität

Im Rahmen der Überprüfung der Probenstabilität soll gezeigt werden, ob unterschiedliche Lagerungsbedingungen von Mausproben einen Einfluss auf die Melatoninkonzentrationen in der Matrix haben [Cavallo et al., 1994; Daya et al., 2000]. Hierfür wurden Mausserum und Mausplasmaproben mit drei unterschiedlichen Melatoninkonzentrationen verwendet bzw. hergestellt, nämlich eine native Probe = niedrige Melatoninkonzentration, aufgestockt mit 40 pg/mL = mittlere Melatoninkonzentration und mit 400 pg/mL = hohe Melatoninkonzentration. Die Proben wurden direkt nach Vorbereitung „frisch“ gemessen (Primärmessung), um einen Referenzwert festzulegen. Zur Beurteilung der Probenstabilität wurden die Proben für 24 h und 48 h bei RT bzw. für 24 h und 48 h bei 37 °C gelagert und anschließend gemessen. Außerdem wurden die Proben einem Einfrier- und Auftauzyklus unterzogen, d.h. die Proben wurden für 24 h bei -20 °C eingefroren, dann bei RT aufgetaut und anschließend analysiert. Diese Prozedur wurde insgesamt dreimal mit derselben Probe durchgeführt. In einem Langzeittest wurde von dem Mausserum und der Mausplasmaprobe eine

Menge von 12 Aliquots bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Es wurde dann über ein Jahr jeden Monat die Melatoninkonzentrationen in den Proben analysiert um einen möglichen Analytenverlust festzustellen und eine Angabe über die Dauer der Lagerung bei optimalen Bedingungen vornehmen zu können. Als Akzeptanzkriterien für die Probenstabilität wurde festgelegt, dass die ermittelten Melatoninkonzentrationen dem anfänglichen Wert aus der Primärmessung der maximal zulässigen relativen analytischen „Unpräzision“ entsprechen.

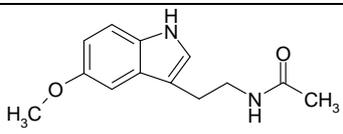
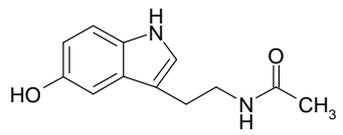
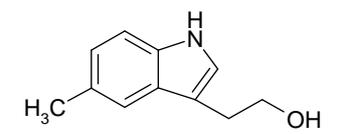
2.11.7 Robustheit

Durch die Robustheit sollte gezeigt werden, dass der RIA Ergebnisse zu liefern vermag, durch die variierende Bedingungen nicht oder unwesentlich beeinträchtigt werden. Nachfolgende Maßnahme sollte Klarheit darüber bringen, dass durch Änderung der Lagerungstemperatur des Testkits bzw. der dazugehörigen Testkitkomponenten das Meßergebnis unbeeinträchtigt bleibt. Dafür wurden 3 Testkits mit Testkitkomponenten aus der laufenden Produktionscharge vorbereitet. Testkit 1 wurde bei normalen Temperaturbedingungen, nämlich $4\text{ bis }8\text{ }^{\circ}\text{C}$, Testkit 2 bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ und Testkit 3 bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ für jeweils 1 Woche gelagert (beschleunigte Haltbarkeitsprüfung). Nach einer Woche sollte die Funktion des Testkits anhand der Standardkurve und durch Überprüfung der absoluten Bindung B_0 und der Testkitkontrollen gezeigt werden. Als Referenz gelten die Standardkurve, die Bindung B_0 und die Testkitkontrollen gewonnen mit Testkit 1 und als Akzeptanzkriterien für die Robustheit wurde festgelegt, dass die ermittelten Daten den aus der Referenzmessung mit einer maximal zulässigen relativen analytischen Unpräzision entsprechen.

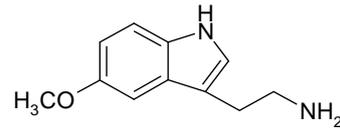
2.11.8 Spezifität

Die eindeutige Erfassung und Identifizierung von Melatonin mit dem RIA soll mit der Spezifität des Antikörpers gezeigt werden. Verschiedene, melatoninähnliche Substanzen wurden auf ihre mögliche Kreuzreaktion im Assay getestet [Di et al., 1998]:

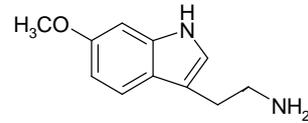
Tabelle 7: Kreuzreaktion von Melatonin und melatoninähnliche Substanzen

Substanz	Strukturformel
Melatonin	
N-Acetyl-5-hydroxytryptamin (N-Acetylserotonin)	
5-Methoxytryptophol	

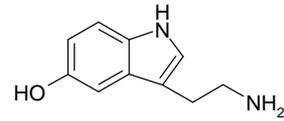
5-Methoxytryptamin



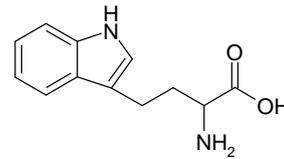
6-Methoxytryptamin



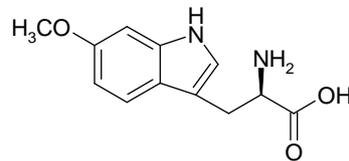
Serotonin



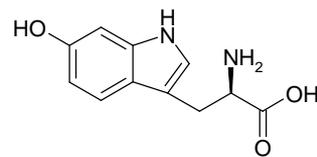
DL-Tryptophan



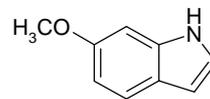
5-Methoxy-DL-tryptophan



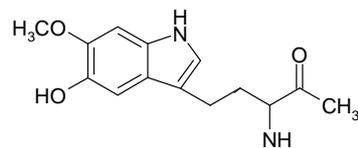
5-Hydroxy-L-tryptophan



5-Methoxyindol



6-Hydroxymelatonin



Für jede Substanz wurden in 0,1 M HCl bzw. Methanol eine Stocklösung mit einer Konzentration von 1 mg/mL hergestellt. Aus dieser Stocklösung wurden folgende Konzentrationen in einer 1:10 Verdünnung mit unbehandeltem Mausserum bzw. Mausplasma hergestellt: A = 100 µg/mL; B = 10 µg/mL; C = 1 µg/mL; D = 0,1 µg/mL; E = 0,01 µg/mL; F = 0,001 µg/mL.

Die Kreuzreaktivität wird durch die 50 %-Bindung beschrieben, d.h. es wird ermittelt, bei welcher Konzentration 50 % des zugesetzten markierten Antigens verdrängt wird.

$$\text{Kreuzreaktivität(\%)} = \frac{\text{Melatonin - Konz.bei50\% Bindung}}{\text{Subs tan z - Konz.bei50\% Bindung}} * 100$$

Akzeptiert wurden Kreuzreaktionen $\leq 0,1$ %.

2.12 Anwendungen

2.12.1 Bestimmung von endogenem Melatonin in unbekanntem Serum- und Plasmaproben von Kontroll-Mäusen und Erstellung eines 24-h Profils

Nach Abschluss der Vorversuche und Validierung wurde der „Direkt-RIA“ nun für die Melatoninbestimmung in Serum- und Plasmaproben von Kontroll-Mäusen angewendet. Um den diurnalen Rhythmus von Melatonin in Mausproben zu untersuchen wurde ein Protokoll entwickelt, nach dem bei 30 Mäusen alle 2 h über eine Periode von 24 h jeweils bis zu 300 µL Mausserum und Mausplasma gewonnen wurden. Mit dem RIA soll Melatonin im Mausserum und Mausplasma bestimmt und niedrige Tag- bzw. hohe Nachtwerte unterschieden werden. Die Mausserumproben wurden mit der Mausserumausgleichsmatrix und die Mausplasma proben mit der Mausplasmaausgleichsmatrix gemessen. Die ermittelten Melatoninkonzentrationen im Mausserum und Mausplasma wurden als 24-h Profil in einer Grafik miteinander verglichen.

2.12.2 Vergleich des „Direkt-RIA“ mit Extraktionsmethoden

Viele der bislang angewandten RIA basieren auf einer Probenvorbereitung durch unterschiedliche Extraktionsmethoden. Der RIA zur direkten Bestimmung von Melatonin in Mausproben sollte mit etablierten Extraktionsmethoden [Rizzo et al., 2002] verglichen werden, dabei handelte es sich um:

- Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Methanol, Chloroform, Dichlormethan und tert. Butylmethylether

und

- Festphasenextraktion (SPE) mit C₁₈-(Octadecyl) Extraktionssäulen.

Die genannten Extraktionsmethoden haben den Vorteil, dass der zu bestimmende Analyt durch das Trennverfahren aus dem z.B. Protein-reichen Extraktionsgut gelöst wird und in einem störungsfreien Puffer wieder aufgenommen werden kann. Ein anderer Vorteil ist, dass man den Analyten aufkonzentrieren kann und dadurch geringere Volumina für den Assay verwendet werden können. Mit dem Vergleich zum „Direkt-Assay“ wurde gezeigt, dass ohne aufwendige Probenvorbereitungen Melatonin in Mausproben bestimmt werden kann.

2.12.3 Flüssig-Flüssig-Extraktion vs. Direkt-Bestimmung

Für die Extraktion von Melatonin wurden verschiedene organische Lösungsmittel verwendet. Zur Bestimmung der Extraktionseffizienz gegenüber der Referenzmethode wurde die Wiederfindungsrate von Melatonin mit dem „Direkt-RIA“ als auch nach Extraktion analysiert und verglichen. Dazu wurden Mausproben mit definierten Melatoninkonzentrationen (0, 12, 40, 120, 400, 1200 und 4000 pg/mL) aufgestockt. Vorbereitung der Aufstockung für die Bestimmung der Wiederfindung: Vom Standard A bis G wurden 20 µL und anschließend 50 µL von der Mausprobe in einem Mikroschraubgefäß vorgelegt. Für die Extraktion wurden 600 µL gekühltes Lösungsmittel benötigt. Die Proben wurden 1 min gut mit einem Vortex durchmischt und danach 10 min bei 3000 x g zentrifugiert (gekühlt bei 4 °C). Die Proben mit Chloroform, Dichlormethan und tert.

Butylmethylether bilden 2 Phasen. Um die wässrige Phase von der Lösungsmittelphase besser abtrennen zu können wurden die Röhrchen (außer Methanol) über Nacht bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Am nächsten Tag wurde das Lösungsmittel von der gefrorenen Wasserphase getrennt und in vorbereitetes Borosilikatröhrchen pipettiert sowie in einen vorgeheizten ($70\text{ }^{\circ}\text{C}$) Thermoblock gestellt, bis das Lösungsmittel vollständig verdampft war [Plebani et al., 1990]. Anschließend wurde der Rückstand mit $70\text{ }\mu\text{L}$ Standardmatrix (Standard A) und $50\text{ }\mu\text{L}$ Assaypuffer aufgenommen. Der Inhalt wurde ca. 1 min gut durchmischt und dann vollständig mit einer Pipette in Spitzbodenröhrchen gewechselt. Es folgten Zugabe von $25\text{ }\mu\text{L}$ Antikörper (Titer von 1:6000 anstatt von 1:5000) und 1 h Inkubation bei RT. Nach der Inkubationszeit wurden $50\text{ }\mu\text{L}$ Tracer hinzugegeben und die Röhrchen für weitere 20 bis 24 h bei RT aufbewahrt.

Vorbereitung der Standards für den RIA: In Spitzbodenröhrchen wurden $20\text{ }\mu\text{L}$ Standard A bis G und K1 und K2 pipettiert, $50\text{ }\mu\text{L}$ Standardmatrix, $50\text{ }\mu\text{L}$ Assaypuffer und $25\text{ }\mu\text{L}$ Antikörper hinzugegeben, sowie nach einer Inkubationszeit von 1 h bei RT $50\text{ }\mu\text{L}$ Tracer. Die folgenden Schritte sind mit denen vom „Direkt-RIA“ identisch. Bevor mit der Bestimmung von Melatonin in den Mausproben begonnen wurde, sollten mögliche Störeinflüsse von Proteine in Serum oder Plasma bei der Extraktion abgeschätzt werden. Dafür wurde vorab die Wiederfindungsrate von Melatonin nach Aufstockung und Extraktion in einer Protein-freien Standardmatrix überprüft. Die Durchführung der Aufstockung und Extraktion, sowie anschließender RIA erfolgten wie oben beschrieben. Es wurde die Wiederfindung von Melatonin in Prozent nach Extraktion mit den einzelnen Lösungsmitteln miteinander verglichen. Danach folgte das Ergebnis für die Wiederfindungsrate von Melatonin im Mausserum und Mausplasma einschließlich eines Vergleichs zwischen Direktbestimmung und Flüssig-Flüssig-Extraktion.

2.12.4 Festphasenextraktion vs. Direkt-Bestimmung

Die Festphasenextraktion (SPE = Solid Phase Extraction) wurde mit einer C_{18} -(Octadecyl) Extraktionssäule durchgeführt [Kawashima und Nagakawa, 1982; Plebani et al., 1990]. Das Mindestvolumen für eine vollständige Extraktion liegt bei mindestens $100\text{ }\mu\text{L}$ pro Extraktionssäule. Weil mit einem minimalen Probenverlust zu rechnen ist wurde 10 % mehr von den Mausproben auf die Säule gegeben. Zur Überprüfung der Extraktionsausbeute wurden Mausserum, Mausplasma und Standardmatrix mit einer definierten Melatoninkonzentration aufgestockt. Die Konzentrationen betragen 0, 12, 40, 120, 400, 1200 und 4000 pg/mL . Für die Aufstockung wurden $20\text{ }\mu\text{L}$ Standard A bis G in Mikroschraubgefäße vorgelegt. Dann wurden $110\text{ }\mu\text{L}$ Mausserum bzw. Mausplasma hinzupipettiert.

Vorbereitung der Extraktionssäule: Die Säule wurde mit $2 \times 1\text{ mL}$ Methanol gespült und je 1 min bei $200 \times g$ zentrifugiert, anschließend mit $2 \times 1\text{ mL}$ Reinstwasser gewaschen und 1 min bei $200 \times g$ zentrifugiert. Nach der Vorbereitung wurde die zu extrahierende Probe auf die Säule gegeben.

Extraktion: In diesem Fall wurde das gesamte Volumen (110 μL) extrahiert. Die Probe in das Säulenbett einwirken lassen und die Säule anschließend 1 min bei 200 x g zentrifugieren. Danach wurden 2 x 1 mL 10 % Methanol auf die Säule gegeben und 1 min bei 500 x g zentrifugiert.

Eluieren: Zum Eluieren von Melatonin wurden 600 μL Methanol verwendet. Die Säule wurde 1 min bei 200 x g zentrifugiert und das Eluat in einem Borosilikatglasröhrchen aufgefangen. Die Glasröhrchen wurden solange in einen Thermoblock gestellt (70 °C), bis das gesamte Lösungsmittel verdampft war. Der Rückstand wurde mit 130 μL Standardmatrix und 50 μL Assaypuffer rekonstituiert. Der Inhalt wurde ca. 1 min gut durchmischt und anschließend das gesamte Volumen in Spitzbodenröhrchen gewechselt. Danach wurde mit der Zugabe von 25 μL Antikörper (Titer 1:6000) und 1 h Inkubation bei RT fortgesetzt. Anschließend wurden 50 μL Tracer hinzupipettiert und für 20 bis 24 h inkubiert. Der Rest des RIA ist dem Pipettierschema zu entnehmen. Die Standards für den RIA wurden folgendermaßen vorbereitet: Dazu wurden 20 μL Standard A bis G bzw. K1 und K2, 110 μL Standardmatrix, sowie 50 μL Assaypuffer und 25 μL Antikörper in die Spitzbodenröhrchen gegeben. Nach 1 h Inkubation bei RT wurden dann 50 μL Tracer dazu pipettiert. Zur Bewertung der Extraktionseffizienz wurden vergleichende Messungen vorgenommen. Da neben der Extraktion von Melatonin auch andere Substanzen mit unterschiedlicher Effizienz extrahiert werden wurde parallel zwischen Extrakten aus einer aufgestockten Protein-freien Standardmatrix sowie aus Mausproben verglichen. Dargestellt sind die Wiederfindungsraten von Melatonin, ermittelt mit dem „Direkt-RIA“ und nach C_{18} -Extraktion.

2.12.5 Vergleich eines Melatonin 24-h Profils im Serum von Kontroll-Mäusen analysiert mit dem „Direkt-RIA“ sowie mit Methanol- und C_{18} -Extraktion

Die Funktionalität des „Direkt-RIA“ im Vergleich zur Methanol- und zur SPE C_{18} -Extraktion sollte außerdem anhand von echten Mausproben gezeigt werden. Dazu wurden die Mausproben ebenfalls mit Methanol sowie mit C_{18} -Extraktionssäulen vorbehandelt. Die gewonnenen Melatoninkonzentrationen zu den unterschiedlichen Uhrzeiten mit dem „Direkt-RIA“ und nach Extraktion wurden parallel in einem 24-h Profil verglichen. Allerdings stand nicht genügend Mausplasma zur Verfügung, so dass nur Melatonin im Mausextrakt betrachtet werden konnte. Die Absicht war zu zeigen, dass der „Direkt-RIA“ durchaus dieselben Ergebnisse liefert wie die verbreiteten RIA mit Probenvorbereitungen.

2.12.6 Testvergleich mit einem kommerziell erhältlichen direkt RIA

Der entwickelte und validierte Melatonin „Direkt-RIA“ wurde mit einem kommerziell erhältlichen RIA zur quantitativen Bestimmung von Melatonin im Plasma oder Serum verglichen. Dazu wurde ein „Melatonin direct Radioimmunoassay für die direkte quantitative Bestimmung von Melatonin im Plasma oder Serum verwendet“, der auf dem Kennaway G280 Anti-Melatonin-Antikörper basiert [Vaughan, 1993]. Die Durchführung des RIA ist wie folgt beschrieben: 800 μL Proben und Kontrollen in die entsprechenden Röhrchen geben. Je 100 μL gelöstes Vorbehandlungs-Reagenz zugeben und gut durchmischen. Für 30 min bei 37 °C in einem Wasserbad inkubieren. Je 100 μL Neutralisierungs-

Lösung zugeben und gut durchmischen. Die vorbehandelten Proben und Kontrollen auf RT abkühlen lassen bevor mit dem RIA begonnen wird. 500 µL Null Kalibrator in das NSB Röhrchen und 400 µL Null Kalibrator in das MB Röhrchen pipettieren. 400 µL Kalibrator A bis E in die entsprechenden Röhrchen pipettieren. 400 µL vorbehandelte Patientenproben bzw. Kontrollen in die entsprechenden Röhrchen pipettieren. Je 100 µL Antikörper zu allen Röhrchen geben und vortexen. Je 100 µL [¹²⁵I]-Melatonin Tracer zu allen Röhrchen geben. Alle Röhrchen für 20 ± 4 h bei 2 bis 8 °C inkubieren. Die Flasche mit dem 2. Antikörper mehrmals invertieren, einen Rührstab zugeben und auf einen Magnetrührer stellen. Unter ständigem Rühren 100 µL der 2. Antikörperlösung zu allen Teströhrchen (außer T) zugeben und gut durchmischen. Für 15 ± 2 min bei 2 bis 8 °C inkubieren. Ein mL ultrareines Wasser zu allen Teströhrchen (außer T) zugeben. Für 2 min bei 2000 x g und 18 bis 28 °C zentrifugieren. Den Überstand absaugen (außer T) und das Präzipitat für die Messung zurückbehalten. Die Röhrchen für 2 min in einem Gamma Counter messen. Da das verlangte Probenvolumen von 800 µL viel zu hoch ist, wurden die Proben nach Anleitung mit dem angebotenen Probenverdünnungspuffer 1:16 verdünnt, d.h. 750 µL Puffer + 50 µL Probe. Das Ergebnis wurde dann mit 16 multipliziert. Für die Auswertung wurden die Melatoninkonzentrationen im Serum von den Kontroll-Mäusen als 24-h Profil dargestellt. Der Vergleich sollte zeigen, dass der selbst entwickelte „Direkt-RIA“, mit einem Probenvolumen von 50 µL pro Bestimmung und seinem spezifischen Antikörper einen Vorteil gegenüber den beschriebenen RIA besitzt.

2.12.7 Bestimmung von endogenem Melatonin bei unterschiedlichen Mauslinien

Untersucht wurden Tiere des Stammes C57BL, C3H, Wildtyp (WT) und „knockout“-Mäuse. Die C57BL, C3H und WT stammen von der Martin-Luther-Universität Halle Wittenberg. Die „knockout“-Mäuse wurden von der Goethe-Universität Frankfurt am Main (Prof. Korf, Prof. Stehle) bezogen. Futter und Wasser standen bei den Mausstämmen *ad libitum* zur Verfügung. Das Lichtregime wurde über Zeitschaltuhren gesteuert (L:D = 12:12, L_{an} 06:00 Uhr). Haltung und Zucht erfolgten in klimatisierten Räumen (24 ± 1 °C, rel. Luftfeuchte zwischen 48 und 58 %). Die Blutabnahmen bei den Mäusen erfolgten in Übereinstimmung mit den Richtlinien für Tierversuche nach Maßgabe der Europäischen Gemeinschaft (Direktive 86/609/EEC). Für die Bestimmung von Melatonin wurden bei allen Mauslinien nur EDTA-Plasma abgenommen. Deshalb wurde eine Plasma-Ausgleichsmatrix für die Bestimmung verwendet. Die Abnahme erfolgte bei C57BL und C3H um 11:00 und 15:00 und um 00:15 und 01:00 Uhr, beim WT und bei den „knockout“-Mäusen zwischen 06:00 und 18:00 Uhr sowie zwischen 18:00 und 06:00 Uhr. Das Plasma wurde anschließend 10 min bei 1500 g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und bis zur weiteren Bearbeitung bei 4 bis 8 °C gelagert. Das Ergebnis sollte zeigen, dass mit dem „Direkt-RIA“ niedrige Tag- und hohe Nachtwerte bestimmt werden können und somit ein diurnaler Rhythmus des Melatoninspiegels bei unterschiedlichen Mauslinien nachgewiesen werden kann.

3. Ergebnisse

3.1 Vorversuche

3.1.1 Mauseausgleichsmatrix

Für die Auswahl der richtigen Mauseausgleichsmatrix wurde aus einem Mausserum bzw. Mausplasma eine Ausgleichsmatrix hergestellt und eine Standardkurve erstellt. Der sigmoide Kurvenverlauf der Standards ist bei Mausserum bzw. Mausplasma kongruent und die Abstufung zwischen den Standardkonzentrationen ist nahezu ideal (Abb. 5).

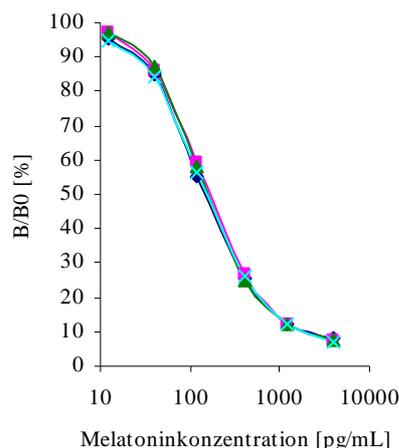


Abb. 5: Standardkurven erstellt mit Mausserum- und Mausplasmaausgleichsmatrix, ■ Mausserum 1, ■ Mausserum 2, ■ Mausplasma 1, ■ Mausplasma 2

Tabelle 8: Daten zum RIA mit Mausserum und Mausplasma als Ausgleichsmatrix

	MS 1	MS 2	MW	SD	VK [%]	MP 1	MP 2	MW	SD	VK [%]
TC [cpm]	44519	44327	44423	136	0,3	44432	44513	44472	57	0,1
NSB [%]	1,2	1,4	1,3	0,1	7,7	1,1	1	1,1	0,1	9,1
B0 [%]	32,2	32,6	32,4	1,1	3,4	32	35,8	33,9	1,5	4,4
12 pg/mL	95,4	96,9	96,2	1,1	1,1	97	94,9	96,0	1,5	4,6
40 pg/mL	85,0	85,9	85,5	0,6	0,7	87,3	84,5	85,9	2,0	2,3
120 pg/mL	55,3	59,2	57,3	2,8	4,9	58,2	56,6	57,4	1,1	1,9
400 pg/mL	25,3	27,0	26,2	1,2	4,6	24,9	26,2	25,6	0,9	3,5
1200 pg/mL	12,2	12,1	12,2	0,1	0,8	12,3	12,4	12,4	0,1	0,8
4000 pg/mL	7,9	7,6	7,8	0,2	2,6	7,5	7	7,3	0,4	5,5

Die Variationskoeffizienten bei den einzelnen Standardkonzentrationen liegen weit unter 20 % und deuten auf eine gute Doppelbestimmung hin. Die Voraussetzungen für die Totalcounts, die NSB, die absolute Bindung und die Standardkurve werden von beiden Matrizen erfüllt. Anhand der einfachen Darstellung einer Standardkurve mit Mausserum bzw. Mausplasma ist kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Mausmatrizes festzustellen und nicht eindeutig festzulegen, welche Ausgleichsmatrix die richtige ist. Zur besseren Feststellung, welche Mausprobe als Ausgleichsmatrix geeignet ist und ob das vorhandene Melatonin vollständig adsorbiert wird, wurden die Melatoninkonzentrationen in Mausserum- und Mausplasmaproben einer anderen Charge, vor und nach Aktivkohlebehandlung (unbehandelt und behandelt) gemessen. Die Melatoninkonzentrationen sind in den unbehandelten Mausproben unterschiedlich hoch, wobei der Gehalt im Mausplasma 1 mit 24,7

pg/mL am niedrigsten und im Mausserum 2 mit 85,9 pg/mL am höchsten ist. Die Aktivkohlebehandlung bei Mausserum 1, Mausplasma 1 und 2 ist sehr erfolgreich, denn die Melatoninkonzentrationen liegen unter dem B-Standard, also < 12 pg/mL. Nur bei Mausserum 2 ist nach der Behandlung noch eine Konzentration von 39,2 pg/mL zu messen, einer Reduzierung von 45,6 %. Das heißt im Mausserum 2 konnte nicht das gesamte Melatonin mit der Aktivkohle gebunden und somit entfernt werden (Abb. 6).

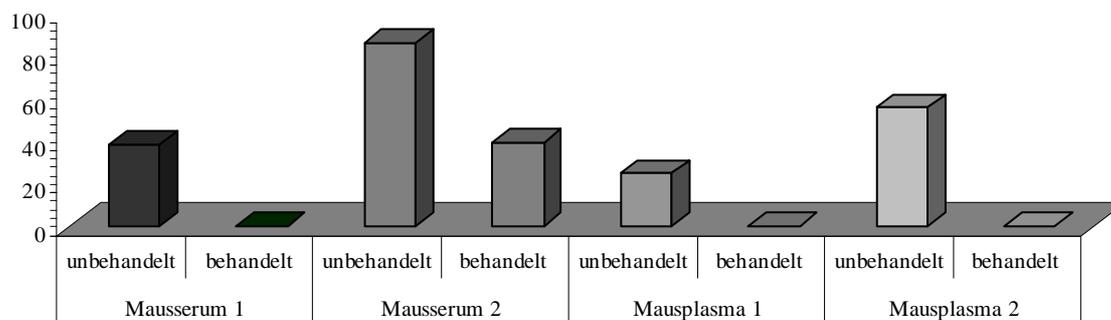


Abb. 6: Melatoninkonzentrationen im Mausserum und Mausplasma vor und nach Aktivkohlebehandlung

In Tab. 9 sind die Ergebnisse zur Untersuchung eines Einflusses der Aktivkohlebehandlung auf andere Blutmerkmale dargestellt. Bei allen drei gibt es keinen signifikanten Unterschied zwischen erfolgter und fehlender Aktivkohlebehandlung. Die analysierten Konzentrationen sind mit Referenzwerten für zwei Mauslinien identisch.

Tabelle 9: Untersuchung des Einflusses der Aktivkohlebehandlung auf ausgewählte Blutmerkmale. Zum Vergleich die Durchschnittswerte von zwei verschiedenen Mauslinien (Quelle: Mouse Phenome Database and The Jackson Laboratory, 2009)

	vor Aktivkohle-		nach Aktivkohle-		Referenzwerte		Referenzwerte	
	behandlung		behandlung		C57BL		C3H	
	MS	MP	MS	MP	MS	MP	MS	MP
Gesamtbilirubin [mg/dL]	0,3	0,3	0,2	0,2	0,3	0,3	0,5	0,5
Totalprotein [g/dL]	6,2	6,1	5,8	5,9	6,1	6,1	6,4	6,4
Triglyceride [mg/dL]	95,5	91,2	94,6	90,3	92,9	92,9	91,3	91,3

In einem Spiking-Experiment sollte gezeigt werden, ob die detektierten Melatoninkonzentrationen vertrauenswürdig sind (Abb. 7).

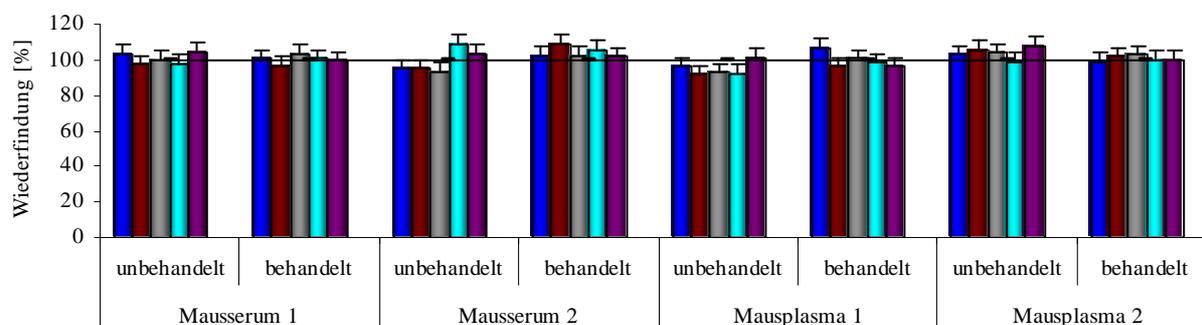


Abb. 7: Wiederfindung von Melatonin in behandelten und unbehandelten Mausproben, ■ 12 pg/mL, ■ 40 pg/mL, ■ 120 pg/mL, ■ 400 pg/mL, ■ 1200 pg/mL

Grundsätzlich ist erkennbar, dass mit allen Ausgleichsmatrizes sehr gute Wiederfindungsraten von Melatonin vorliegen und die Standardabweichung und der Variationskoeffizient $< 20\%$ sind. Eine Berechnung der Wiederfindung bei der höchsten Aufstockung von 4000 pg/mL ist bei keiner Mausprobe mehr möglich. Insbesondere die Ausgleichsmatrizes für die Bestimmung der Wiederfindungsrate im Mausserum 1 und Mausplasma 2 zeigten sehr gute Voraussetzungen (Abb. 7). Die mittlere Wiederfindung liegt bei Mausserum 1 bei $99,8\%$, die Standardabweichung ist $< 3\%$ und der Variationskoeffizient beträgt $6,7\%$. Bei Mausplasma 2 ist die mittlere Wiederfindung $99,6\%$, die Standardabweichung ist $< 5,0\%$ und der Variationskoeffizient beträgt $7,7\%$.

3.1.2 Melatonin-Antikörper

Aus dem Kaninchenserum mit dem höchsten Titer wurden drei unterschiedliche Antikörperkonzentrationen hergestellt und mit dem Assay drei Standardkurven erstellt (Abb. 8 A). Wichtig dabei ist die absolute Bindung B_0 [%] und sind die Abstände zwischen den Standardpunkten [%]. Die Bindung B_0 beträgt bei einem Titer von $1:4000$ ca. 45% , bei $1:5000$ ca. 30% und bei $1:6000$ ca. 22% (Abb. 8 B). Der Standardkurvenverlauf ist bei einem Titer von $1:4000$ flacher, insbesondere zwischen Standard B und C ist der Abstand sehr gering. Die Standardkurve sinkt bei Standard G nur auf $13,7\%$. Dagegen sind die Standardkurven bei einem Titer von $1:5000$ bzw. $1:6000$ steiler. Besonders bei einem Titer von $1:5000$ ist der Abstand zwischen Standard B und C eindeutig, ebenso ist zwischen den anderen Standardpunkten eine klare Abstufung zu erkennen, wobei die zwischen D und E hier größer ist als bei einem Titer von $1:6000$. Aufgrund der guten Bindung von ca. 30% und des sehr guten Standardkurvenverlaufs wurde der Antikörpertiter für den Assay bei $1:5000$ eingestellt.

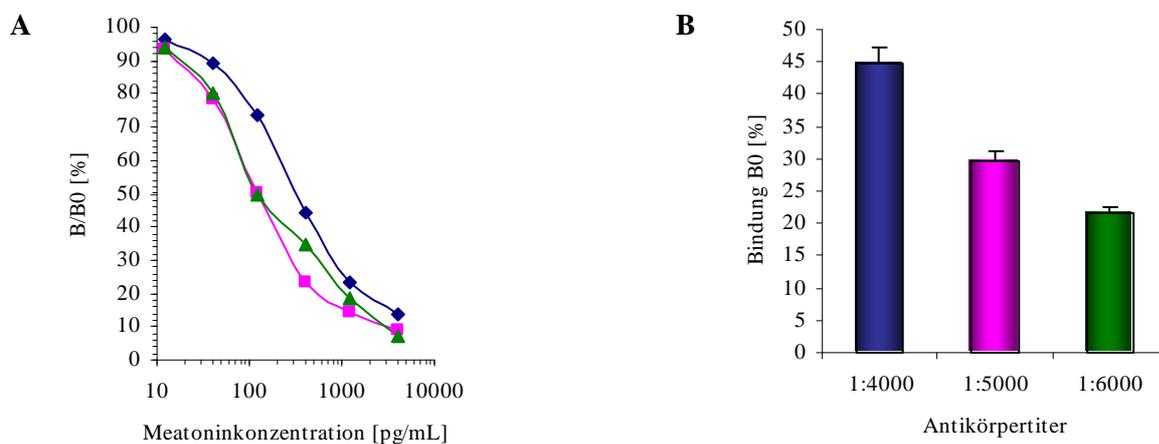


Abb. 8 A und B: Standardkurven (A) mit Antikörpertiter von ■ $1:4000$, ■ $1:5000$, ■ $1:6000$ und Bindung B_0 (B)

3.1.3 Bestimmung des Gesamt-Melatonins (freies und gebundenes Melatonin)

Für die Bestimmung des Gesamt-Melatonins wurden zwei Proteinfällungen und eine enzymatische Methode miteinander verglichen. Die Darstellung der Standardkurve in Abb. 9 A und B macht den Unterschied zwischen Proteinfällungen und Enzymbehandlung deutlich. Insbesondere mit Pepsin ist eine klare Abstufung zwischen den einzelnen Standardpunkten zu erkennen. Die Standards sind klar

voneinander getrennt und die Standardkurven zeigen einen sigmoiden Verlauf. Sehr wichtig ist die eindeutige Abstufung im linearen Bereich sowie zwischen 0 und 12 pg/mL, damit Melatoninkonzentrationen in den Mausproben bestimmt werden können, die sehr nah beieinander liegen bzw. niedrig sind.

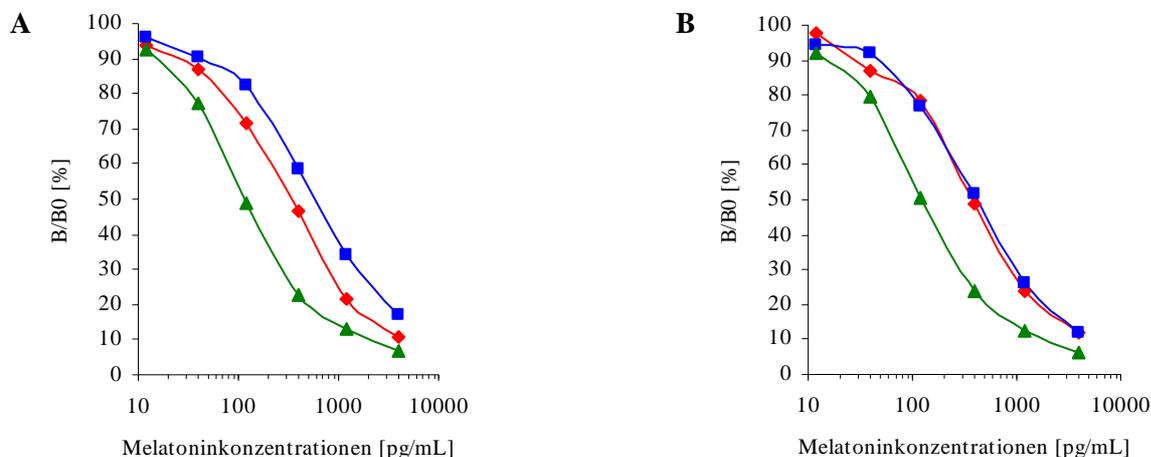


Abb. 9 A und B: Standardkurven für Mausserum und Mausplasma nach verschiedenen Proben-
vorbereitungen, ■ 5-Sulfosalicylicsäure Dihydrat, ■ TCA, ■ Pepsin

Dagegen sind die beiden Standardkurven nach den Proteinfällungen flacher im Verlauf und zeigten keine gute Trennung zwischen den Standardpunkten, besonders bei der Fällung mit TCA liegen die prozentualen Bindungen sehr dicht zusammen. Mit der Anreicherung einer definierten Menge Melatonin (80 pg/mL) in aktivkohlebehandeltem Mausserum und Mausplasma sollte die Wiederfindung nach Proteinfällung und Pepsin analysiert werden. Die Messungen der Melatoninkonzentrationen in den angereicherten Mausproben (Ausgangswert) ergaben bei der Proteinfällung mit 5-Sulfosalicylicsäure Dihydrat und TCA sowohl bei Serum als auch bei Plasma fast identische Wiederfindungen von 75,6 und 73,0 % bzw. 77,8 und 71,5 %. Das bedeutet, bei diesen Vorbereitungs-methoden ist mit einem mittleren Verlust von ca. 25 % zu rechnen. Bei der Vorbereitung mit Pepsin hingegen liegt die Wiederfindung im Mausserum bei 98,1 und im Mausplasma bei 97,4 %. Der Verlust ist also sehr gering. Die angereicherten Mausproben wurden zusätzlich mit 12, 40, 120, 400, 1200 und 4000 pg/mL Melatonin aufgestockt (Abb. 10 A und B). Dann liegen die mittleren Wiederfindungsraten bei 85,8 und 82,2 % bzw. 84,9 und 81,9 %. Das bedeutet also einen Verlust von ca. 15 bis 20 %. Eine sehr gute Wiederfindung von 97,8 bzw. 99,6 % wurde mit Pepsin erreicht. Die Wiederfindungsrate ist bei allen Aufstockungen konstant, der VK liegt bei Mausserum und Mausplasma bei 1,6 %. Mit dieser Probenvorbereitung wurde sowohl nach Anreicherung einer aktivkohlebehandelten Mausprobe und zusätzlicher Aufstockung eine sehr gute Wiederfindung als auch eine sehr gute Standardkurve erzielt.

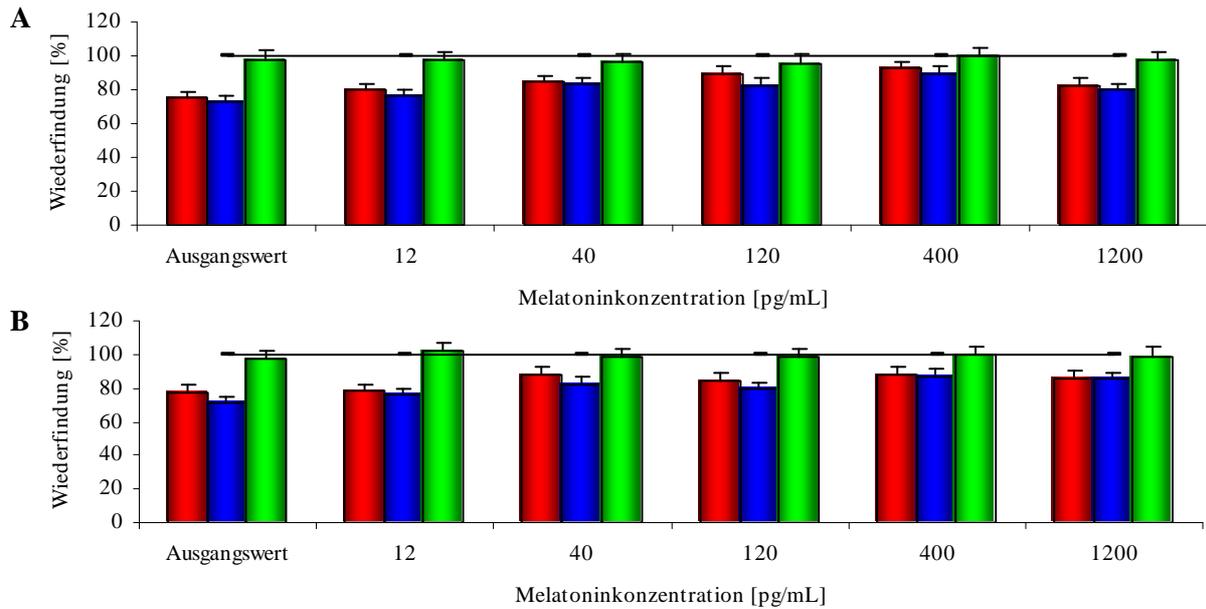


Abb. 10 A und B: Gezeigt wird die mittlere Wiederfindungsrate des Gesamt-Melatonins in Mausserum (A) und Mausplasma (B), ■ 5-Sulfosalicylsäure Dihydrat, ■ TCA; ■ Pepsin

In der Abb. 10 A und B wird deutlich, dass bei der Probenvorbereitung mit Pepsin kein Verlust von Melatonin zu erkennen ist. Aus diesem Grund sollten die Proben und auch die Standards mit Pepsin vorbehandelt werden, damit das gesamte, d.h. das freie als auch das gebundene Melatonin in den Proben bestimmt werden konnte. Für den Nachweis von Gesamt-Melatonin wurde in aktivkohlebehandelten und unbehandelten Mausproben die Melatoninkonzentration bestimmt. Die Testdurchführung fand mit als auch ohne Enzym statt. In den aktivkohlebehandelten Mausproben ist die Melatoninkonzentration nicht zu bestimmen, weil das gesamte Melatonin extrahiert wurde. In dem unbehandelten Mausserum beträgt die Melatoninkonzentration mit Enzym 38,5 pg/mL und ohne Enzym 15,4 pg/mL, was bedeutet, dass ca. 40 % des Melatonins in der Probe frei vorliegt, während ca. 60 % z.B. an Proteine gebunden ist und durch das Enzym abgespalten wird. Im Mausplasma ist die Gesamt-Melatoninkonzentration 24,0 pg/mL und ohne Enzym 10,1 pg/mL. Das heißt, auch hier liegen ca. 40 % des Melatonins in freier Form vor, und ca. 60 % sind gebunden, die durch Pepsin freigesetzt werden (Abb. 11).

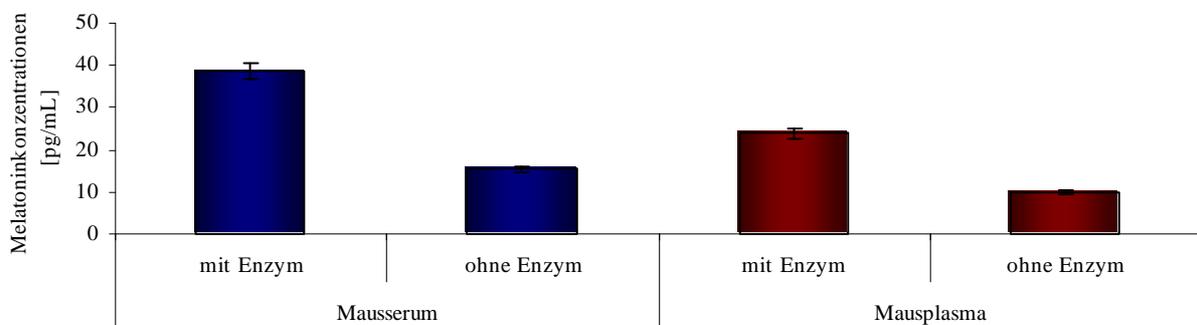


Abb. 11: Vergleich von Melatoninkonzentrationen in Mausproben mit und ohne Enzymvorbereitung

Es wurde deutlich, dass mit Hilfe des Enzymschritts das gebundene Melatonin freigesetzt und somit das Gesamt-Melatonin in der Mausprobe erfasst werden kann.

3.1.4 Herstellung und Überprüfung der Reproduktion des Melatonin-Tracers

In diesem Teil der Vorversuche sollte gezeigt werden, dass die Markierung (Abb. 12) unter denselben Bedingungen wiederholbar ist und der Assay reproduzierbare Ergebnisse liefert. Bei der Überprüfung wurden insbesondere die absolute Bindung B0 und die Standardpunkte miteinander verglichen. Die Synthese bzw. die Herstellung des Melatonin-Tracers folgte der Reaktionsgleichung [Bolton und Hunter, 1973]:

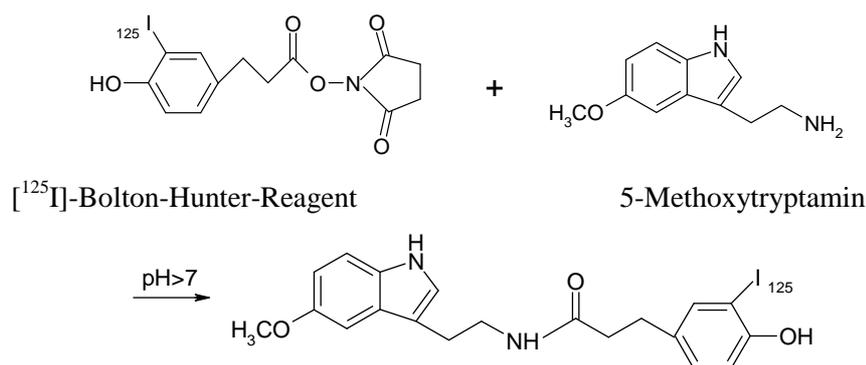


Abb.12: Reaktionsgleichung für die Markierung

Die Abb. 13 A und B stellen die Standardkurven mit einer Mausserum- und einer Mausplasmaausgleichsmatrix, dar.

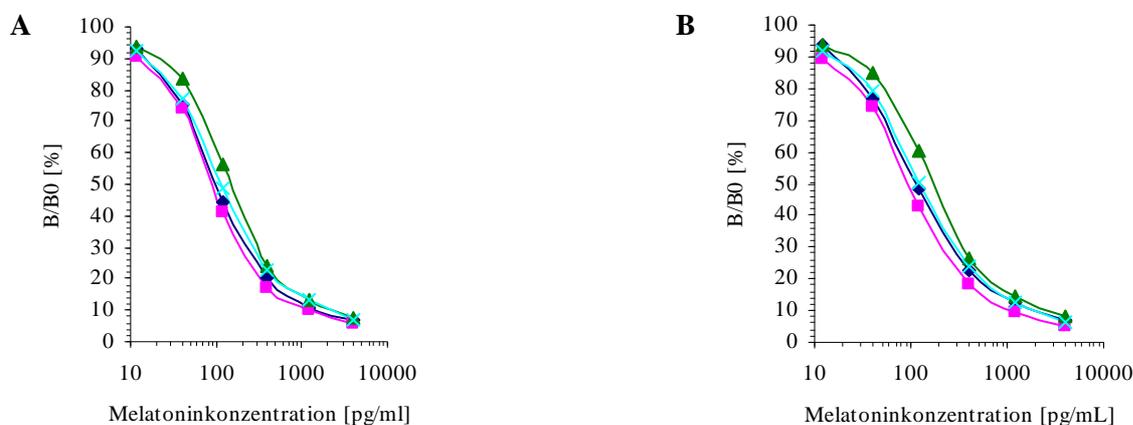


Abb. 13 A und B: Standardkurven für Mausproben detektiert mit Tracer verschiedener Chargen, ■ Charge 5908 direkt nach Markierung, ■ Charge 5908 nach 105 Tagen, ■ Charge 6074 direkt nach Markierung, ■ Charge 6074 nach 105 Tagen

Für Mausserum liegt die Bindung B0 bei der Charge 5908 direkt nach der Markierung und nach 105 Tagen zwischen 23,1 und 28,4 %, bei der Charge 6074 zwischen 22,8 und 26,9 %. Der Verlauf der Standardkurven bei beiden Chargen ist nahezu identisch (Abb. 13 A). Ähnlich verhalten sich die Daten bei Mausplasma als Ausgleichsmatrix. Hier liegt die Bindung B0 bei der Charge 5908 zwischen 26,1 und 36,7 % bzw. bei der Charge 6074 zwischen 26,6 und 33,0 %. Die Standardkurven zeigen alle einen sigmoiden Verlauf mit deutlich voneinander getrennten Standardpunkten (Abb. 13 B). Der

Verlust der Aktivität ist bei beiden Chargen identisch, die Zunahme der Bindung B0 und Steilheit der Standardkurven sind gleich. Um sicher zu gehen, dass die Markierung des Tracers reproduzierbar ist, wurden unbehandelte Mausserum- und Mausplasmaproben mit einer definierten Menge Melatonin aufgestockt. Die durchschnittliche Wiederfindung bei dem Tracer mit der Chargennummer 5908 direkt nach der Markierung beträgt 95,2 % und nach 105 Tagen 107,6 %. Bei dem Tracer mit der Charge 6074 ist die mittlere Wiederfindung 100,6 % direkt nach der Markierung und 100,4 % nach 105 Tagen. Anhand der Abb. 14 kann man erkennen, dass es keine besonderen Ausreißer in der Wiederfindungsrate der einzelnen Aufstockungen gibt und dass die individuellen Wiederfindungen sehr gut um den Gesamtmittelwert verteilt sind.

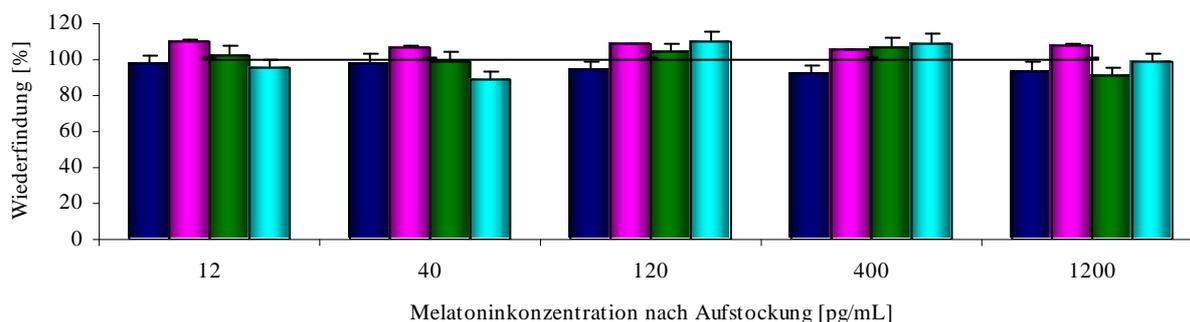


Abb. 14: Wiederfindung von Melatonin im Mausserum, ■ Charge 5908 direkt nach Markierung, ■ Charge 5908 nach 105 Tagen, ■ Charge 6074 direkt nach Markierung, ■ Charge 6074 nach 105 Tagen

Die Wiederfindung von Melatonin in aufgestockten Mausplasmaproben mit den beiden Tracern zeigt ebenfalls ein gutes Ergebnis. Die mittlere Wiederfindung bei dem Tracer mit der Charge 5908 liegt direkt nach Markierung bei 90,4 % und nach 105 Tagen bei 104,3 % bzw. beim Tracer mit der Charge 6074 bei 100,6 und 107,2 %. Auch hier ist in Abb. 15 sehr gut zu erkennen, dass es keinen Ausreißer bei der Wiederfindung bei den einzelnen Aufstockungen gibt und dass die einzelnen Ergebnisse sehr gut um den Gesamtmittelwert verteilt sind.

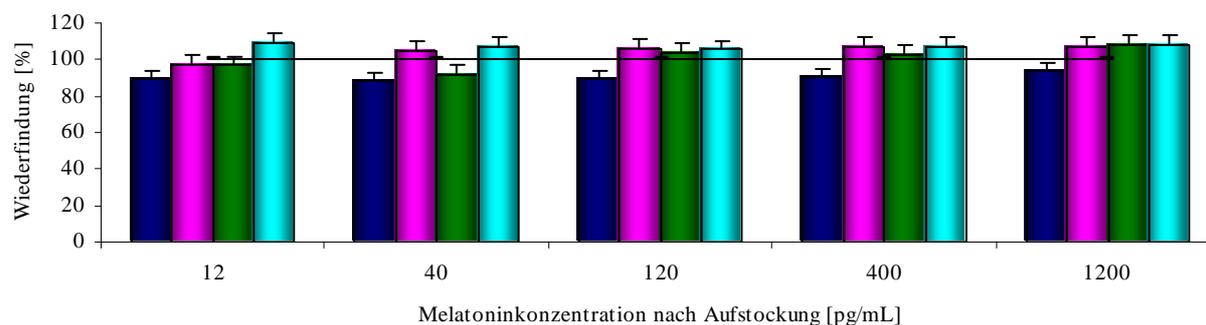


Abb. 15: Wiederfindung von Melatonin im Mausplasma, ■ Charge 5908 direkt nach Markierung, ■ Charge 5908 nach 105 Tagen, ■ Charge 6074 direkt nach Markierung, ■ Charge 6074 nach 105 Tagen

Eine Bestimmung der Wiederfindung mit der höchsten Aufstockung im Mausserum und Mausplasma ist nicht möglich. Mit Ermittlung der Wiederfindungsrate durch Aufstockung von Mausserum- und Mausplasmaproben mit definierten Melatoninkonzentrationen konnte das Ergebnis bestätigt werden,

dass der Tracer sowohl direkt nach der Markierung, als auch nach 105 Tagen und auch von Markierung zu Markierung reproduzierbare Ergebnisse liefert.

3.2 Validierung

3.2.1 Typische Standardkurve und Arbeitsbereich

Der Arbeitsbereich ist: Standard A = 0, Standard B = 12, Standard C = 40, Standard D = 120, Standard E = 400, Standard F = 1200, Standard G = 4000 pg/mL. Die Bindung des markierten Antigens wurde in Prozent der maximalen Bindung linear auf der Ordinate dargestellt (Abb. 16 A und B). Zur Festlegung des Standardbereichs wurden für Mausserum und für Mausplasma zehn Standardkurven mit dem angegebenen Standardkonzentrationsbereich erstellt (Tab. 10).

Tabelle 10: Arbeits- bzw. Standardkonzentrationsbereich

Standard	Arbeitsbereich [pg/mL]	Mausserum		Mausplasma	
		Mittelwert [%]	Bereich [%]	Mittelwert [%]	Bereich [%]
B	12	90,8	85,2 - 96,4	94,7	89,9 - 99,5
C	40	79,3	74,9 - 83,7	81,2	77,4 - 85,0
D	120	55,3	49,5 - 61,1	56,4	52,0 - 60,8
E	400	24,9	21,9 - 27,9	26,4	24,0 - 28,8
F	1200	13,9	10,0 - 17,8	13,6	10,6 - 16,6
G	4000	8,8	5,2 - 12,4	7,7	5,9 - 9,5

Die Differenzierung zwischen den einzelnen Standardpunkten ist deutlich, somit können auch geringe Melatoninkonzentrationsunterschiede erfasst werden. Mit diesem Arbeitsbereich wurde ein praxisnahes Anwendungsziel erreicht, weil mit dem großen Anwendungsbereich ein weites Spektrum für die Analyse von Melatonin in Mausproben gegeben ist.

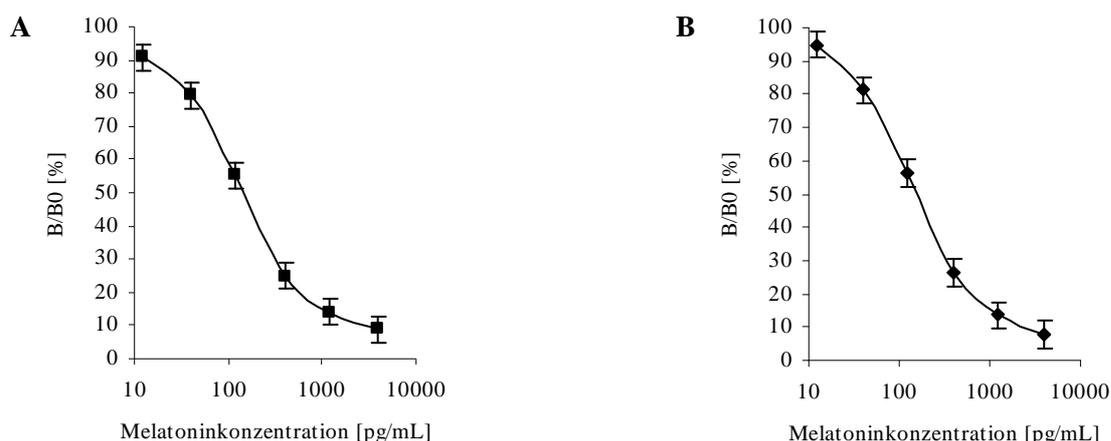


Abb. 16 A und B: Typische Standardkurve für Mausserum bzw. Mausplasma

Die Anforderungen an die Standardkurve, nämlich einem weiten Arbeitsbereich, einem steilen Verlauf mit eindeutig voneinander unterscheidbaren Standardpunkten und einem linearen Bereich, in dem die zu erwartenden Melatoninkonzentrationen fallen, sind erfüllt.

3.2.2 Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze (limit of detection), d.h. die kleinste nachweisbare Menge oder Konzentration des RIA für die Bestimmung von Melatonin im Mausserum liegt bei 9,1 pg/mL und im Mausplasma bei 7,3 pg/mL.

3.2.3 Wiederfindungsrate

Für die Bestimmung der Wiederfindungsraten von Melatonin mit Hilfe der Mausgleichsmatrix wurden Mausserum und Mausplasma mit definierten Melatoninkonzentrationen aufgestockt (Tab. 11 und 12).

Tabelle 11: Daten für die Wiederfindung von Melatonin im Mausserum

	Aufstockung [pg/mL]	Soll x_c [pg/mL]	Ist x_f [pg/mL]	VK [%]	WFR [%]
Leerprobe	/	32	/	/	/
W1	12	44	44,8 ± 3,0	9,4	101,8
W2	40	52	59,3 ± 10,0	2,3	114,0
W3	120	152	161,5 ± 36,0	5,6	106,3
W4	400	432	454,6 ± 37,2	1,3	105,2
W5	1200	1232	1386,6 ± 106,2	7,2	112,5
W6	4000	> 4000	> 4000	/	/
Mittelwert [%]	/	/	/	/	108,0
SD [%]	/	/	/	/	5,1
VK [%]	/	/	/	/	4,7

A	
Regression	$y = 1,1x - 9,8$
R^2	0,99
Wiederfindungsrate ± SD [%]	108,0 ± 5,1
VK [%]	4,7
Bereich [%]	101,8 bis 114,0

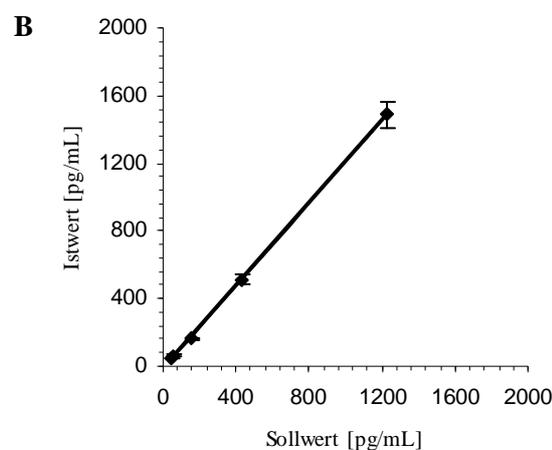


Abb. 17 A und B: Korrelation des Soll- und Istwerts bei der Wiederfindung von Melatonin im Mausserum

Die mittlere Wiederfindungsrate von Melatonin im Mausserum ist 108,0 %. Der Bereich erstreckt sich von 101,8 bis 114,0 %. Tendenziell wurde mehr Melatonin im Mausserum wiedergefunden als theoretisch enthalten sein dürfte, ein Ergebnis, das sich aber über den gesamten Aufstockungsbereich erstreckt. Bei Mausplasma ist die mittlere Wiederfindung 99,3 %, mit einem Bereich zwischen 94,7 und 109,4 %.

Tabelle 12: Daten für die Wiederfindung von Melatonin im Mausplasma

	Aufstockung [pg/mL]	Soll x_c [pg/mL]	Ist x_f [pg/mL]	VK [%]	WFR [%]
Leerprobe	/	34,9	/	/	/
W1	12	46,9	51,3 ± 4,4	8,6	109,4
W2	40	74,9	70,9 ± 0,8	1,1	94,7
W3	120	154,9	149,1 ± 4,9	3,3	96,3
W4	400	434,9	433,6 ± 14,6	3,4	99,7
W5	1200	1234,9	1189,1 ± 17	1,4	96,3
W6	4000	> 4000	> 4000	/	/
Mittelwert [%]	/	/	/	/	99,3
SD [%]	/	/	/	/	5,9
VK [%]	/	/	/	/	5,9

A

Regression	$y = 0,9x + 4,3$
R^2	0,99
Wiederfindungsrate ± SD [%]	99,3 ± 5,9
VK [%]	5,9
Bereich [%]	94,7 bis 109,4

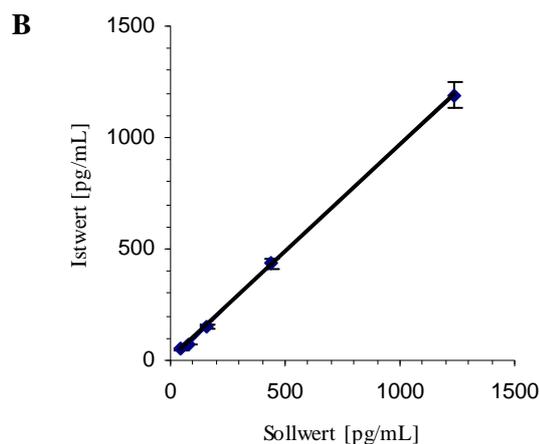


Abb. 18 A und B: Korrelation des Soll- und Istwerts bei der Wiederfindung von Melatonin im Mausplasma

Bei beiden Proben ist eine Bestimmung der Wiederfindungsrate bei einer Aufstockung von 4000 pg/mL nicht mehr möglich. Die festgelegten Akzeptanzkriterien für den Gesamtmittelwert der Wiederfindungsrate zwischen 80 und 120 % und ein Variationskoeffizient < 20 % sind bei beiden Proben erfüllt.

Als nächstes wurden eventuelle systematische Abweichungen geprüft.

Ergebnisse für Mauserum:

$$Q_{xx} = 1001043,2 \text{ [pg/mL]}^2$$

$$\text{Mittelwert } x_c = 382,4 \text{ pg/mL}$$

$$\text{Mittelwert } x_f = 454,5 \text{ pg/mL}$$

$$\text{Steigung } b_f = 1,2$$

$$\text{Achsenabschnitt } a_f = -9,7 \text{ pg/mL}$$

$$\text{Reststandardabweichung } s_{yf} = 14,4 \text{ pg/mL}$$

$$\text{Standardabweichung der Steigung } s_{bf} = 1,439 \cdot 10^{-2}$$

$$\text{Standardabweichung des Achsenabschnitts } s_{af} = 8,471 \text{ pg/mL}$$

Prüfung auf konstant-systematische Fehler:

Der Vertrauensbereich des Achsenabschnitts beträgt

$$\text{VB}(a_f) = a_f \pm t(f = 3, P = 95 \% \text{ zweiseitig}) \cdot s_{af} \text{ mit } t(f, P) = 3,182$$

$$= -9,7 \pm 3,182 \cdot 38,4 \text{ pg/mL}$$

Damit ergibt sich $-36,7 \text{ pg/mL} \leq a_f \leq 17,3 \text{ pg/mL}$

Dieser Vertrauensbereich schließt den Wert 0 pg/mL ein, somit ist von keinem konstant-systematischen Fehler auszugehen.

Prüfung auf proportional-systematische Fehler:

Der Vertrauensbereich der Steigung beträgt

$$\begin{aligned} \text{VB}(b_f) &= b_f \pm t(f = 3, P = 95 \% \text{ zweiseitig}) * s_{b_f} \\ &= 1,2 \pm 3,182 * 1,439 * 10^{-2} \end{aligned}$$

Damit ergibt sich $0,995 \leq b_f \leq 1,24$

Da der Sollwert $b_f = 1$ eingeschlossen wurde, ergibt sich kein proportional-systematischer Fehler.

Ergebnisse für Mausplasma:

$$Q_{xx} = 988147,2 \text{ [pg/mL]}^2$$

$$\text{Mittelwert } x_c = 389,3 \text{ pg/mL}$$

$$\text{Mittelwert } x_f = 378,8 \text{ pg/mL}$$

$$\text{Steigung } b_f = 0,96$$

$$\text{Achsenabschnitt } a_f = 4,3 \text{ pg/mL}$$

$$\text{Reststandardabweichung } s_{y_f} = 13,7 \text{ pg/mL}$$

$$\text{Standardabweichung der Steigung } s_{b_f} = 1,378 * 10^{-2}$$

$$\text{Standardabweichung des Achsenabschnitts } s_{a_f} = 8,143 \text{ pg/mL}$$

Prüfung auf konstant-systematische Fehler:

Der Vertrauensbereich des Achsenabschnitts beträgt

$$\begin{aligned} \text{VB}(a_f) &= a_f \pm t(f = 3, P = 95 \% \text{ zweiseitig}) * s_{a_f} \text{ mit } t(f,P) = 3,182 \\ &= 4,3 \pm 3,182 * 8,143 \text{ pg/mL} \end{aligned}$$

Damit ergibt sich $-21,6 \text{ pg/mL} \leq a_f \leq 30,2 \text{ pg/mL}$

Dieser Vertrauensbereich schließt den Wert 0 pg/mL ein, somit ist von keinem konstant-systematischen Fehler auszugehen.

Prüfung auf proportional-systematische Fehler:

Der Vertrauensbereich der Steigung beträgt

$$\begin{aligned} \text{VB}(b_f) &= b_f \pm t(f = 3, P = 95 \% \text{ zweiseitig}) * s_{b_f} \\ &= 0,96 \pm 3,182 * 1,378 * 10^{-2} \end{aligned}$$

Damit ergibt sich $0,91 \leq b_f \leq 1,003$

Da der Sollwert $b_f = 1$ eingeschlossen wurde, ergibt sich ebenfalls kein proportional-systematischer Fehler.

Das letzte Akzeptanzkriterium für die Bestimmung der Wiederfindung von Melatonin ist erfüllt.

3.2.4 Linearität

Für die Bestimmung der Linearität wurden Mausserum und Mausplasma mit einer definierten Melatoninkonzentration aufgestockt und dann seriell mit Ausgleichsmatrix verdünnt. Dargestellt sind jeweils die Melatoninkonzentrationen vor dem ersten Verdünnungsschritt und die erwarteten Konzentrationen nach Verdünnung als Sollwerte, die gemessenen Konzentrationen (Istwerte), der Mittelwert \pm SD, die Wiederfindung und daraus dann der Mittelwert, die Standardabweichung und der Variationskoeffizient (Tab. 13 und 14). Die Korrelation zwischen den Soll- und Istwerten im Mausserum und Mausplasma ist in den Abb. 19 A und B sowie 20 A und B wiedergegeben:

Tabelle 13: Daten für Linearität im Mausserum

Verdünnungen	Soll [pg/mL]	Ist \pm SD [pg/mL]	VK [%]	WFR [%]
/	1200	/	/	/
L1	600	501,0 \pm 61,4	12,3	83,5
L2	300	336,0 \pm 7,1	2,1	112,0
L3	150	179,4 \pm 15,5	8,1	114,6
L4	75	80,0 \pm 10,5	12,0	106,7
L5	37,5	47,0 \pm 2,4	5,1	109,6
L6	18,8	25,4 \pm 1,9	7,9	108,5
L7	9,4	8,7 \pm 0,1	0,9	92,6
Mittelwert [%]	/	/	/	103,9
SD [%]	/	/	/	11,4
VK [%]	/	/	/	11,0

A	
Regression	$y = 0,9x + 19,6$
R^2	0,97
Wiederfindungsrate \pm SD [%]	103,9 \pm 11,4
VK [%]	11,0
Bereich [%]	83,5 bis 114,6

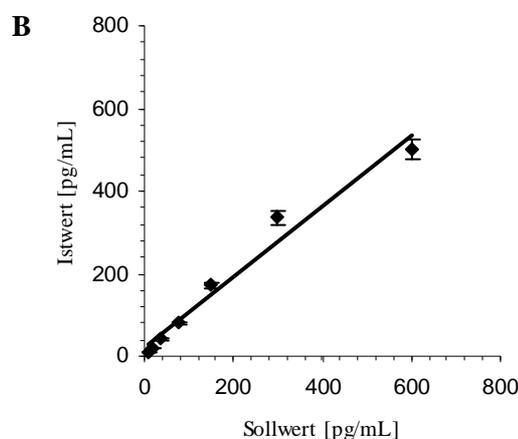


Abb. 19 A und B: Korrelation zwischen Soll- und Istwert für die Linearität im Mausserum

Tabelle 14: Daten für Linearität im Mausplasma

Verdünnungen	Soll [pg/mL]	Ist [pg/mL]	VK [%]	WFR [%]
/	1200	/	/	/
L1	600	509 \pm 1,6	0,3	84,3
L2	300	312,7 \pm 1,6	0,5	104,2
L3	150	167 \pm 3,7	2,2	111,3
L4	75	76,1 \pm 7,1	8,8	101,5
L5	37,5	39,6 \pm 3,9	9,2	105,6
L6	18,8	18,6 \pm 2,1	10,4	98,9
L7	9,4	8,9 \pm 0,8	8,6	94,7
Mittelwert [%]	/	/	/	100,1
SD [%]	/	/	/	8,7
VK [%]	/	/	/	8,7

A

Regression	$y = 0,9x + 15,0$
R^2	0,98
Wiederfindungsrate \pm SD [%]	$100,1 \pm 8,7$
VK [%]	8,7
Bereich [%]	84,3 bis 111,3

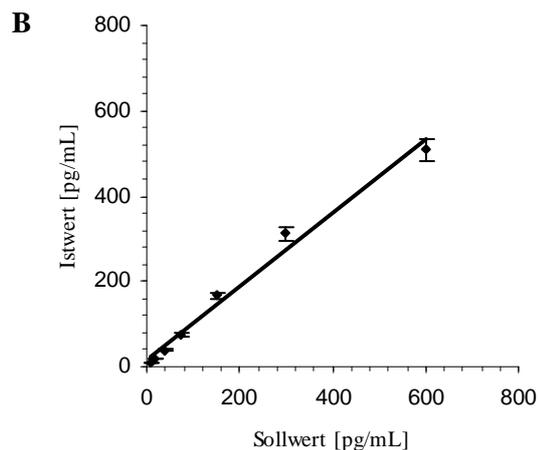


Abb. 20 A und B: Korrelation zwischen Soll- und Istwert für die Linearität im Mausplasma

Die mittlere Wiederfindungsrate im Mausserum ist $103,9 \pm 11,4$ %, zwischen 83,5 und 114,6 %. Der mittlere VK ist 11,0 %. Im Mausplasma ist die mittlere Wiederfindungsrate $100,1 \pm 8,7$ %, zwischen 84,3 bis 111,3 % und einem VK von 8,7 %. Dieses Ergebnis und die ermittelten Regressionsgeraden zeigen, dass der Assay für Mausserum und Mausplasma in dem Bereich von 9,4 bis 1200 pg/mL linear ist. Damit sind die Akzeptanzkriterien für die Linearität erfüllt.

3.2.5 Präzision

a) Intra-Assay-Präzision

Um Streuungen von Analyseergebnissen zu überprüfen wurde die Intra-Assay-Präzision angewendet. Die Durchführungen des RIA erfolgte am selben Tag, wobei die drei Ansätze mit den jeweiligen Proben kurz hintereinander abgearbeitet wurden. In Abb. 21 A und B ist gut zu erkennen, dass die Standardkurven im Verlauf sehr ähnlich und fast kongruent sind.

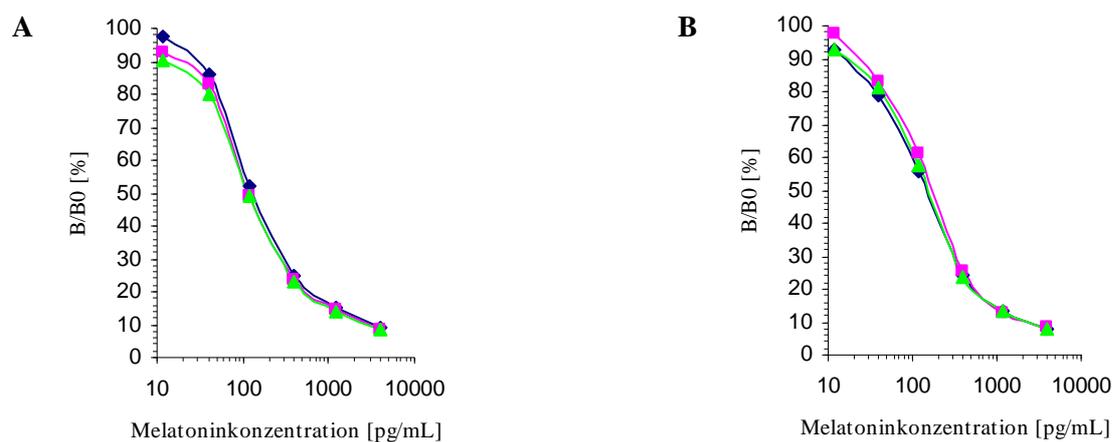


Abb. 21 A und B: Standardkurven für Mausserum und Mausplasma; ■ Set 1, ■ Set 2, ■ Set 3

Tabelle 15: Datentabelle Intra-Assay-Präzision für Melatonin im Mausserum und Mausplasma. Angabe der Mittelwerte aus niedrigen, mittleren und hohen Melatoninkonzentrationen, der Standardabweichung und des Variationskoeffizienten

Probe	Intra-Assay-Präzision, n = 30			
	Mittelwert \pm SD [pg/mL]		VK [%]	
	Mausserum	Mausplasma	Mausserum	Mausplasma
Niedrige Melatoninkonz.	38,0 \pm 5,2	53,1 \pm 4,3	13,7	8,1
Mittlere Melatoninkonz.	64,3 \pm 4,9	95,9 \pm 6,3	7,6	6,6
Hohe Melatoninkonz.	394,7 \pm 28,5	629,1 \pm 34	7,2	5,4

Als erstes wurde überprüft, ob die Ergebnisse zu den einzelnen Melatoninkonzentrationen normalverteilt sind. Dazu wurde überprüft, ob sich der Quotient aus Spannweite [R] und Standardabweichung [s] innerhalb der von David vorgegebenen Grenzwerte befindet.

Aus der Tabelle nach David wurden folgende Werte g_u und g_o entnommen ($P = 99\%$; $n = 30$)

$$g_u = 3,27 \quad \text{mit:} \quad g_u = \text{untere Grenze}$$

$$g_o = 5,26 \quad g_o = \text{obere Grenze}$$

Tabelle 16: Grenzwerte für Mausserum und Mausplasma. Alle PG liegen zwischen der unteren und oberen Grenze. Es kann eine Normalverteilung der Messwerte angenommen werden

	niedrige Melatoninkonzentrationen		mittlere Melatoninkonzentrationen		hohe Melatoninkonzentrationen	
	Mausserum	Mausplasma	Mausserum	Mausplasma	Mausserum	Mausplasma
R	50,3 – 31,8 = 18,5	61,7 – 45,5 = 16,2	75,6 – 55,7 = 19,9	106 – 75,1 = 30,9	454,7 – 324,6 = 130,1	702,5 – 536,6 = 165,9
s	5,2	4,3	4,9	6,3	28,5	34
n	30	30	30	30	30	30
PG	3,6	3,8	4,1	4,9	4,6	4,9

Auffallend stark abweichende Werte vom Mittelwert sollten auf Ausreißer oder zufällige Abweichungen überprüft werden. Dazu wurde der Grubbs-Test angewendet. Alle Werte die $\geq 20\%$ vom Mittelwert abweichen wurden untersucht (Einzelwerte nicht angegeben). Aus der Tabelle nach Grubbs wurde folgender Wert entnommen ($P = 99\%$; $n = 30$) = 3,103.

Überprüfung auf Ausreißer oder Abweichungen im Mausserum und Mausplasma:

Bei den Ergebnissen für Mausserum gibt es für die mittleren und hohen Melatoninkonzentrationen keine auffälligen Abweichungen. Bei der niedrigen Melatoninkonzentration gibt es vier Werte, die genauer überprüft werden sollten, nämlich Wert 1 = 47,6 pg/mL, 11 = 47,7 pg/mL, 19 = 46,1 pg/mL und 20 = 50,3 pg/mL. Bei Mausplasma ist nur Wert 3 bei den mittleren Melatoninkonzentrationen mit 75,1 pg/mL und einer Abweichung von 21,7 % auffällig. Nach der Berechnung wurde folgendes Ergebnis ermittelt:

Tabelle 17: Ausreißer nach Grubbs. Alle Werte für Mausserum sind kleiner als 3,103. Laut Grubbs-Test können diese Werte nicht als Ausreißer deklariert werden. Der Wert 3 für Mausplasma ist tatsächlich größer als 3,103. Laut Grubbs-Test handelt es sich um einen Ausreißer

	Wert 1	Wert 3	Wert 11	Wert 19	Wert 20
Q (Mausserum)	1,846	/	1,865	1,557	2,365
Q (Mausplasma)	/	3,2	/	/	/

Tabelle 18: Zulässige Obergrenze des VK für Mausserum und Mausplasma. Die vorgegebene Spezifikationsgrenze ist: 90 bis 110 %, für t (95 %; $f \rightarrow \infty$) = 1,96

niedrige Melatoninkonzentrationen		mittlere Melatoninkonzentrationen		hohe Melatoninkonzentrationen	
Mausserum $\leq 36,8$ %	Mausplasma $\leq 26,3$ %	Mausserum $\leq 21,7$ %	Mausplasma $\leq 14,6$ %	Mausserum $\leq 7,3$ %	Mausplasma $\leq 5,6$ %

Die zulässige Obergrenze für den VK liegt für Mausserum bei den niedrigen Melatoninkonzentrationen bei $\leq 36,8$ % (bestimmt wurde 13,7 %), für Mausplasma bei $\leq 26,3$ %, (bestimmt wurde 8,1 %). Bei den mittleren Melatoninkonzentrationen bei $\leq 21,7$ % (bestimmt wurde 7,6 %) bzw. bei $\leq 21,7$ % (bestimmt wurde 6,6 %) und für die hohen Melatoninkonzentrationen bei $\leq 7,3$ % (bestimmt wurde 7,2 %) bzw. bei $\leq 5,6$ % (bestimmt wurde 5,4 %). D.h., alle bestimmten VK liegen unterhalb der zulässigen Obergrenze. Mit dem RIA wurden unterschiedliche Melatoninkonzentrationen im Mausserum und Mausplasma jeweils 30 x mit einer Standardkurve bestehend aus Mausserum- bzw. Mausplasma-Ausgleichsmatrix analysiert. Bei der Bestimmung von Melatonin im Mausserum konnte eine gute Übereinstimmung der Standardkurven zwischen den drei Läufen festgestellt werden. Der VK bei den einzelnen Standardpunkten liegt unter 4 %. Durch die Abb. 21 A wird deutlich, dass der Verlauf der Standardkurven fast deckungsgleich ist. Die Messergebnisse zu den unterschiedlichen Melatoninkonzentrationen zeigen eine niedrige Standardabweichung von 5,2, 4,9 und 28,5 pg/mL und dementsprechend einen niedrigen VK von 13,7, 7,6 und 7,2 %. Bei der Überprüfung der Normalverteilung stellte sich heraus, dass alle Werte mit einer Wahrscheinlichkeit von 99 % normalverteilt sind. Auffallend stark abweichende Werte wurden auf Ausreißer überprüft. Mit Hilfe des Grubbs-Test konnte nachgewiesen werden, dass es keine Ausreißer innerhalb der Messergebnisse gibt. Bei der zulässigen Obergrenze des VK stellte sich heraus, dass von den ermittelten VK keiner die Grenze überschreitet. Ähnlich verhielt es sich mit dem RIA zur Bestimmung von Melatonin im Mausplasma mit einer Mausplasma-Ausgleichsmatrix. Auch hier zeigten die Standardkurven aus den drei unterschiedlichen Läufen eine sehr gute Übereinstimmung mit einem VK unter 4 % bei den einzelnen Standardpunkten (Abb. 21 B). Die Analyseergebnisse zu den unterschiedlichen Melatoninkonzentrationen zeigten eine niedrige Standardabweichung von 4,3, 6,3 und 34 pg/mL und dementsprechend einen niedrigen VK von 8,1, 6,6 und 5,4 %. Alle Werte sind mit einer Wahrscheinlichkeit von 99 % normalverteilt. Mit Hilfe des Grubbs-Tests konnte ein Wert als Ausreißer deklariert werden, nämlich Wert 3 aus der Analyse der mittleren Melatoninkonzentrationen mit einer Konzentration von 75,1 pg/mL und einer Abweichung vom Mittelwert von 21,7 %. Nach Eliminieren des Ausreißers ergibt sich ein neuer Mittelwert von 96,7 pg/mL, eine SD von 5 pg/mL und somit ein VK von 5,2 %. Da dieser Ausreißer keinen bedeutenden Einfluss auf die Präzision hat, wurde er nicht entfernt oder durch weitere Messungen ersetzt. Die Akzeptanzkriterien für die Intra-Assay-Präzision sind erfüllt.

b) Inter-Assay-Präzision

Für die Inter-Assay-Präzision ist in Abb. 22 A und B gut zu erkennen, dass die Standardkurven im Verlauf ebenfalls sehr ähnlich und fast kongruent sind.

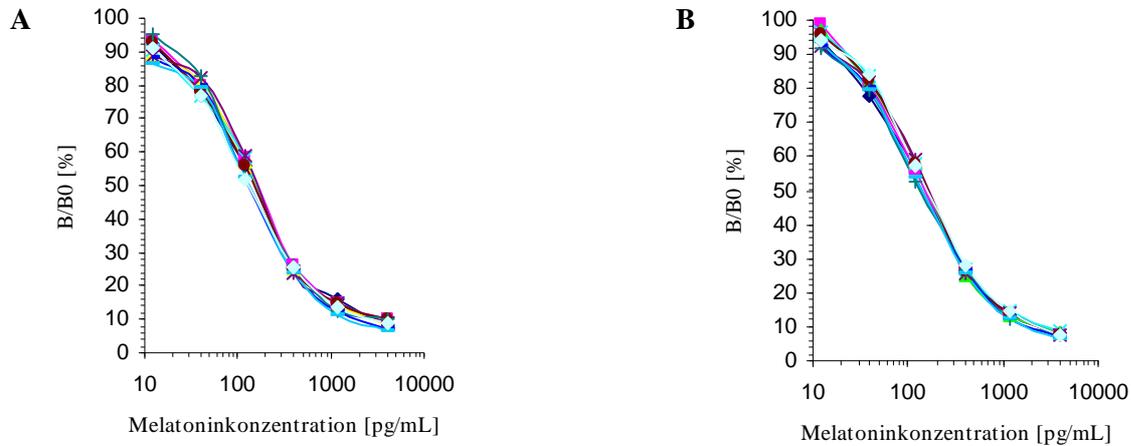


Abb. 22 A und B: Standardkurven für Mausserum (A) und Mausplasma (B) erstellt bei Inter-Assay-Präzision, ■ Set 1, ■ Set 2, ■ Set 3, ■ Set 4, ■ Set 5, ■ Set 6, ■ Set 7, ■ Set 8, ■ Set 9, ■ Set 10

Für die Inter-Assay-Präzision wurde ein Präzisionsprofil mit den mittleren VK über den gesamten Arbeitsbereich erstellt. Es ergaben sich Werte zwischen 2,7 und 13,6 % bei Mausserum (Abb. 23 A) so wie 1,9 und 8,0 % bei Mausplasma (Abb. 23 B). Die zuverlässigsten Ergebnisse befinden sich im Bereich der physiologischen Melatoninkonzentrationen zwischen 12 und 400 pg/ml mit VK von 2,7 bis 3,1 % bzw. 1,9 bis 2,9 %.

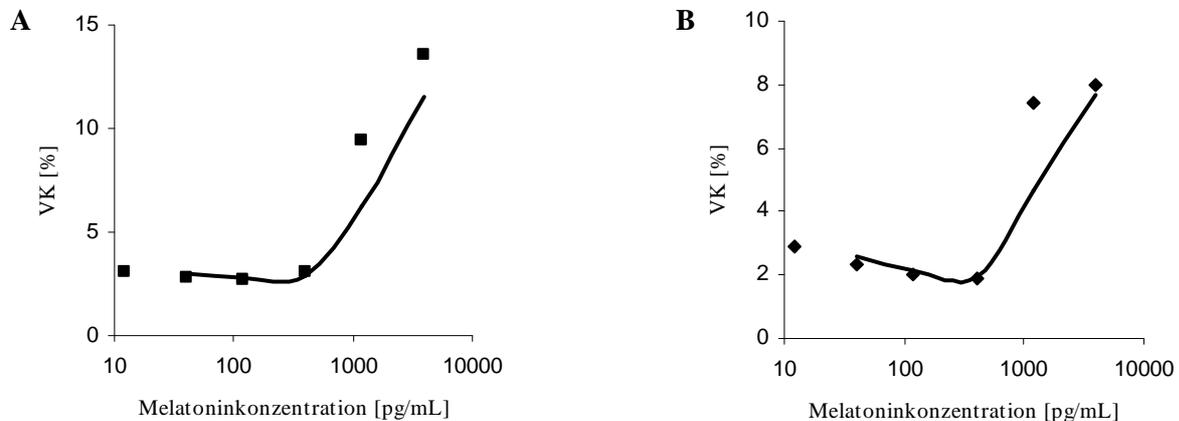


Abb. 23 A und B: Präzisionsprofil für Mausserum (A) und Mausplasma (B)

Mit jeder Standardkurve wurden jeweils 10 mal eine Mausserum- bzw. Mausplasmaprobe mit niedriger, mittlerer und hoher Melatoninkonzentration detektiert (Einzelwerte nicht angegeben). Der Mittelwert, die Standardabweichung und der Variationskoeffizient sind in Tab. 19 angegeben.

Tabelle 19 : Inter-Assay-Präzision für Mausserum und Mausplasma

Probe	Inter-Assay-Präzision, n = 10			
	Mittelwert \pm SD [pg/mL]		VK [%]	
	Mausserum	Mausplasma	Mausserum	Mausplasma
Niedrige Melatoninkonz.	24,2 \pm 6,2	45,6 \pm 6,0	25,6	13,2
Mittlere Melatoninkonz.	61,2 \pm 7,8	90,0 \pm 11,8	12,7	13,1
Hohe Melatoninkonz.	516,0 \pm 56,9	544,6 \pm 33,3	11,0	6,1

Als erstes wurde überprüft, ob die Ergebnisse zu den einzelnen Melatoninkonzentrationen normalverteilt sind. Dazu wurde überprüft, ob sich der Quotient aus Spannweite [R] und Standardabweichung [s] innerhalb der von David vorgegebenen Grenzwert befindet.

Aus der Tabelle nach David wurden folgende Werte g_u und g_o entnommen ($P = 99\%$; $n = 10$)

$g_u = 2,51$ mit: $g_u =$ untere Grenze
 $g_o = 4,24$ $g_o =$ obere Grenze

Tabelle 20: Grenzwerte für Mausserum und Mausplasma. Alle PG liegen zwischen der unteren und oberen Grenze. Es kann eine Normalverteilung der Messwerte angenommen werden

	niedrige		mittlere		hohe	
	Melatoninkonzentrationen	Melatoninkonzentrationen	Melatoninkonzentrationen	Melatoninkonzentrationen	Melatoninkonzentrationen	Melatoninkonzentrationen
R	37,1 – 15,9 = 21,2	56,7 – 38,1 = 18,6	75,6 – 52,5 = 23,1	109,1 – 68,4 = 40,7	587,8 – 432,9 = 154,9	621,4 – 513,7 = 107,7
s	6,2	6,0	7,8	11,8	56,9	33,3
n	10	10	10	10	10	10
PG	3,41	3,1	2,96	3,4	2,72	3,2

Werte, die auffallend stark vom Mittelwert abweichen, sollten auf Ausreißer oder zufällige Abweichungen überprüft werden. Dazu wurde der Grubbs-Test angewendet. Alle Werte die $\geq 20\%$ vom Mittelwert abweichen wurden untersucht (Einzelwerte nicht angegeben).

Aus der Tabelle nach Grubbs wurde folgender Wert entnommen ($P = 99\%$; $n = 10$) = 2,410.

Bei den Ergebnissen zu den hohen Melatoninkonzentrationen im Mausserum gibt es keine auffälligen Abweichungen. Bei der niedrigen Melatoninkonzentration gibt es drei Werte, die genauer überprüft werden sollten, nämlich Wert 2 = 16,9 pg/mL mit einer Abweichung von 30,2 %, Wert 7 = 37,1 pg/mL mit einer Abweichung von 53,3 % und Wert 9 = 15,9 pg/mL mit einer Abweichung von 34,3 %, außerdem Wert 7 bei der mittleren Melatoninkonzentration von 75,6 pg/mL mit einer Abweichung von 23,5 % (Tab. 21). Bei der Bestimmung von niedrigen Melatoninkonzentrationen im Mausplasma ist Wert 6 mit 56,7 pg/mL und einer Abweichung von 24,3 %, Wert 2 mit 68,4 pg/mL und einer Abweichung von 24 %, sowie Wert 6 mit 109,1 pg/mL und einer Abweichung von 21,2 % zu überprüfen (Tab. 21).

Tabelle 21: Überprüfung auf Ausreißer oder Abweichungen im Mausserum und Mausplasma. Die Werte für Mausserum und Mausplasma sind kleiner als 2,410. Laut Grubbs-Test können diese Werte nicht als Ausreißer deklariert werden

Mausserum	Wert 2	Wert 7	Wert 9
Q für niedrige Melatoninkonz.	1,177	2,080	1,338
Q für mittlere Melatoninkonz.	/	1,846	/
Mausplasma	Wert 2	Wert 6	
Q für niedrige Melatoninkonz.	/	1,85	
Q für mittlere Melatoninkonz.	1,830	1,618	

Tabelle 22: Zulässige Obergrenze für Mausserum und Mausplasma. Die vorgegebene Spezifikationsgrenze ist: 90 bis 110 %, für $t(95\%; f \rightarrow \infty) = 1,96$

niedrige Melatoninkonzentrationen		mittlere Melatoninkonzentrationen		hohe Melatoninkonzentrationen	
Mausserum	Mausplasma	Mausserum	Mausplasma	Mausserum	Mausplasma
$\leq 33,3\%$	$\leq 17,7\%$	$\leq 13,2\%$	$\leq 14,1\%$	$\leq 12,6\%$	$\leq 7,5\%$

Für Mausserum bzw. Mausplasma gilt: Die zulässige Obergrenze für den VK liegt bei den niedrigen Melatoninkonzentrationen bei $\leq 33,3\%$ (bestimmt wurde 25,6 %) bzw. bei $\leq 17,7\%$ (bestimmt wurde 13,2 %). Bei den mittleren Melatoninkonzentrationen bei $\leq 13,2\%$ (bestimmt wurde 12,7 %) bzw. bei $\leq 14,1\%$ (bestimmt wurde 13,1 %) und für die hohen Melatoninkonzentrationen bei $\leq 12,6\%$ (bestimmt wurde 11,0 %) bzw. bei $\leq 7,5\%$ (bestimmt wurde 6,1 %). D.h., alle bestimmten VK liegen unterhalb der zulässigen Obergrenze. In Abb. 22 A kann man sehr gut sehen, dass die Verläufe der Standardkurven fast deckungsgleich sind. Die Messergebnisse zu den unterschiedlichen Melatoninkonzentrationen zeigten eine niedrige Standardabweichung von 6,2, 7,8 und 56,9 pg/mL und dementsprechend einen niedrigen VK von 25,6, 12,7 und 11,0 %. Bei der Überprüfung der Normalverteilung stellte sich heraus, dass alle Werte mit einer Wahrscheinlichkeit von 99 % normalverteilt sind. Auffallend stark abweichende Werte sollten auf Ausreißer überprüft werden. Mit Hilfe des Grubbs-Test konnte nachgewiesen werden, dass es keine Ausreißer innerhalb der Messergebnisse gibt. Bei der zulässigen Obergrenze des VK stellte sich heraus, dass von den ermittelten VK keiner die Grenze überschreitet. Auch bei Bestimmung von Melatonin im Mausplasma mit einer Mausplasmaausgleichsmatrix zeigten die Standardkurven aus den unterschiedlichen Läufen eine sehr gute Übereinstimmung (Abb. 22 B). Die Analyseergebnisse zu den unterschiedlichen Melatoninkonzentrationen zeigten eine niedrige Standardabweichung von 6,0, 11,8 und 33,3 pg/mL und dementsprechend einen niedrigen VK von 13,2, 13,1 und 6,1 %. Alle Werte sind mit einer Wahrscheinlichkeit von 99 % normalverteilt. Mit Hilfe des Grubbs-Tests wurden keine Ausreißer innerhalb der Messergebnisse ermittelt. Die Akzeptanzkriterien für die Inter-Assay-Präzision sind erfüllt.

3.2.6 Probenstabilität

Die Ergebnisse aus der Primärmessung im Mausserum mit niedrigen Melatoninkonzentrationen sind 21,0 pg/mL und im Mausplasma 22,9 pg/mL. In Abb. 24 ist sehr gut zu erkennen, dass die Melatoninkonzentrationen im Mausserum als auch im Mausplasma nach den Stressbedingungen nicht

signifikant vom Ausgangswert abweichen. Der gemessene Melatoninkonzentrationsbereich bei den unterschiedlichen Bedingungen liegt für Mausserum bei 19,5 bis 24,9 pg/mL und bei Mausplasma bei 21,5 bis 28,2 pg/mL, mit einem Mittelwert von 22,5 pg/mL bzw. 23,8 pg/mL. Bei der erlaubten Abweichung von 20 % vom Mittelwert wurde ein Bereich von $22,5 \pm 4,5$ pg/mL, also 18,0 bis 27,0 pg/mL, bzw. $23,8 \pm 4,8$ pg/mL, also 19 bis 28,6 pg/mL berechnet. Alle unter Stressbedingungen gewonnen Melatoninwerte liegen innerhalb dieses Bereichs.

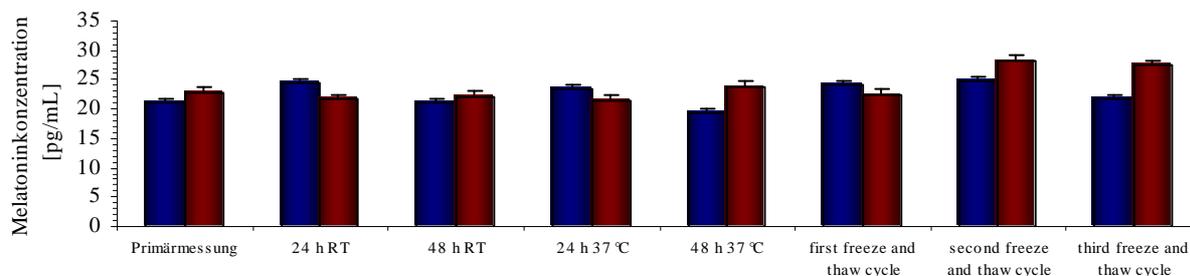


Abb. 24: Probenstabilität in Mausproben mit niedrigen Melatoninkonzentrationen, ■ Mausserum, ■ Mausplasma

Melatonin im Mausserum und Mausplasma bei der mittleren Konzentration ist ebenfalls stabil (Abb. 25). Die Ausgangskonzentration für Mausserum ist 43,7 pg/mL und für Mausplasma 40,3 pg/mL. Der Mittelwert für Melatonin aus allen Messungen ist im Mausserum 38,9 pg/mL mit einem Bereich von 31,7 bis 43,7 pg/mL bzw. 40,9 pg/mL mit einem Bereich von 37,1 bis 47,0 pg/mL im Mausplasma. Bei der erlaubten Abweichung von 20 % wurde für Melatonin im Mausserum ein akzeptabler Bereich von $38,9 \pm 7,8$ pg/mL (31,1 bis 46,7 pg/mL) und für Mausplasma $40,9 \pm 8,2$ pg/mL (32,7 bis 49,1 pg/mL) berechnet. Alle Werte liegen innerhalb des ermittelten Bereichs.

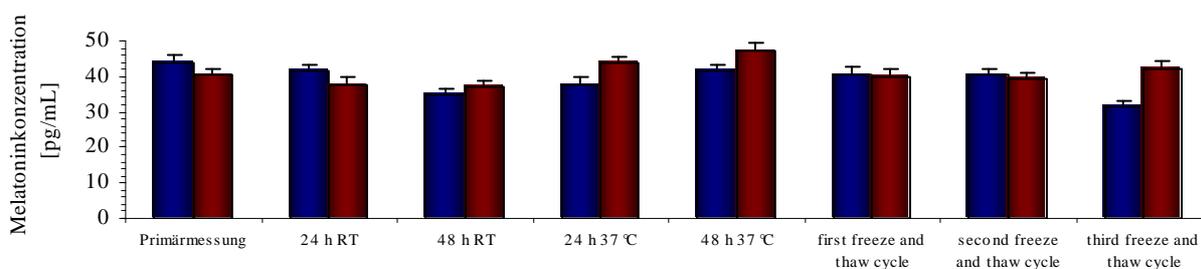


Abb. 25: Probenstabilität in Mausproben mit mittleren Melatoninkonzentrationen, ■ Mausserum, ■ Mausplasma

Auch bei hohen Melatoninkonzentrationen ist kein Abbau oder Verlust des Analyten zu erkennen (Abb. 26). Der Ausgangswert im Mausserum liegt bei 386,6 pg/mL und für Mausplasma bei 388,9 pg/mL. Der Durchschnittswert nach allen Bedingungen liegt dann bei 376,5 pg/mL mit analysierten Melatoninkonzentrationen von mindestens 339,1 pg/mL (nach zweiten Auftauzyklus) und höchstens 438,6 pg/mL (nach 24 h bei RT) bzw. 379,4 pg/mL und Mindestwerte von 329,3 pg/mL (nach 48 h bei RT) und Höchstwerte von 430,5 pg/mL (nach 24 h bei 37 °C). Alle ermittelten Werte liegen im

Akzeptanzbereich mit einer erlaubten Abweichung von 20 %, d.h. für Mausserum $376,5 \pm 75,3$ pg/mL (301,2 bis 451,8 pg/mL) und für Mausplasma $379,4 \pm 75,9$ pg/mL (303,5 bis 455,3 pg/mL).

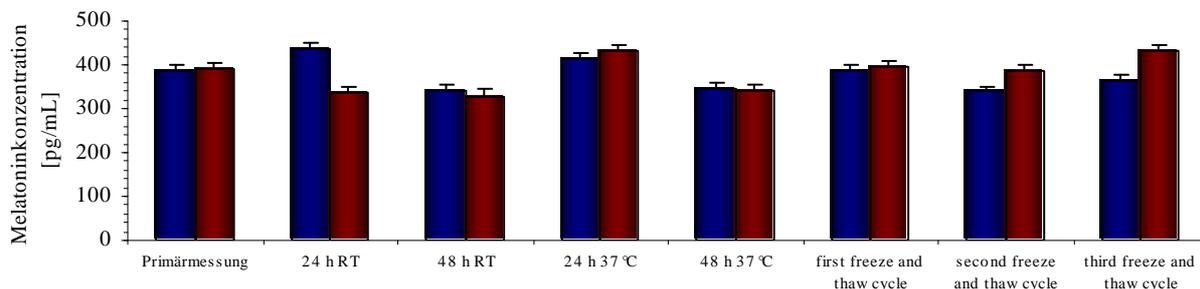


Abb. 26: Probenstabilität in Mausproben mit hohen Melatoninkonzentrationen, ■ Mausserum, ■ Mausplasma

In einem Langzeittest wurden in einem Zeitrahmen von 12 Monaten die Melatoninkonzentrationen im Mausserum und Mausplasma bestimmt. In Abb. 27 sind die Melatoninkonzentrationen, die jeden Monat gemessen wurden, dargestellt. Es ist eindeutig zu erkennen, dass die Ergebnisse über das gesamte Jahr konstant sind.

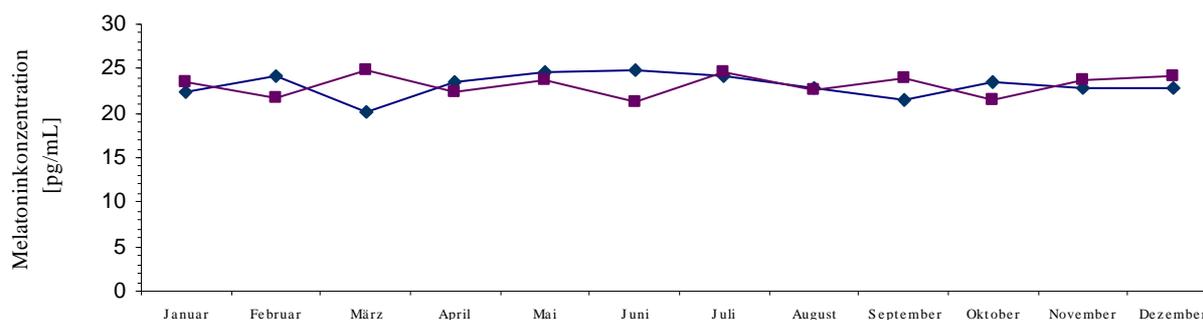


Abb. 27: Stabilität von Melatonin im Mausserum und Mausplasma über 12 Monate, ■ Mausserum, ■ Mausplasma

3.2.7 Robustheit

Für die Aussage, ob der RIA und die Testkitkomponenten robust sind, wurden zwei Testkits beschleunigten Haltbarkeitsprüfungen unterzogen. Zum einen erfolgte die Lagerung bei -20 °C und zum anderen bei 37 °C jeweils für 1 Woche. Als Referenz wurde ein Testkit bei empfohlener Lagerung bei 4 bis 6 °C zurückgestellt. Nach einer Woche erfolgte die Anwendung der Testkits. Der Verlauf der Standardkurven von Testkit 2 und 3 ist nahezu kongruent und identisch mit der Referenzstandardkurve (Abb. 28).

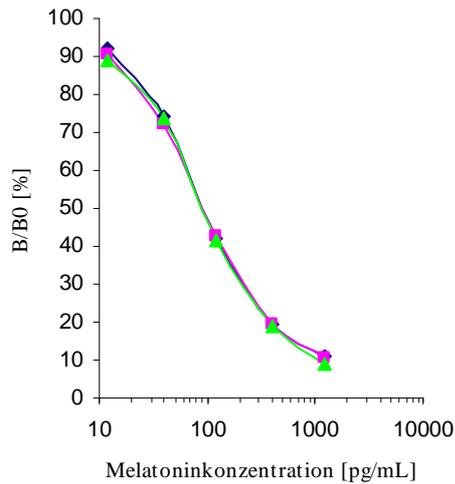


Abb. 28: Standardkurven Melatonin „Direkt-RIA“ ermittelt für Robustheit, ■ Lagerung zwischen 4 bis 6 °C, ■ Lagerung 1 Woche bei -20 °C, ■ Lagerung 1 Woche bei 37 °C

Die Melatoninkonzentrationen bei den mitgelieferten Kitkontrollen sind alle gleich und entsprechen den Sollwerten von 20 bzw. 60 pg/mL (Abb. 29 A). Auch auf die Bindung des Antikörpers hat die beschleunigte Haltbarkeitsprüfung keinen Einfluss. Mit 26,7 bzw. 27,4 % weichen die Ergebnisse nicht von der Bindung von 27 % des Referenzkits ab (Abb. 29 B).

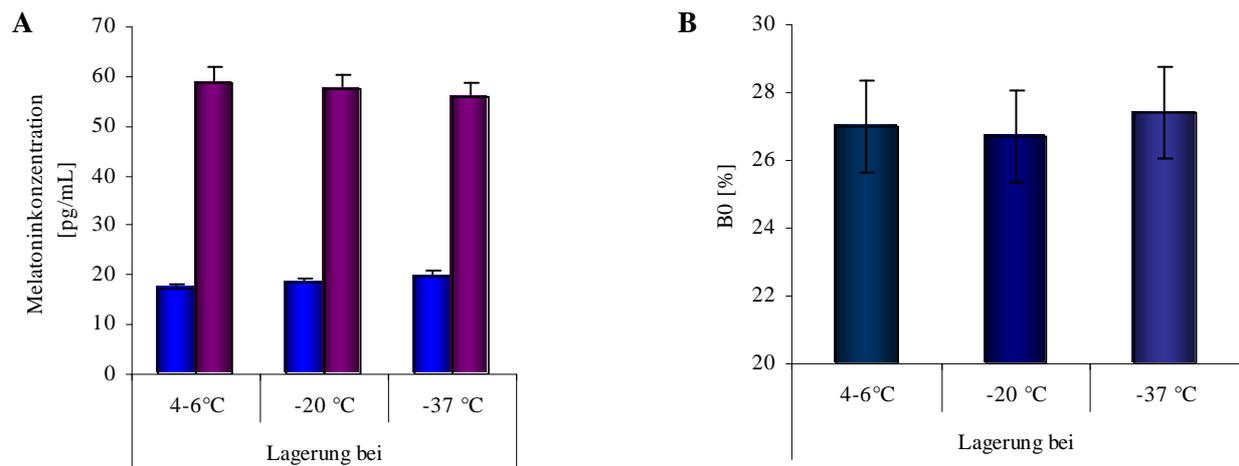


Abb. 29 A und B: Überprüfung der Robustheit des Testkits anhand der Testkitkontrollen ■ K1, ■ K2 (A) und des Antikörpers (B)

3.2.8 Spezifität

Die Ergebnisse zur Spezifität sind in der Tab. 23 zu finden. Keine der melatoninähnlichen Substanzen zeigt eine höhere Kreuzreaktion als 0,1 %. Das Akzeptanzkriterium ist erfüllt.

Tabelle 23: Kreuzreaktion des Melatonin-Antikörpers zu Melatonin und melatoninähnliche Substanzen

Substanzen	Kreuzreaktion [%]
Melatonin	100
N-Acetyl-5-hydroxytryptamin	0,1
5-Methoxytryptophol	0,1
5-Methoxytryptamin	< 0,01
6-Methoxytryptamin	< 0,01
Serotonin	< 0,01
DL-Tryptophan	< 0,01
5-Methoxy-DL-tryptophan	< 0,01
5-Hydroxy-L-tryptophan	< 0,01
6-Hydroxymelatonin	< 0,01
5-Methoxyindol	< 0,01

3.3 Anwendungen

3.3.1 Bestimmung von endogenem Melatonin in unbekanntem Serum- und Plasmaproben von Kontroll-Mäusen und Erstellung eines 24-h Profils

Von 30 Mäusen, aufgeteilt in zwei Gruppen, wurden zu bestimmten Uhrzeiten Serum und EDTA-Plasma abgenommen. In Abb. 30 ist der Verlauf der Melatoninkonzentrationen über 24 h aufgetragen. Die Melatoninwerte sind im Serum und Plasma fast deckungsgleich, ferner ist ein diurnaler Rhythmus des Melatonins mit Tagwerten (von 8 bis 20 Uhr) zwischen 13,8 und 20,6 pg/mL im Mausserum bzw. zwischen 15,0 und 24,1 pg/mL im Mausplasma zu erkennen. Die Nachtwerte (von 20 bis 8 Uhr) liegen im Serum zwischen 13,7 und 55,3 pg/mL und im Plasma zwischen 15,7 und 61,5 pg/mL. Der niedrigste Tagwert ist um 16 Uhr mit 13,8 bzw. 15,0 pg/mL und der höchste Nachtwert um 4 Uhr mit 55,3 bzw. 61,5 pg/mL.

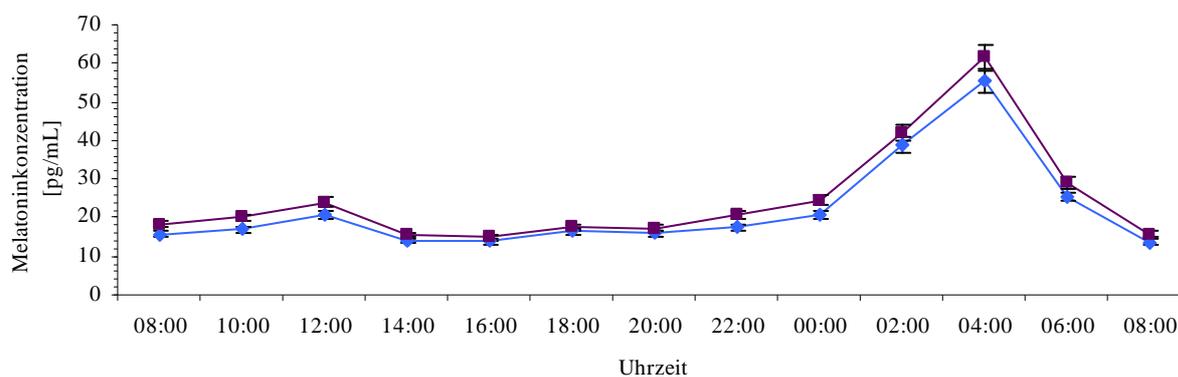


Abb. 30: 24-h Profil von endogenem Melatonin in Mausproben: ■ Mausserum, ■ Mausplasma

Mit dem entwickelten „Direkt-RIA“ ist es also möglich, zwischen Melatoninkonzentrationen in Mausproben zu unterscheiden, die zu verschiedenen Tageszeiten gewonnen wurden.

3.3.2 Flüssig-Flüssig-Extraktion vs. Direkt-Bestimmung

Die Flüssig-Flüssig-Extraktion von Melatonin aus einer angereicherten Protein-freien Standardmatrix sollte zeigen, wie effektiv die einzelnen Lösungsmittel sind. Eine konstante Wiederfindungsrate mit

einem Mittel von 91,4 % und einem VK von 5,3 % ist mit Methanol zu erkennen. Mit Chloroform sinkt die mittlere Wiederfindungsrate auf 81,2 % mit einem VK von 5,0 %, ist aber über den gesamten Aufstockungsbereich konstant. Eine ähnlich hohe Wiederfindungsrate ist mit Dichlormethan, nämlich 82,2 % und einem VK von 15,3 %, erreicht worden. Allerdings steigt die Wiederfindung erst mit Zunahme der Aufstockungskonzentration. Das gleiche ist mit tert. Butylmethylether zu erkennen, hier ist aber generell die Wiederfindung mit 74,3 % und einem VK von 16,2 % viel niedriger. Nur mit Methanol ist eine Extraktion der niedrigsten Aufstockungskonzentration möglich (Abb. 31). Anhand dieses Experiments kann man sehr gut den Extraktionserfolg ohne mögliche Störeinflüsse beobachten.

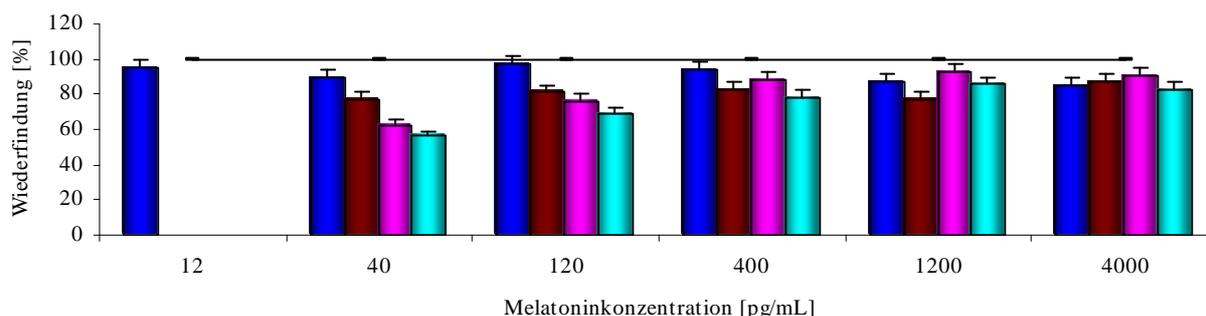


Abb. 31: Extraktion und Wiederfindungsrate von Melatonin aus einer Protein-freien Matrix mit verschiedenen Lösungsmitteln, ■ Methanol, ■ Chloroform, ■ Dichlormethan, ■ tert Butylmethylether

Im Folgenden sind die Ergebnisse zur Wiederfindungsrate von Melatonin im Mausserum und Mausplasma dargestellt (Abb. 32 A und B). Es wurde der „Direkt-RIA“ verwendet und im Vergleich dazu die Flüssig-Flüssig-Extraktion mit den verschiedenen Lösungsmitteln. Die Ergebnisse ermittelt mit dem „Direkt-RIA“ und nach Extraktion mit Methanol lassen sich sehr gut miteinander vergleichen. Die mittlere Wiederfindungsrate für den „Direkt-RIA“ im Mausserum ist 99,0 % mit einem VK von 3,7 % und für Extraktion mit Methanol 97,1 % mit einem VK von 3,9 %, entsprechend für Mausplasma 96,7 % mit einem VK von 3,0 % bzw. 100,7 % mit einem VK von 4,7 %. In den Abb. 32 A und B sieht man eindeutig, dass die Wiederfindungsraten mit dem „Direkt-RIA“ und der Methanol-Extraktion über den gesamten Aufstockungsbereich dicht zusammen liegen. Die Wiederfindungsraten von den anderen Lösungsmitteln zwischen Mausserum und Mausplasma sind ziemlich identisch und sind mit Chloroform 72,4 % mit einem VK von 17,4 % bzw. 77,7 % mit einem VK von 26,3 %; mit Dichlormethan 85,2 % mit einem VK von 16,8 % bzw. 84,2 % mit einem VK von 29,0 %; mit tert. Butylmethylether 73,9 % mit einem VK von 20,7 % bzw. 79,7 % mit einem VK von 20,1 %. Bei diesen Lösungsmitteln nimmt die Wiederfindungsrate mit steigender Aufstockung zu und auch hier sind sie nicht in der Lage, die niedrigen Melatoninkonzentrationen zu extrahieren. Da die Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Methanol die erfolgreichste ist und die Wiederfindungsraten mit denen aus dem „Direkt-RIA“ nahezu identisch sind, kann man von einer zuverlässigen Bestimmung von Melatonin mit dem „Direkt-RIA“ ausgehen.

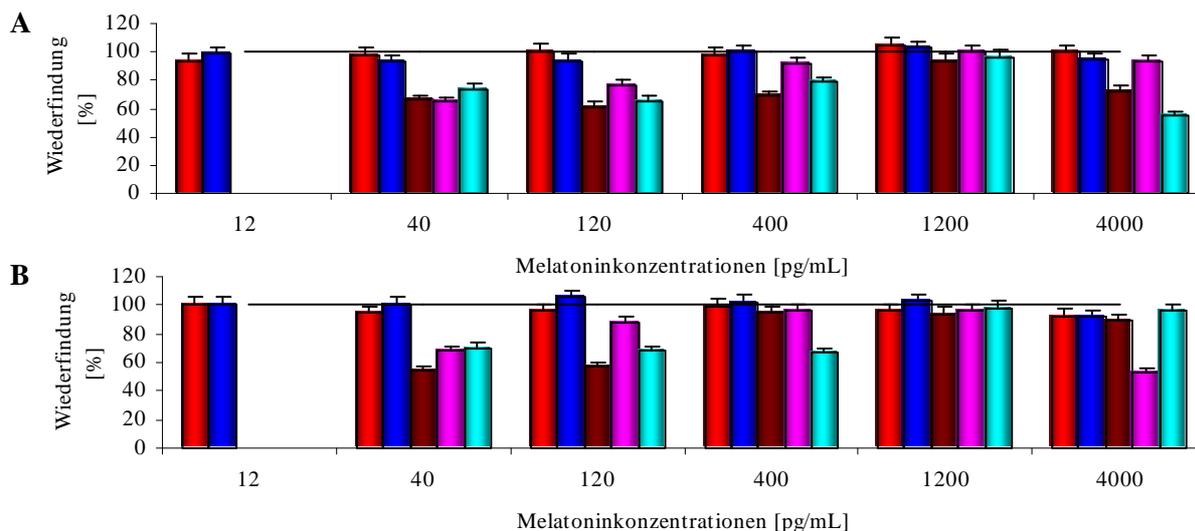


Abb. 32 A und B: Wiederfindungsraten von Melatonin im Mausserum (A) und Mausplasma (B) ermittelt mit und ohne Extraktion. Ein Vergleich zwischen Direkt-Bestimmung und Flüssig-Flüssig-Extraktion, ■ „Direkt-RIA“, ■ Methanol, ■ Chloroform, ■ Dichlormethan, ■ tert. Butylmethylether

3.3.3 Festphasenextraktion vs. Direkt-Bestimmung

Die mittlere Wiederfindungsrate von extrahiertem Melatonin aus einer Protein-freien Standardmatrix ist 92,2 %. Dagegen sind die Wiederfindungsraten von Melatonin nach Extraktion aus einer Mausmatrix etwas niedriger, nämlich im Mausserum 90,7 % und einem VK von 6,6 % und im Mausplasma 90,4 % und einem VK von 5,1 %. Die mittlere Wiederfindung beim „Direkt-RIA“ ist bei Mausserum 95,8 % mit einem VK von 6,7 % und bei Mausplasma 96,0 % mit einem VK von 2,5 %. Bei Betrachtung des nativ vorhandenen Melatonins im Mausserum und Mausplasma beträgt die Konzentration gemessen mit dem „Direkt-RIA“ 38,5 bzw. 34,9 pg/mL. Nach Extraktion ist die Konzentration im Mausserum und Mausplasma allerdings nur 29,9 pg/mL, das bedeutet einen Verlust von ca. 17,0 %. In Abb. 33 sind die Wiederfindungsraten von Melatonin aller Methoden in den unterschiedlichen Matrices grafisch dargestellt.

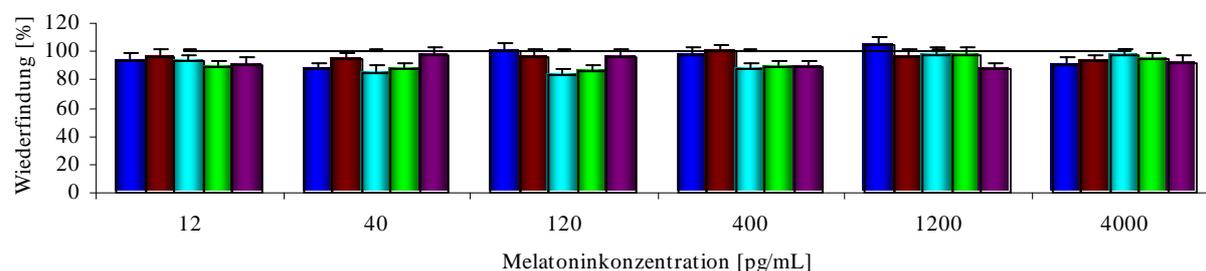


Abb. 33: Wiederfindungsraten von Melatonin. Ein Vergleich zwischen Direkt-Bestimmung und Festphasenextraktion, ■ Direkt Mausserum, ■ Direkt Mausplasma, ■ C₁₈ Octadecyl Mausserum, ■ C₁₈ Octadecyl Mausplasma, ■ C₁₈ Octadecyl Standardmatrix

Die beobachteten Melatoninkonzentrationen bzw. Wiederfindungsraten sind bei allen Methoden ähnlich und liegen in einer vergleichbaren Größenordnung. Allerdings ist die Konzentration des nativ vorhandenen Melatonins in der Probe nach der SPE um ca. 17 % niedriger als mit dem „Direkt-RIA“ analysiert wurde.

3.3.4 Vergleich eines Melatonin 24-h Profils im Serum von Kontroll-Mäusen analysiert mit dem „Direkt-RIA“ sowie mit Methanol- bzw. C₁₈-Extraktion

Für die Flüssig-Flüssig- und zur Festphasenextraktion war von den Mausplasma-Proben aus Versuch 3.1.3 nicht genügend Material vorhanden. Deshalb wurde nur ein 24-h Profil von Melatonin im Mausserum betrachtet. Der Verlauf der beiden Kurven ist kongruent (Abb. 34). Auch hier sind eindeutig niedrige Tag- und hohe Nachwerte zu erkennen. Die Korrelation zwischen „Direkt-RIA“ und Methanol-Extraktion ist $y = 1,1x - 0,9$; $R^2 = 0,98$ (Abb. 35 A). Die analysierten Melatoninkonzentrationen nach einer SPE zeigten ebenfalls niedrige Tag- und hohe Nachwerte (Abb. 34), sind jedoch um ca. 17,0 % niedriger als die vom „Direkt-RIA“. Das entspricht den Erkenntnissen aus dem Versuch 3.3.3. Die Korrelation zwischen den beiden Methoden ist $y = 0,8x - 0,03$; $R^2 = 0,99$ (Abb. 35 B).

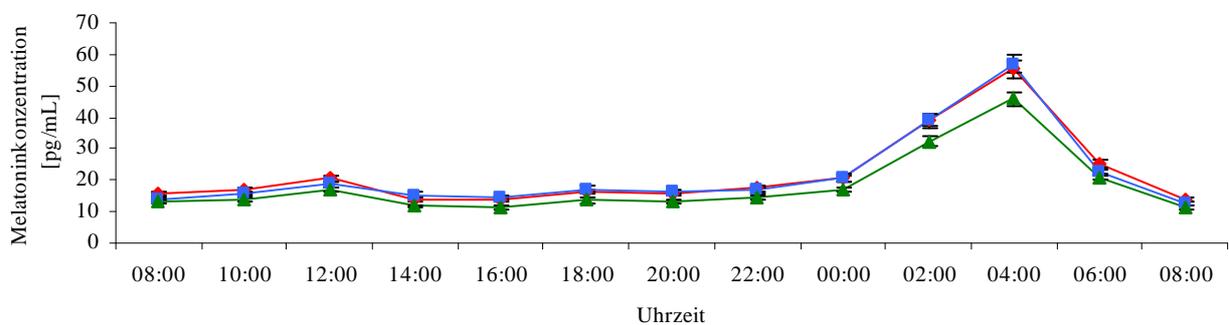


Abb. 34: 24-h Profil von endogenem Melatonin im Mausserum bestimmt mit dem ■ „Direkt-RIA“, ■ Methanol-Extraktion und ■ SPE C₁₈-Extraktion

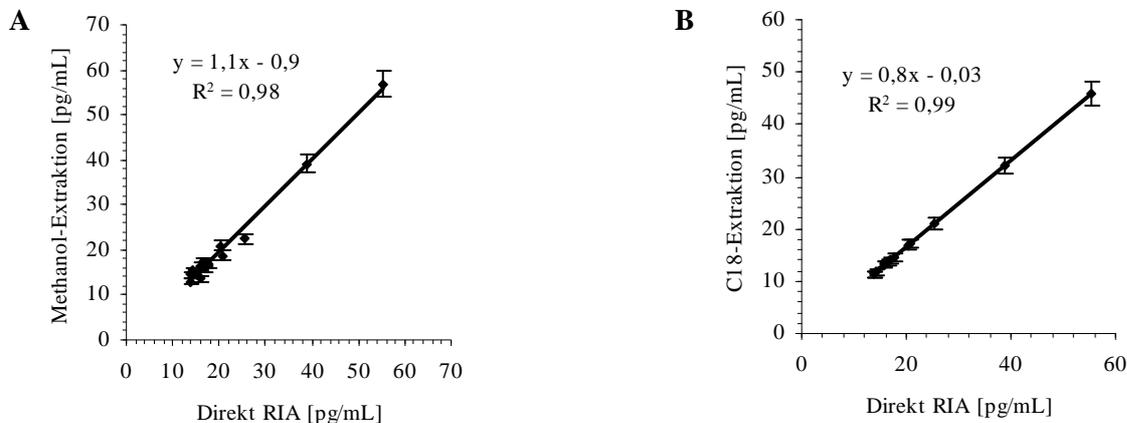


Abb. 35 A und B: Korrelation zwischen „Direkt-RIA“ und Methanol-Extraktion (A) sowie „Direkt-RIA“ und C₁₈-Extraktion (B)

3.3.5 Testvergleich mit einem kommerziell erhältlichem direkt RIA

Für den Testvergleich wurde ein RIA gewählt, der Melatonin ebenfalls direkt ohne Extraktion analysiert. Auffällig sind viel niedrigere Totalcounts, nämlich 14676 cpm gegenüber 66364 cpm. Außerdem ist die NSB mit 2,2 % recht hoch, beim „Direkt-RIA“ nur 0,9 %. Im Vergleichs-RIA wurden nur 5 Standards verwendet mit Konzentrationen von 1, 3, 9, 27 und 81 pg/mL. Außerdem ist ein Probenvolumen von 800 µL notwendig. In der Bedienungsanleitung ist angegeben, dass mit Hilfe eines Probenverdüpfungspuffers die zu bestimmende Probe verdünnt werden kann. Da nicht soviel Serum von den Kontroll-Mäusen zur Verfügung stand, damit aber die Ergebnisse besser vergleichbar

waren, wurden auch hier 50 μL Probenvolumen verwendet und 750 μL Probenverdünnungspuffer zum Ausgleich dazugegeben. Beide Darstellungen eines 24-h Profils von endogenem Melatonin im Mausserum zeigen niedrige Tag- und hohe Nachtwerte (Abb. 36). Allerdings gibt es einen großen Unterschied in den Absolutwerten (Daten nicht angegeben), denn die Melatoninkonzentrationen im Mausserum ermittelt mit dem selbst entwickelten „Direkt-RIA“ sind im Mittel um das 3-fache höher, als die des Konkurrenztestkits.

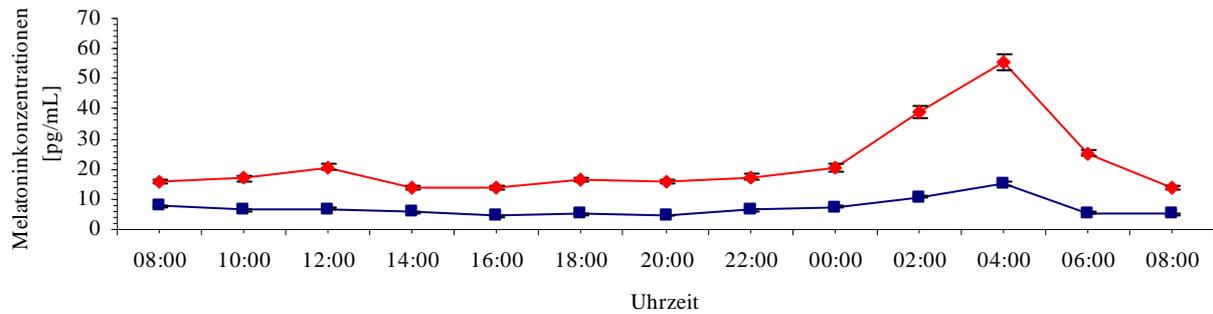


Abb. 36: Vergleich eines 24-h Melatoninprofils ermittelt mit dem ■ „Direkt-RIA“ und einem ■ kommerziell erhältlichem direkt RIA

3.3.6 Bestimmung von Melatoninkonzentrationen bei unterschiedlichen Mauslinien

Beispielhaft wurden mit dem „Direkt-RIA“ die Melatoninkonzentrationen bei unterschiedlichen Mauslinien untersucht. Die Tagwerte bei C57BL und C3H waren 11,5 bzw. 24,6 pg/mL, die Nachtwerte betragen 70,2 bzw. 187,6 pg/mL (Abb. 37 A). Die Melatoninkonzentrationen bei den Tag- und Nachtwerten sind bei den C3H-Mäusen ungefähr doppelt so hoch, als bei den C57BL-Mäusen. Die Melatoninkonzentrationen bei WT, MT1 und MT2 liegen zwischen 165,7 bis 193,0 pg/mL, 153,6 bis 191,3 pg/mL bzw. 85,6 bis 105,6 pg/mL, steigen nachts aber auf Höchstwerte von 300,0, 330,9 bzw. 311,5 pg/mL an (Abb. 37 B). Mit dem „Direkt-RIA“ ist es möglich, bei unterschiedlichen Mauslinien niedrige Tag- und hohe Nachtwerte zu erfassen.

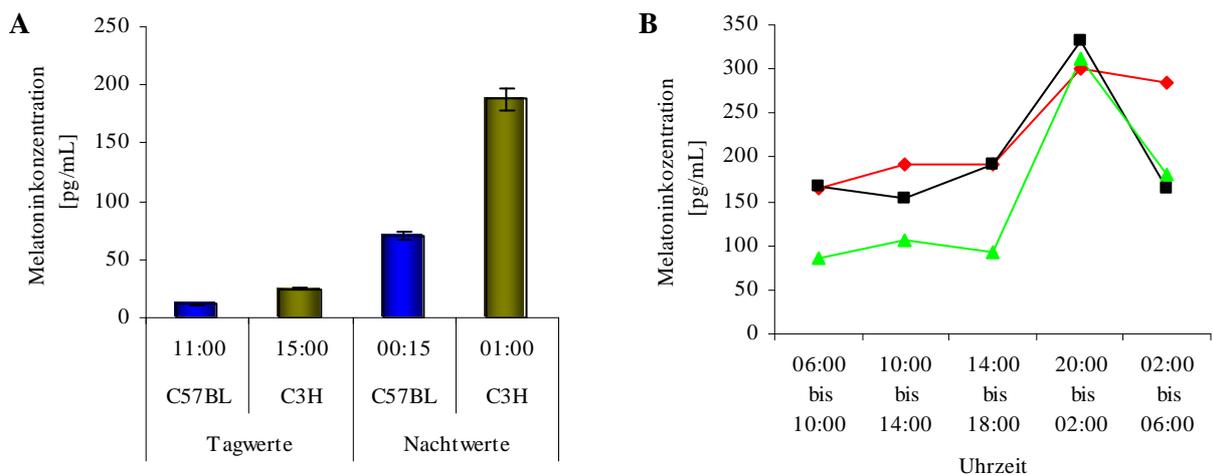


Abb. 37 A und B: Melatoninkonzentration im Plasma zu Tag- und Nachtzeiten bei ■ C57BL- und ■ C3H-Mäusen (A) und bei ■ WT-, ■ MT1- und ■ MT2-Mäusen (B)

4. Diskussion

Zu Beginn der Entwicklung eines validen RIA zur Bestimmung von Melatonin in Mausproben stand die Frage, wie sich die unterschiedliche Zusammensetzung zwischen Standards und Probenmatrix und somit die Beeinflussung auf Messergebnisse verringern ließe. Die Gesamtbindung (B_0) ist in Protein-freien Systemen, im Vergleich zur Messung in Gegenwart von Plasma- oder Serumproteinen, stets wesentlich höher. D.h., die Verwendung von Standards mit einer zur Probenmatrix unterschiedlichen Zusammensetzung beeinflusst die Messergebnisse ganz erheblich. Das gilt besonders für niedrige Melatoninkonzentrationen, da hier bereits kleine Änderungen in der Gesamtbindung starke Veränderungen im Messergebnis hervorrufen. Dieses Problem wird mit der so genannten Ausgleichsmatrix gelöst. Sie wird aus der gleichen Matrix hergestellt, in der sich auch der Analyt befindet. Melatonin wird durch Adsorption mit Aktivkohle entfernt. Die Melatonin-freie Flüssigkeit wird dann als Ausgleichsmatrix bei der Standardkurve verwendet, um den Unterschied zur Probenmatrix auszugleichen. Mit der hergestellten Ausgleichsmatrix wurde eine Standardkurve erstellt und die Totalcounts [cpm], die Nicht-Spezifische-Bindung [%], absolute Bindung [%] und die Standardkonzentrationen [%] miteinander verglichen. Die ermittelten Ergebnisse zu den angegebenen Punkten sind nahezu identisch und erfüllen insgesamt die festgelegten Anforderungen. Anhand dieser Daten war aber nicht eindeutig festzustellen, ob sich die Mausserum- und Mausplasma-proben als Ausgleichsmatrix eignen. Bei einer Vorher- sowie Nachherbestimmung der Melatoninkonzentrationen stellte sich heraus, dass durch die Aktivkohlebehandlung bei Mausserum bzw. Mausplasma mehr als 90 % des Melatonins entfernt werden konnte. Nur bei Mausserum 2 wurde noch eine Restkonzentration gemessen. Die unvollständige Adsorption lag daran, dass die endogene Melatoninkonzentration im Mausserum mit Abstand am höchsten war und somit die Menge der Aktivkohle nicht ausreichte. In solchen Fällen ist es ratsam, die Adsorption zu wiederholen. Ein Einfluss der Aktivkohlebehandlung auf die ausgewählten Blutmerkmale Gesamtbilirubin, Totalprotein und Triglyceride kann ausgeschlossen werden, da zwischen den Werten vor und nach Adsorption kein signifikanter Unterschied besteht. Das bedeutet, dass die Zusammensetzung der Ausgleichsmatrix unwesentlich verändert wird [Carter, 1978], wie der Vergleich zu Referenzwerten von zwei verschiedenen Mauslinien zeigt. Ob die hergestellte Ausgleichsmatrix der unbekanntenen Probenmatrix ähnlich ist und somit die detektierten Melatoninkonzentrationen richtig sind, wurde durch ein Spiking-Experiment gezeigt. Bei allen aufgestockten Mausproben, ob unbehandelt oder behandelt, konnte mit den entsprechenden Ausgleichsmatrizes eine sehr gute Wiederfindungsrate ermittelt werden. Insbesondere überzeugen die Ergebnisse von Mausserum 1 und Mausplasma 2 mit einer Wiederfindungsrate von nahezu 100 %, einer niedriger Standardabweichung von < 5 % und einem niedrigen Variationskoeffizienten von < 8 %. Die Wiederfindungsrate bei einer Aufstockung mit 4000 pg/mL war nicht zu bestimmen, weil dieser Wert außerhalb des linearen Bereichs der Standardkurve liegt. Mit Hilfe der Wiederfindungsrate konnte die Auswahl der Ausgleichsmatrix erleichtert und die Richtigkeit der Messung bewertet werden. Die betrachteten Experimente zeigen, dass sich mit der

Herstellung einer Mausegleichsmatrix die Unterschiede zwischen Probenmatrix und Standards und somit die Beeinflussung der Messergebnisse verringern lassen. Frühere Immunoassays benötigten einen aufwendigen Extraktionsschritt und ein hohes Probenvolumen. Mit der vorgestellten Methode ist es möglich, Melatonin in Mausproben direkt und mit einem geringen Probenvolumen zu bestimmen.

Die Gewinnung eines brauchbaren Antikörpers gegen Melatonin ist essentiell für den RIA. Wie sich auch im Laufe der Arbeit herausstellte, ist es mit dem vorgestellten Verfahren gelungen, einen sensitiven und spezifischen Antikörper mit einer guten Affinität zum Antigen zu generieren. Bei der Herstellung des Immunisierungskonjugates wurde 5-Methoxytryptamin mit der Carbodiimidmethode an BSA gebunden [Arendt et al., 1975; Manz et al., 1989]. Die Haptendichte im Immunogen scheint ein maßgeblicher Faktor für die erfolgreiche Immunisierung zu sein. Eine möglichst hohe Belegungsichte des Trägerproteins ist vorteilhaft, da die antigene Determinante des Trägers durch das Hapten abgeschirmt wird. Eine zu hohe Konzentration kann hingegen zur Immuntoleranz führen, so dass keine Antikörper mehr gebildet werden [Tijssen, 1987]. Eine Methode zur Charakterisierung des Immunogens in Bezug auf die Belegungsichte stand nicht zur Verfügung. Für den RIA musste ein optimaler Titer eingestellt werden. Die Höhe des Titers ist kein Qualitätsmerkmal, gibt aber die Menge des eingesetzten Antikörpers an. Man sollte einen hohen Titer anstreben, weil man dadurch eine höhere Materialausbeute erreicht. Anhand der guten Abstufung der Bindungsverhältnisse bei den Standards im Bereich niedriger, als auch hoher Konzentrationen, und der guten Bindung B_0 [%] wurde der optimale Antikörpertiter für den RIA bei 1:5000 zur Detektion von Melatonin in Mausproben gewählt. Eine Möglichkeit zur Erhöhung der Antikörpertiter könnte ein höherer Anteil an Hapten im Immunogen sein. Andere RIA verwenden Antikörper mit niedrigeren Titern, z.B. 1:500 [Arendt et al., 1977], 1:2000 [Geffard et al., 1982] oder 1:4000 [Wurzburger et al., 1976]. Wie auch später im Rahmen der Validierung herausgestellt wird ist der gewonnene polyklonale Antikörper im Vergleich zu einem monoklonalen Antikörper (Arbeitsbereich von 10 ng/mL bis 10 µg/mL) wesentlich sensitiver [Soukhtanloo et al., 2008]. Auch die Bestimmung der Spezifität hat gezeigt, dass ein geeigneter Antikörper gegen Melatonin gefunden wurde.

Für die Bestimmung des Gesamt-Melatonins sind Radioimmunoassays mit den unterschiedlichsten Probenvorbereitungsmethoden beschrieben. Etabliert haben sich dabei die Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Methanol, Chloroform und Dichlormethan [Vieira et al., 2000] und die Festphasenextraktion [Rizzo et al., 2002]. In dieser Arbeit sollen alternative Methoden für die Bestimmung des Gesamt-Melatonins vorgestellt werden. Als Proteinfällungsreagenzien standen TCA und 5-Sulfosalicylsäure Dihydrat zur Verfügung und zum anderen das Enzym Pepsin. Für die Detektion von Melatonin in den Proben ist eine ideale Standardkurve Voraussetzung. Aus diesem Grund wurden die drei Standardkurven einschließlich der absoluten Bindung B_0 miteinander verglichen. Bei allen drei Methoden liegt die absolute Bindung des Antikörpers bei ca. 30 % des markierten Antigens, das in Abwesenheit von unmarkiertem Antigen an den Antikörper gebunden wurde. Bei den Standardkurven,

behandelt mit den Proteinfällungsreagenzien, liegen die prozentualen Bindungen der niedrigen Standardkonzentrationen, d.h. im Bereich von 12 bis 120 pg/mL, sehr dicht zusammen. Erst bei höheren Konzentrationen wird die Abstufung bzw. Trennschärfe zwischen den Standardpunkten größer. Insbesondere bei der Bestimmung von niedrigen Melatoninkonzentrationen wie z.B. Tagwerten ist das von Nachteil. Bei der Verwendung von Pepsin zeigt die Standardkurve einen idealtypischen sigmoiden Verlauf mit klar getrennten Standardpunkten. Mit dieser Standardkurve lassen sich niedrige Melatoninkonzentrationen sehr gut bestimmen. Die Richtigkeit der Gesamt-Melatonin-Bestimmung wurde mit der Wiederfindungsrate überprüft und liegt mit den Proteinfällungsreagenzien zwischen 82 und 86 %. Das bedeutet einen maximalen Verlust von ca. 18 %. Der Grund des Verlustes liegt an der aufwendigeren Vorbereitung und den damit verbundenen Pipettierschritten, aber auch daran, dass mit den Fällungsreagenzien nicht alle Proteine präzipitiert und somit das Melatonin nicht freigesetzt wurde. Mit Pepsin wird eine Wiederfindungsrate von 97,8 bzw. 99,6 % erreicht. Anhand dieser Ergebnisse kann gezeigt werden, dass die Probenvorbereitung zur Bestimmung des Gesamt-Melatonins mit Pepsin wesentlich einfacher und effektiver ist. Zur Überprüfung der gewählten Methode wurde Melatonin in Mausproben mit und ohne Enzymschritt analysiert. Das Ergebnis bestätigt die Angaben in der Literatur, dass nämlich ca. 60 bis 70 % des Melatonins reversibel an Albumine gebunden sind, mit Pepsin aber freigesetzt werden [Cardinali, 1972; Di et al., 1998]. Verschiedene Prozeduren für die selektive Extraktion von freiem und totalem Melatonin im Serum und Plasma wurden entwickelt. Die Festphasenextraktion, Flüssig-Flüssig-Extraktion, auf die im Laufe der Diskussion noch eingegangen wird und die in dieser Arbeit beschriebenen Proteinfällungsmethoden mit TCA und 5-Sulfosalicylsäure Dihydrat, zeigen eine niedrige „Richtigkeit“. Die einfache Probenvorbereitung mit Pepsin ermöglicht eine wesentlich effektivere Methode als die, die in der Literatur bisher beschrieben wurden und ist sehr gut geeignet das Gesamt-Melatonin in Mausproben zu bestimmen. Aufgrund der Tatsache, dass dieser Test das gesamte Melatonin erfasst, werden im Vergleich zu anderen Testsystemen höhere Werte gefunden.

Die meisten RIA zur Bestimmung von Melatonin verwenden [^3H]-Melatonin als Tracer [Fraser et al., 1983; Vakkuri et al., 1984; Webley et al., 1985; Plebani et al., 1990]. Mit [^3H]-Melatonin ist aber nur eine niedrige spezifische Aktivität erreichbar und die Markierungsmethode ist kompliziert. Inzwischen wird [^{125}I] bevorzugt wegen der niedrigen Energie (Messung mit höherer Effizienz), der geringen Radiolyse und der geringeren Gefährlichkeit bei der Handhabung. In dieser Arbeit ist die Konjugierung mit einem markierten Ester, [^{125}I]-Bolton-Hunter-Reagenz, als Markierungsmethode beschrieben. Der aktive Ester acetyliert Aminoendgruppen mit dem iodierten p-Hydroxyphenylpropionrest, was dies zu einem effektiven Verfahren zur Einführung radioaktiven Iods in eine Vielzahl verschiedener Proteine, Peptide und Moleküle mit Amino-Gruppen macht. Es handelt sich dabei um ein nicht-oxidatives Verfahren, das weniger aggressiv ist als alternative Methoden wie z.B. die Chloramin-T Methode. Eine [^{125}I]-Markierung ist häufig auch dann noch möglich, wenn eine Tritiiierung methodischen Schwierigkeiten begegnet. Für eine korrekte und richtige Analyse ist eine

reproduzierbare Markierung von Melatonin sehr wichtig. Zur Überprüfung einer wiederholbaren Markierung wurden Tracer sowohl direkt nach der Markierung als auch kurz vor Ablauf miteinander verglichen. Bei beiden Chargen, sowohl direkt nach der Markierung als auch nach 105 Tagen, verhielten sich die Bindung B_0 des Antikörpers als auch der Verlauf der Standardkurve identisch. Das bedeutet, dass eine gleichmäßige Konkurrenz, also Konkurrenz zwischen markierten und unmarkierten Antigen um die Bindungsstelle des Antikörpers, stattfindet. Die Messdauer beim RIA von 1 min wurde konstant beibehalten und zeigt, dass die gleiche Menge an radioaktiven Iod eingebaut wird und die gleichmäßige spezifische Aktivität gegeben ist. Damit wird verhindert, dass hochmarkierte Verbindungen entstehen, die weniger stabil sind und die molekulare Struktur zerstören und damit zum Verlust des Bindungsvermögens am spezifischen Antikörper führen.

Für das in dieser Arbeit beschriebene Verfahren zur Detektion von Melatonin in Mausproben handelt es sich um ein so genanntes in-house-Verfahren, das im Labor ausgearbeitet wurde und das in Normen oder offiziellen Methodensammlungen nicht zu finden ist. Um zu beweisen und sicherzustellen, dass das Analysenverfahren plausible, reproduzierbare und verlässliche Resultate liefert, wurden folgende Validierungsparameter untersucht, die nachfolgend diskutiert werden sollen.

1. Typische Standardkurve und Arbeitsbereich

Der Arbeitsbereich ist der Konzentrationsbereich des Analyten in der Probe (untere/obere Grenze) mit einem akzeptablen Maß an Präzision, Richtigkeit und Linearität. Jede Kalibrierung beginnt mit der Wahl des Arbeitsbereichs. Dieser richtet sich nach dem praxisbezogenen Anwendungsziel. Bei der Bestimmung von Melatonin in verschiedenen Mauslinien sind unterschiedlich hohe Melatoninkonzentrationen zu erwarten. Aus diesem Grund wurde ein Arbeitsbereich von 12 bis 4000 pg/mL gewählt. Dieser weite Arbeitsbereich bietet gegenüber anderen Immunoassays mit schmalen Konzentrationsbereichen z.B. RIA mit 46 bis 1000 pg/mL [Wetterberg et al., 1978], 2 bis 1000 pg/mL [Webley et al., 1985] oder 5,5 bis 700 pg/mL [Sieghart et al., 1987] aber auch gegenüber ELISA mit 39 bis 1500 pg/mL [Chegini et al., 1995] einen großen praktischen Vorteil, da es möglich ist, sowohl niedrige als auch hohe Melatoninkonzentrationen in Mausproben zu detektieren. Zur Festlegung des Standardbereichs wurden für Mausserum und für Mausplasma zehn Standardkurven mit dem angegebenen Standardkonzentrationsbereich erstellt. Die Berechnung ergab eine steile sigmoid verlaufende Standardkurve mit eindeutig voneinander unterscheidbaren Standardpunkten, die auch die Messung von geringen Melatoninkonzentrationsunterschieden möglich macht. Die höchste Genauigkeit wird in der Nähe des in der Mitte liegenden Wendepunktes der sigmoiden Kurve erreicht, da an dieser Stelle ihre Steigung am größten ist. Die geringste Genauigkeit entsteht in der Nähe ihrer Asymptoten [Strobach, 1994]. Die obere Asymptote liegt ungefähr bei 12 pg/mL und die untere Asymptote bei 1200 pg/mL. Zwischen den beiden Asymptoten hat die Kurve ihre größte Steigung, und genau in diesem Bereich werden die zu analysierenden Melatoninkonzentrationen erwartet. Wie sich auch in späteren Untersuchungen herausstellen wird wurden die Anforderungen an die Standardkurve, nämlich ein weiter Arbeitsbereich, ein steiler Verlauf mit eindeutig voneinander

unterscheidbaren Standardpunkten und einen linearen Bereich in dem die zu erwartenden Melatoninkonzentrationen fallen, erfüllt.

2. Nachweisgrenze

Im Mausserum liegt die Nachweisgrenze bei 9,1 pg/mL und im Mausplasma bei 7,3 pg/mL. Das bedeutet, bei dieser Grenze liegt die kleinste noch qualitativ erfassbare Konzentration des Analyten vor. Die Nachweisgrenze eines Analysenverfahrens ist dann von Interesse, wenn eine Substanz in ganz geringen Mengen in einer Matrix analysiert werden soll. Bei der Bestimmung von Melatonin bei verschiedenen Mauslinien werden aber unterschiedlich hohe Melatoninkonzentrationen erwartet, die größer als 9,1 bzw. 7,3 pg/mL sind. Diese Tatsache wurde bei der Festlegung des Arbeitsbereichs berücksichtigt. Aus diesem Grund wurde ein weites Spektrum für die Analyse von Melatonin in Mausproben gewählt. Da nur ein Probenvolumen von 50 µL nötig ist, wurde ein sensitiver RIA für die Bestimmung von Melatonin angeboten. Insbesondere bei niedrigen Probenvolumina hat dieser „Direkt-RIA“ Vorteile gegenüber anderen, bei denen ein sehr viel höheres Volumen nötig ist, z.B. 1 mL [Vakkuri et al., 1984; Lahiri et al., 2004], 200 µl [Vaughan, 1993], 250 µl und einer Sensitivität von 10 pg/mL [Webley et al., 1985; Klupiec et al., 1997]. Aber auch zu anderen Methoden hat der „Direkt-RIA“, z.B. zur GC/MS mit 2 mL Probe und einer Sensitivität von 10 pg/mL [Wilson et al., 1977] oder HPLC mit 2 mL Probe und einer Sensitivität von 2,6 pg/mL [Peniston-Bird et al., 1993] einen entscheidenden Vorteil.

3. Wiederfindungsrate

Die Wiederfindungsrate ist das Verhältnis der Menge eines Analyten, der vor der Probenvorbereitung zu einer Probe hinzugefügt wird und der Menge dieses Analyten, die als Messergebnis gefunden wird. Mit Hilfe der Wiederfindungsrate soll die „Richtigkeit“ der Methode nachgewiesen werden. Dabei wurden einer Realprobe im Aufstockungsverfahren steigende Mengen des Analyten zugesetzt und die wiedergefundene mit der eingesetzten Menge verglichen. Für Melatonin im Mausserum wurde eine mittlere Wiederfindungsrate von $108,0 \pm 5,1$ % und im Mausplasma von $99,3 \pm 5,9$ % ermittelt. Tendenziell wurde mehr Melatonin im Mausserum wiedergefunden als theoretisch enthalten sein dürfte. Da sich die höhere Wiederfindung über den gesamten Aufstockungsbereich erstreckt ist von einem geringfügigen Fehler bei der Aufstockung auszugehen, der keinen Einfluss auf die Feststellung der „Richtigkeit“ hat. Die festgelegten Akzeptanzkriterien für den Gesamtmittelwert der Wiederfindungsrate zwischen 80 und 120 % und ein Variationskoeffizient < 20 % sind bei beiden Proben erfüllt. In beiden Mausproben ist die Korrelation zwischen Soll- und Istwert sehr gut (Korrelationskoeffizient: 0,99). Die Regressionsgerade für Mausserum beträgt $y = 1,1x - 9,8$ und für Mausplasma $y = 0,9x + 4,3$. Aufgrund der guten Wiederfindungsrate von Melatonin in den Mausproben hat es während des gesamten Verfahrens keine Verluste des Analyten gegeben. Sowohl zur Überprüfung einzelner Verfahrensschritte als auch zur Feststellung eines Matrixeffekts eignet sich die Berechnung der Wiederfindungsfunktion, die es erlaubt, systematische (konstant- sowie proportional-systematische) Abweichungen aufzudecken. Bei konstant-systematischen Abweichungen

ist der Fehler unabhängig von der Konzentration der analysierten Komponente, was zu einer Parallelverschiebung der Kalibriergeraden führt. Bei proportional-systematischen Fehlern ist die Größe des Fehlers abhängig von der Konzentration der analysierten Komponente. Dies führt zu einer Änderung der Steigung der Kalibriergeraden. Bei der Prüfung auf konstant- und proportional-systematische Fehler wurde im Mausserum anhand der Regressionsgerade festgestellt, dass diese leicht auf dem y-Achsenabschnitt in den negativen Bereich verschoben und die Steigung leicht verändert ist. Dies ist ebenso für Mausplasma erkennbar, hier ist die Regressionsgerade leicht in den positiven Bereich verschoben und in der Steigung minimal verändert. Da Messwerte in jedem Fall zufällige Fehler aufweisen, d.h. einer Streuung unterliegen, ergeben sich als Achsenabschnitt und Steigung der Wiederfindungsfunktion niemals Idealwerte, also $a_f = 0$ und $b_f = 1$. Trotzdem konnte hier gezeigt werden, dass die Wiederfindungsrate von Melatonin, ermittelt mit einer Mausserum- bzw. Mausplasmaausgleichsmatrix, sehr gut ist. Bei der Überprüfung der systematischen Fehler wurden keine Abweichungen entdeckt. Es kann also davon ausgegangen werden, dass keine Matrixeinflüsse vorliegen. D.h., das Analysenverfahren ist ausreichend spezifisch und die Melatoninkonzentrationen werden richtig in den Mausproben mit den entsprechenden Mausegleichsmatrizen bestimmt. Zusätzlich lässt sich anhand der Wiederfindungsrate erkennen, dass mit Hilfe der eingeführten Ausgleichsmatrix der Unterschied zur Probenmatrix sehr gut ausgeglichen werden kann.

4. Linearität

Diese wird geprüft, indem eine Serum- oder Plasmaprobe mit hoher Melatoninkonzentration in definierten Schritten seriell verdünnt wird, um nachfolgend bestimmen zu können, ob die gemessenen Werte den Gesetzen der Linearität folgen. Der Untersuchungsbereich für die Linearität liegt zwischen 9,4 pg/mL und 1200 pg/mL. Im Mausserum ist die Wiederfindung der Melatoninkonzentration nach Verdünnung über alle Verdünnungsschritte konstant. Die mittlere Wiederfindungsrate beträgt 103,9 %. Der Korrelationskoeffizient zwischen Soll- und Istwert beträgt 0,97, die Regressionsgerade ist $y = 0,9x + 19,6$. Für Melatonin im Mausplasma beträgt die mittlere Wiederfindungsrate 100,1 %. In dem angegebenen Bereich ist die Wiederfindung zwischen Soll- und Istwert sehr gut, der Korrelationskoeffizient beträgt 0,98 und die Regressionsgerade ist $y = 0,9x + 15,0$. Das Ergebnis hat gezeigt, dass die Anforderungen für die Linearität erfüllt wurden, weil die mittlere Wiederfindungsrate der seriell verdünnten Proben zwischen 80 und 120 % liegt. Mit Hilfe der Linearität konnte ebenfalls ein störender Matrixeffekt auf die Bestimmung von Melatonin ausgeschlossen und des Weiteren ein Arbeitsbereich mit hoher Richtigkeit und Linearität bestätigt werden. Sind die Melatoninkonzentrationen in den Mausproben zu hoch und liegen sie oberhalb des Arbeitsbereichs, ist es möglich diese mit der entsprechenden Ausgleichsmatrix zu verdünnen, um so in den linearen Bereich der Standardkurve zu gelangen.

5. Präzision

Die Präzision ist ein Maß für die Streuung von Analyseergebnissen und beschreibt, wie klein die maximalen Abweichungen voneinander unabhängiger Ergebnisse werden, indem ein festgelegtes Ermittlungsverfahren mehrfach unter vorgegebenen Bedingungen angewendet wird. Zur Überprüfung der Streuung von Analyseergebnissen, ermittelt mit dem entwickelten RIA, wurde die Intra-Assay-Präzision angewendet. Die gewonnenen Messwertreihen für Mausserum und Mausplasma sind nach der Berechnung nach David mit einer Wahrscheinlichkeit von 99 % normalverteilt. Mit Hilfe des Grubbs-Tests konnten im Mausserum keine Ausreißer innerhalb der Messreihe nachgewiesen werden. Im Mausplasma wurde allerdings ein Ausreißer ermittelt. Es stellte sich jedoch heraus, dass durch Eliminieren die Veränderung des Mittelwerts und des VK unbedeutend war. Aus diesem Grund wurde der Wert nicht entfernt. Die zulässigen Obergrenzen des Variationskoeffizienten für Mausserum und Mausplasma wurden nicht überschritten. Zu Angaben der Inter-Assay-Präzision wurden folgende Ergebnisse erhalten: Das Präzisionsprofil für Mausserum und Mausplasma zeigt deutlich, dass die höchste Präzision und somit die stabilsten Ergebnisse im linearen Standardkonzentrationsbereich (zwischen 12 und 1200 pg/mL) zu finden sind. In diesem Bereich werden auch die physiologischen Melatoninkonzentrationen erwartet. Die höchste „Unpräzision“ liegt bei < 12 pg/mL und >1200 pg/mL, aber auch hier liegen die Variationskoeffizienten noch unter 15 %. Die Messergebnisse für die Inter-Assay-Präzision bei Mausserum zu den unterschiedlichen Melatoninkonzentrationen zeigen eine niedrige Standardabweichung von 6,2, 7,8 und 56,9 pg/mL und dementsprechend einen niedrigen VK von 15,6, 12,7 und 11,0 %. Im Mausplasma ist die Standardabweichung 6,0, 11,8 und 33,3 pg/mL bei dementsprechend niedrigem VK von 13,2, 13,1 und 6,1 %. Nach Berechnung durch David konnte eine Normalverteilung der Messwerte angenommen werden. Werte, die auffallend stark vom Mittelwert abweichen, wurden mit dem Grubbs Test überprüft. Keine der Werte im Mausserum und Mausplasma konnten als Ausreißer deklariert werden. Die berechneten Variationskoeffizienten für die Messwerte im Mausserum und Mausplasma liegen unterhalb der zulässigen Obergrenze. Für die Analytik von Melatonin in mehreren Mausproben, über eine längere Serie oder über mehrere Tage verteilt, bedeutet das, dass die Abweichungen bzw. Streuungen von voneinander unabhängig ermittelten Ergebnissen sehr klein sind und auch zufällige Fehler ausgeschlossen werden können. Alle Analyseergebnisse, ob Melatonin im Mausserum oder Mausplasma, zeigen ein hohes Maß an Übereinstimmung und eine geringe Streuung. Im Vergleich zu anderen Immunoassays, z.B. RIA bzw. ELISA (Intra- und Inter-Assay-Präzision < 10 und < 20 %) [Leung, 1991; Yie et al., 1993] und auch zu anderen Methoden wie HPLC (Intra- und Inter-Assay-Variation < 15 %) [Rizzo et al., 2002] wurde ein hohes Maß an Präzision nachgewiesen. Die Akzeptanzkriterien für die Intra-Assay-Präzision sind erfüllt.

6. Probenstabilität

Die Stabilität der Proben bzw. des Analyten in der Matrix ist für eine zuverlässige Detektion von großer Bedeutung. Eine unsachgemäße Lagerung der Proben kann zu einer Beeinträchtigung führen [Cavallo und Hassan, 1994; Daya et al., 2000]. Im Rahmen der Probenstabilität wurde geprüft, ob

unterschiedliche Lagerungsbedingungen von Mausproben einen Einfluss auf die Melatoninkonzentrationen in der Matrix haben. Aus allen unter Stressbedingungen ermittelten Ergebnissen wurde der Mittelwert gebildet. Bei den niedrigen Melatoninkonzentrationen im Mausserum beträgt dieser 22,5 pg/mL. Grundsätzlich wird eine Abweichung von $\pm 20\%$ vom Mittelwert als Abweichung festgelegt. Daraus ergab sich für die niedrige Melatoninkonzentration im Mausserum ein Toleranzbereich von 18,0 bis 27,0 pg/mL. Die Messungen nach den verschiedenen Stressbedingungen ergaben, dass alle Resultate innerhalb dieses Bereichs liegen. Der Mittelwert für Melatonin in der zweiten Probe beträgt mit der festgelegten Abweichung von $\pm 20\%$, $38,9 \pm 7,8$ pg/mL. Das ergibt einen Toleranzbereich für die Melatoninkonzentrationen von 31,1 bis 46,7 pg/mL. Für die dritte Probe wurde nach allen Stressbedingungen ein Mittelwert von $376,5 \pm 75,3$ pg/mL ermittelt. Das entspricht einem Bereich von 301,2 bis 451,8 pg/mL. Im Mausplasma wurde ein Toleranzbereich für die erste Probe von 19 bis 28,6 pg/mL berechnet mit einem Mittelwert nach allen Stressbedingungen von 23,8 pg/mL. Es wurden keine besonderen Abweichungen festgestellt. Genauso liegen alle Ergebnisse von der zweiten Probe im Bereich von 32,7 bis 49,1 pg/mL. Die Melatoninkonzentrationen in der dritten Probe liegen ebenfalls alle im Toleranzbereich von 303,5 bis 455,3 pg/mL. Mausserum- und Mausplasmaproben mit unterschiedlich hohen Konzentrationen wurden in einer definierten Zeitspanne unterschiedlichen Temperaturen ausgesetzt und mehrmals eingefroren und wieder aufgetaut. Keiner dieser Stressbedingungen hat einen Einfluss auf den Analyten in der Probe. Die Überprüfung der Probenstabilität hatte gezeigt, dass die ermittelten Melatoninkonzentrationen dem anfänglichen Wert aus der Primärmessung mit einer maximal zulässigen analytischen „Unpräzision“ entsprechen. In einem Zeitrahmen von 12 Monaten wurden die Melatoninkonzentrationen im Mausserum und Mausplasma bestimmt. Es ist eindeutig zu erkennen, dass die Ergebnisse über das gesamte Jahr konstant sind. Bei den Lagerbedingungen von $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, lichtgeschützt und ohne Zugabe von Stabilisatoren ist der Analyt in der Probe also mindestens 12 Monate stabil.

7. Robustheit

Durch die Änderung der Lagerungstemperatur für das Testkit bzw. die dazugehörigen Testkitkomponenten sollte die Robustheit überprüft werden. Nach einer Woche (beschleunigte Haltbarkeitsprüfung) wurde die Funktion des Testkits anhand der Standardkurve und durch Überprüfung der absoluten Bindung B_0 und der Testkitkontrollen gezeigt. Als Referenz gelten die Standardkurve, die Bindung B_0 und die Testkitkontrollen gewonnen mit Testkit 1. Der Verlauf der Standardkurven von Testkit 2 und 3 ist nahezu identisch mit der Referenzstandardkurve. Die Melatoninkonzentrationen bei den mitgelieferten Kitkontrollen sind alle gleich und entsprechen den Sollwerten von 20 bzw. 60 pg/mL. Auch auf die Bindung des Antikörpers hat die beschleunigte Haltbarkeitsprüfung keinen Einfluss. Mit 26,7 bzw. 27,4 % weichen die Ergebnisse nicht von der Bindung von 27 % des Referenzkits ab. Mit Hilfe der Robustheit konnte gezeigt werden, dass

Abweichungen von den empfohlenen Lagerungsbedingungen keinen Einfluss auf die Funktionsfähigkeit des Testkit bzw. Testkitkomponenten haben.

8. Spezifität

Die Selektivität bzw. Spezifität beschreibt die Fähigkeit einer Methode, die Zielsubstanzen in den zu analysierenden Matrizen ohne Störung durch andere in der Matrix vorliegenden Komponenten zu bestimmen. Die eindeutige Erfassung und Identifizierung von Melatonin wurde mit der Spezifität des Melatonin-Antikörpers überprüft. Folgende melatoninähnliche Substanzen wurden auf ihre mögliche Kreuzreaktion im Assay getestet: N-Acetyl-5-hydroxytryptophan, 5-Methoxytryptophol, 5-Methoxytryptamin, 6-Methoxytryptamin, Serotonin, DL-Tryptophan, 5-Methoxy-DL-tryptophan, 5-Hydroxy-L-tryptophan, 5-Methoxyindol, 6-Hydroxymelatonin. Die Kreuzreaktion von 0,1 % zu N-Acetyl-5-hydroxytryptamin und 5-Methoxytryptophol ist gering und nicht signifikant. Bei allen anderen liegt die Kreuzreaktivität < 0,01 %. Im Vergleich zu anderen Antikörpern [Geffard et al., 1982] zeigt unser Antikörper gleich niedrige Kreuzreaktionen zu strukturähnlichen Substanzen. Zu 6-Hydroxymelatonin ist aber hier mit < 0,01 % eine wesentlich niedrigere Kreuzreaktivität ermittelt worden als in bisher erschienenen Publikationen, z.B. 0,7 % [Vakkuri et al., 1984], 0,5 % [Leung, 1991], 1,6 % [Di et al., 1998] oder 0,8 % [Schumacher et al., 2000]. Auch zu 5-Methoxytryptamin ist die Kreuzreaktion von 0,03 % [Schumacher et al., 2000] auf < 0,01 % reduziert. Durch Gewährleistung der Spezifikationsanforderungen wurde die Fähigkeit der Methode unter Beweis gestellt, dass Melatonin ohne Verfälschung durch andere in der Probe vorhandene Komponenten erfasst und somit eindeutig identifiziert werden kann.

Nach Betrachtung aller Validierungsparameter kann festgehalten werden, dass es keine Abweichungen von den festgelegten Akzeptanzkriterien gibt. Damit sind die Anforderungen an den Assay erfüllt und die zuverlässige Verwendung als RIA zur Detektion von Melatonin im Mausserum und Mausplasma nachgewiesen.

Mit dem „Direkt-RIA“ wurde nach der Validierung ein 24-h Profil von endogenem Melatonin im Serum und Plasma von Kontroll-Mäusen erstellt. Die Mäuse wurden in einem Hell/Dunkel-Rhythmus von 12 h Licht und 12 h Dunkelheit (L:D = 12:12, Beginn der Lichtphase um 8.00 Uhr) bis zu 10 Tagen gehalten. Circadiane Rhythmen sind durch eine endogene Periodenlänge von ungefähr 24 Stunden (20 bis 28 h) charakterisiert. Die Synchronisation der „inneren Uhr“ mit dem äußeren Tagesablauf erfolgt durch so genannte „Zeitgeber“. Der wichtigste natürliche Zeitgeber ist der Licht-Dunkel-Wechsel. Dabei treten am Tag sehr niedrige und in der Nacht hohe Werte auf [Korf et al., 2006]. Die Melatoninwerte sind im Serum und Plasma fast deckungsgleich, und es ist sehr gut ein diurnaler Rhythmus des Melatonins zu erkennen, mit niedrigen Tagwerten zwischen 8.00 und 20.00 Uhr und hohen Nachtwerten zwischen 20.00 und 8.00 Uhr. Der Konzentrationsbereich von Melatonin im Serum ist für die Tagwerte zwischen 13,8 und 20,6 pg/mL, für Plasma zwischen 15,0 und 24,1 pg/mL. Bei den Nachtwerten ist die höchste Melatoninkonzentration um 4.00 Uhr morgens mit 55,3

pg/mL im Mausserum und mit 61,5 pg/mL im Mausplasma bestimmt worden. Mit dem RIA ist es eindeutig möglich, niedrige Melatoninkonzentrationen den Tages- (Hell) und hohe Melatoninkonzentrationen den Nacht- (Dunkel)zeiten zuzuordnen. Bei der Betrachtung von Melatoninkonzentrationen zu unterschiedlichen Tageszeiten bzw. unterschiedlichen Alters bei verschiedenen Mauslinien, z.B. CBA, C57BL [Kennaway et al., 2002] oder B6C3F1, ein Hybrid zwischen C57BL/6 und C3H [Lahiri et al., 2004], liegen die detektierten Melatoninkonzentrationen in gleichen Größenordnungen und sind somit vergleichbar. Das bedeutet auch, dass variierende Melatoninkonzentrationen mit dem RIA sehr gut messbar sind. In Bezug auf die Validierungsparameter, z.B. typische Standardkurve und Arbeitsbereich, liegen die ermittelten Werte sehr gut im linearen Bereich der Standardkurve und somit im Bereich mit der höchsten Genauigkeit.

Wegen der oft niedrigen Melatoninkonzentrationen in Serum- oder Plasmaproben und möglichen Störeinflüssen von Matrixkomponenten auf die Bestimmung von Melatonin mit einem RIA verwenden die meisten Testsysteme eine Extraktion vor der Analyse. Unter anderem haben sich die Flüssig-Flüssig-Extraktion und die Festphasenextraktion bewährt. Die am häufigsten verwendeten Lösungsmittel bei der Flüssig-Flüssig-Extraktion sind Methanol [Di et al., 1998], Chloroform [Vakkuri et al., 1984; Chegini et al., 1995], Dichlormethan [Yie et al., 1993; Rizzo et al., 2002] und tert. Butylmethylether [Lahiri et al., 2004]. Bei der Festphasenextraktion haben sich Extraktionssäulen wie die RP C₁₈-Säulen [Webley et al., 1985; Sieghart et al., 1987; Plebani et al., 1990] durchgesetzt. Bei den genannten Extraktionsmethoden wird der zu bestimmende Analyt aus dem z.B. proteinreichen Extraktionsgut gelöst und in einem störungsfreien Puffer wieder aufgenommen. Außerdem ist durch die Extraktion die Bestimmung des Gesamt-Melatonins möglich [Rizzo et al., 2002]. Mit dem Vergleich zum „Direkt-RIA“ sollte gezeigt werden, dass durch die Einführung einer Maus-spezifischen Ausgleichsmatrix auch ohne aufwendige Probenvorbereitungen Melatonin in Mausproben bestimmt werden kann.

Zu Beginn wurde Melatonin aus einer angereicherten Protein-freien Standardmatrix extrahiert, um die Extraktionseffizienz der einzelnen Lösungsmittel nachzuweisen. Die Ergebnisse sollen als Referenz auch dazu dienen, zu überprüfen, ob die Serum- oder Plasmamatrix einen Einfluss auf die Extraktion hat. Die mittlere Wiederfindungsrate von Melatonin, extrahiert mit Methanol, liegt bei 91,4 % mit einem VK von 5,3 %, mit Chloroform bei 81,2 % mit einem VK von 5,0 %, mit Dichlormethan bei 82,2 % mit einem VK von 15,3 % sowie mit tert. Butylmethylether bei 74,3 % mit einem VK von 16,2 %. Nur mit Methanol war eine Extraktion der niedrigsten Aufstockungskonzentration möglich. Bei allen anderen Lösungsmitteln war die Extraktion unvollständig. Voraussetzung für eine gute Extraktion ist, dass sich der Analyt in dem Lösungsmittel besser löst als in der Flüssigkeit, in der er sich ursprünglich gelöst hat [Mersmann, 1980; Grassmann, 1997]. Hinsichtlich der Melatoninextraktion weist Methanol bessere Lösungseigenschaften, verglichen mit anderen Lösungsmitteln, auf. Dies wurde besonders bei niedrigen Melatoninkonzentrationen deutlich. Eine

Störung durch andere Komponenten war auszuschließen, da es sich um eine Protein-freie Matrix handelte. Eventuell ließe sich die Extraktionsausbeute durch Veränderung des pH-Wertes verbessern. Bevor die Wiederfindung in aufgestockten Melatoninproben bestimmt wurde erfolgte die Messung der endogenen Melatoninkonzentration. Im Mausserum beträgt diese 38,5 pg/mL und im Mausplasma 34,9 pg/mL, analysiert mit dem „Direkt-RIA“. Bei der Methanolextraktion beträgt die Konzentration im Mausserum 40,3 pg/mL und im Mausplasma 40,7 pg/mL. Bei den anderen Lösungsmitteln war eine Messung nicht möglich. Eine Bestimmung von niedrigen Tagwerten wäre also ausgeschlossen. Als nächstes sind die Ergebnisse zur Wiederfindung von Melatonin im Mausserum und Mausplasma dargestellt. Die Ergebnisse, ermittelt mit dem „Direkt-RIA“ und nach Extraktion mit Methanol, lassen sich sehr gut miteinander vergleichen. Die mittlere Wiederfindungsrate ist für den „Direkt-RIA“ im Mausserum 99,0 % mit einem VK von 3,7 % und für die Extraktion mit Methanol 97,1 % mit einem VK von 3,9 %, entsprechend für Mausplasma 96,7 % mit einem VK von 3,0 % bzw. 100,7 % mit einem VK von 4,7 %. Die Wiederfindungsraten von Melatonin im Mausserum und Mausplasma mit den anderen Lösungsmitteln sind nahezu identisch; sie sind mit Chloroform 72,4 % mit einem VK von 17,4 % bzw. 77,7 % mit einem VK von 26,3 %, für Dichlormethan 85,2 % mit einem VK von 16,8 % bzw. 84,2 % mit einem VK von 29,0 % und für tert. Butylmethylether 73,9 % mit einem VK von 20,7 % bzw. 79,7 % mit einem VK von 20,1 %. Die Wiederfindungsrate nach Anwendung dieser Lösungsmittel nimmt mit steigender Aufstockung zu, allerdings sind auch sie nicht in der Lage, die Proben mit den niedrigen Melatoninkonzentrationen zu extrahieren. Diese Daten lassen sich sehr gut mit den Wiederfindungsraten für die Extraktion von Melatonin aus einer Protein-freien Matrix vergleichen. Eine Erklärung der niedrigen Extraktionseffizienz von Chloroform, Dichlormethan und tert. Butylmethylether durch mögliche Störeinflüsse lässt sich hiermit ausschließen. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass diese drei genannten Lösungsmittel nicht dazu geeignet sind, Melatonin vollständig aus einer Mausserum- oder Mausplasmaprobe zu extrahieren. Da die Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Methanol die erfolgreichste ist und die Wiederfindungsraten mit denen aus dem „Direkt-RIA“ nahezu identisch sind, kann man von einer zuverlässigen Bestimmung von Melatonin mit dem „Direkt-RIA“ ausgehen. Die Aussage von Di u. Mitarb. [1998], dass mit der Methanolextraktion sowohl freies als auch gebundenes Melatonin im Serum und Plasma extrahiert werden kann, lässt sich durch die eigenen Untersuchungen bestätigen. Dies ist auch gleichzeitig ein Nachweis und eine Ergänzung zum Vorversuch „Bestimmung des Gesamt-Melatonins“, dass mit dem „Direkt-RIA“ das Gesamt-Melatonin im Mausserum und Mausplasma bestimmt werden kann. Der „Direkt-RIA“ besitzt weitere Vorteile wie einfachere und schnellere Durchführung, kein Einsatz von Lösungsmittel und fehlenden Analytenverlust durch Extraktionsschritte.

Bei der Festphasenextraktion wurde zunächst so vorgegangen wie bei der Flüssig-Flüssig-Extraktion, indem die Extraktionseffizienz erst an einer Protein-freien Standardmatrix überprüft wurde. Die mittlere Wiederfindungsrate von extrahiertem Melatonin aus einer Protein-freien Standardmatrix ist 92,2 % und entspricht den Angaben des Herstellers von bis zu 97 % (J.T. Baker, Solid Phase

Extraction, Product Information). Danach folgte die Extraktion von Melatonin aus einer aufgestockten Mausserum- und Mausplasmaprobe. Die Wiederfindungsraten von Melatonin nach Extraktion aus einer Mausmatrix waren etwas niedriger, nämlich im Mausserum 90,7 % mit einem VK von 6,6 % und im Mausplasma 90,4 % mit einem VK von 5,1 %. Die mittlere Wiederfindung beim „Direkt-RIA“ beträgt im Mausserum 95,8 % mit einem VK von 6,7 % und im Mausplasma 96,0 % mit einem VK von 2,5 %. Bei Betrachtung des nativ vorhandenen Melatonins im Mausserum und Mausplasma konnten mit dem „Direkt-RIA“ Konzentrationen von 38,5 pg/mL bzw. 34,9 pg/mL ermittelt werden. Nach Extraktion sinkt die Konzentration im Mausserum und Mausplasma auf 29,9 pg/mL, das bedeutet einen Verlust von ca. 17,0 %. Der Verlust von Melatonin könnte damit zusammenhängen, dass nach der Extraktion der Analyt nur unvollständig von der Säule eluiert wurde. Wahrscheinlicher jedoch ist ein Teilverlust des Analyten durch zusätzliche Pipettierschritte. Die Festphasenextraktion lässt sich sehr gut mit dem „Direkt-RIA“ vergleichen. Die Aussage von Sieghart u. Mitarb. [1987], dass mit der Festphasenextraktion eine reproduzierbare und flexible Methode für die Melatoninbestimmung gefunden wurde, lässt sich bestätigen. Allerdings ist das höhere Volumen von 100 µL im Gegensatz zu 50 µL für die Extraktion vom entscheidenden Nachteil. Die Methanol-Extraktion, die Festphasenextraktion und der „Direkt-RIA“ sollen nun in der Bestimmung von Melatonin bei echten Mausproben, also nicht künstlich aufgestockten, zur Anwendung kommen. Mit allen drei Methoden wurde ein 24-h Profil von endogenem Melatonin im Mausserum erstellt.

Zwischen „Direkt-RIA“ und Methanol-Extraktion wurde eine sehr gute Korrelation gefunden, die durch die Regressionsgerade $y = 1,1x - 0,9$; $R^2 = 0,99$ für die ermittelten Melatoninkonzentrationen beschrieben ist. Niedrige Tag- und hohe Nachtwerte sind kongruent, z.B. beträgt der Höchstwert für Melatonin um 4.00 Uhr morgens bestimmt mit dem „Direkt-RIA“ 55,3 pg/mL und nach Methanol-Extraktion 56,9 pg/mL. Die analysierten Melatoninkonzentrationen nach einer SPE zeigen ebenfalls niedrige Tag- und hohe Nachtwerte, sind jedoch um ca. 17 % niedriger, z.B. beträgt die Melatoninkonzentration um 4.00 Uhr morgens 45,9 pg/mL. Das entspricht der Beobachtung aus dem vorangegangenen Versuch. Die Korrelation zwischen den beiden Methoden ist aber sehr gut, die Regressionsgerade beträgt $y = 0,8x - 0,03$; $R^2 = 0,99$. Schließlich kann festgehalten werden, dass der „Direkt-RIA“ durchaus mit etablierten Extraktionsmethoden, wie z.B. Methanol-Extraktion und Festphasenextraktionen, konkurrieren kann.

Bei einigen in der Literatur beschriebenen RIA zur Bestimmung von Melatonin in Mausproben ist eine Probenvorbereitung, z.B. eine Festphasenextraktion mit C_{18} Säulen, notwendig [Kennaway und Dawson, 2006] oder es muss ein höheres Volumen (≥ 100 µL pro Bestimmung) für die Detektion eingesetzt werden [Eriksson, 1998; Ma et al., 2006]. Für den Vergleich wurde ein „Melatonin direct Radioimmunassay“ für die direkte quantitative Bestimmung von Melatonin im Plasma oder Serum verwendet, der auf dem Kennaway G280 Melatonin-Antikörper basiert [Vaughan, 1993]. Der „frisch markierte“ Tracer des Vergleichs-RIA hat viel niedrigere Totalcounts, nämlich 14676 cpm gegenüber

dem „Direkt-RIA“ mit 66364 cpm. Aufgrund einer Halbwertszeit von 60 Tagen hat der „Direkt-RIA“ ferner eine wesentlich längere Haltbarkeit. Die Standardkonzentrationen des Vergleichs-RIA sind wesentlich niedriger und beginnen bei 1 pg/mL und enden bei 81 pg/mL. Der weite Arbeitsbereich von 12 bis 4000 pg/mL bietet dagegen einen großen Vorteil bei der Bestimmung von Melatonin in Proben von unterschiedlichen Mauslinien, da die Melatoninkonzentrationen extrem schwanken können. Laut Angabe des Herstellers liegt die Nachweisgrenze des RIA bei 0,9 pg/mL. Diese Sensitivität kann aber nur durch das hohe Probenvolumen von 800 µl erreicht werden. Bei dem selbst entwickelten RIA ist nur ein Probenvolumen von 50 µL notwendig - bei der Bestimmung von Melatonin in Mausproben - ein großer Vorteil. Bei dem Vergleichs-RIA müssen die Proben im Verhältnis 1:16 verdünnt werden. Beide Darstellungen eines 24-h Profils von endogenem Melatonin im Serum von den Kontroll-Mäusen zeigen niedrige Tag- und hohe Nachtwerte. Die Bestimmung von Melatonin mit Hilfe eines ELISA oder High performance liquid chromatography (HPLC) ist aufgrund der Verwendung eines hohen Probenvolumens oder der geringen Sensitivität der Untersuchungsmethode nicht möglich [Chegini et al., 1995; Conti und Maestroni, 1996].

Der „Direkt-RIA“ wurde für die Bestimmung von Melatonin im Plasma bei unterschiedlichen Mauslinien angewendet. Dazu wurden beispielhaft Tiere des Stammes C3H, C57BL und WT sowie „knockout“-Mäuse untersucht. Die analysierten Melatoninkonzentrationen liegen über der Nachweisgrenze und im linearen Bereich der Standardkurve. Aufgrund der unterschiedlich hohen Melatoninkonzentrationen wurde der Vorteil eines weiten Arbeitsbereichs bestätigt. Anhand der Ergebnisse kann man sehr gut erkennen, dass mit dem „Direkt-RIA“ niedrige Tag- und höhere Nachtwerte bestimmt werden können, wobei die Melatoninkonzentrationen bei den C57BL-Mäusen im Vergleich zu den C3H-Mäusen ca. um die Hälfte niedriger sind. Die C3H-Mäuse sind Melatoninprofizient, d.h. sie haben normal viel Melatonin, wobei die C57BL Melatonin-defizient sind, d.h. sie haben kein oder weniger Melatonin [von Gall et al., 2002; Stehle et al., 2002]. Bei den „knockout“-Mäusen wurden die unterschiedlichen Rezeptoren, MT1 oder MT2 (MT1/2 nicht angegeben) ausgeknockt [Mühlbauer et al., 2009]. Bei beiden „knockout“-Mäusen als auch beim WT ist ein diurnaler Rhythmus des Melatonins zu erkennen. Anhand dieses Ergebnisses wurde gezeigt, dass mit dem „Direkt-RIA“ unter der Verwendung einer spezifischen Ausgleichsmatrix, Melatonin bei unterschiedlichen Mauslinien bestimmt werden kann.

Zusammenfassend können folgende Vorteile des „Direkt-RIA“ hervorgehoben werden: Einfache und schnelle Durchführung des Assays, eine höhere Anfangsaktivität des Tracers, ein weiter Arbeitsbereich, hohe Spezifität des Antikörpers, ein niedriges Probenvolumen und eine hohe Sensitivität. Tagesrhythmen von Melatonin und der Nachweis erhöhter Melatoninwerte in der Nacht bei unterschiedlichen Mauslinien sind gezeigt worden.

5. Zusammenfassung

Die bisherigen Methoden waren nicht oder sind in nur aufwändiger Weise für die quantitative Bestimmung von Melatonin bei verschiedenen Mausmodellen (z.B. „knockout“-Mäusen) geeignet. In dieser Arbeit wurde die Entwicklung und Validierung eines RIA zur direkten quantitativen Bestimmung von Gesamt-Melatonin im Mausserum und Mausplasma bei verschiedenen Mauslinien vorgestellt. Zunächst wurden einige Vorversuche durchgeführt. Ein häufiges Problem bei der direkten Bestimmung von Melatonin ist die unterschiedliche Zusammensetzung zwischen verwendeten Standards zur Probenmatrix. Dadurch werden die Messergebnisse entscheidend beeinflusst und gegebenenfalls verfälscht. Dieses Problem wird mit der sogenannten Ausgleichsmatrix gelöst. Die Ausgleichsmatrix wird aus der gleichen Matrix hergestellt, in der sich auch der Analyt befindet. Mehr als 90 % des endogenen Melatonins wird durch Adsorption mit Aktivkohle entfernt, wobei andere Blutbestandteile durch diesen Prozess unbeeinträchtigt bleiben. Die Melatonin-freie Flüssigkeit wird dann als Ausgleichsmatrix bei der Standardkurve verwendet, um den Unterschied zur Probenmatrix auszugleichen. Die mittlere Wiederfindungsrate beim Mausserum liegt bei 108,0 % bzw. beim Mausplasma bei 99,3 %. Mit beiden Mause Ausgleichsmatrizes konnte die Beeinflussung von Messergebnissen aufgrund unterschiedlicher Zusammensetzung zwischen Standards und Probenmatrix verringert werden. Außerdem ist mit der Einführung einer Maus-spezifischen Ausgleichsmatrix eine Bestimmung von Melatonin in Mausproben auch ohne aufwendige Extraktionsschritte möglich. Zur Gewinnung eines Antikörpers wurde 5-Methoxytryptamin mit der Carbodiimidmethode kovalent an BSA gebunden. Bei der Kopplung lässt man einen Substituenten des Haptens mit einem Substituenten des Carriers reagieren. Es wurden 5 Kaninchen mit dem Immunisierungskonjugat immunisiert und der Antikörper mit dem höchsten Titer kam im Radioimmunoassay in einer Endverdünnung von 1:5000 zum Einsatz. Die Spezifität des Antikörpers wurde im Rahmen der Validierung überprüft und ergab, dass Melatonin eindeutig identifiziert werden kann. Für den Nachweis von Gesamt-Melatonin in Mausproben wurden das Verdauungsenzym Pepsin (EC 3.4.23.1) und die Fällungsreagenzien Trichloressigsäure (TCA) sowie 5-Sulfosalicylsäure Dihydrat für die Abspaltung von Melatonin von Serum- bzw. Plasmaproteinen als Probenvorbereitungen verwendet. Mit den Fällungsreagenzien wurde nur ein zufriedenstellendes Ergebnis erzielt, mit Pepsin dagegen eine sehr gute Wiederfindung von 97,8 bzw. 99,6 % erreicht. Anhand dieses Ergebnisses wurde die Beobachtung bestätigt, dass ca. 60 bis 70 % des Melatonins reversibel an Proteine, z.B. Albumin, gebunden ist. Es wurde aber auch deutlich, dass mit Hilfe des Enzymschritts das gebundene Melatonin freigesetzt und somit das Gesamt-Melatonin in der Mausprobe bestimmt werden kann. In dieser Arbeit ist eine [¹²⁵I]-Markierung beschrieben, wobei 5-Methoxytryptamin mit [¹²⁵I]-Bolton-Hunter-Reagenz iodiert wurde. Das Ergebnis zeigt, dass die Markierung des Tracers reproduzierbar ist und dass der Tracer sowohl innerhalb einer Charge, direkt nach Markierung, und nach 105 Tagen, als auch zwischen unterschiedlichen Markierungschargen zuverlässige Ergebnisse bei der Melatoninbestimmung liefert. Durch die anschließende Validierung sollte gezeigt und sichergestellt werden, dass das

Analysenverfahren plausible, reproduzierbare und verlässliche Resultate liefert. Für den RIA gilt es, folgende Validierungsparameter zu erfüllen: Typische Standardkurve und Arbeitsbereich, Nachweisgrenze, Wiederfindungsrate, Linearität, Präzision, Probenstabilität, Robustheit und Spezifität. Es konnte im Rahmen der Versuche unter Verwendung des Assays gezeigt werden, dass alle Validierungsparameter den Akzeptanzkriterien entsprechen. Somit wurde nachgewiesen, dass der RIA die gestellten Anforderungen erfüllt. Bei der Untersuchung von Melatonin im Serum und Plasma von Kontroll-Mäusen, konnten mit dem entwickelten „Direkt-RIA“ niedrige Tag- und hohe Nachtwerte detektiert werden. Die meisten in der Literatur beschriebenen RIA basieren auf einer Probenvorbereitung durch unterschiedliche Extraktionsmethoden. Deswegen wurde der „Direkt-RIA“ mit etablierten Extraktionsmethoden wie der Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Methanol, Chloroform, Dichlormethan und tert. Butylmethylether und der Festphasenextraktion mit C₁₈-(Octadecyl) Extraktionssäulen verglichen. Es wurde eine gute Korrelation zur Methanol-Extraktion festgestellt. Bei der Festphasenextraktion zeigte die niedrigere Wiederfindungsrate, dass es zu einem Analytenverlust kommt. Außerdem war ein höheres Probenvolumen nötig. Im nächsten Schritt folgte der Vergleich eines 24-h Profils von endogenem Melatonin im Mause Serum. Analysiert wurde mit dem „Direkt-RIA“ und mit Methanol- bzw. C₁₈-Extraktion als Probenvorbereitung. Die Korrelation zwischen „Direkt-RIA“ und Methanol-Extraktion ist sehr gut, die zugehörige Regressionsgerade wird beschrieben durch $y = 1,1x - 0,9$; $R^2 = 0,99$, $P < 0,001$ bzw. durch $y = 0,8x - 0,03$; $R^2 = 0,99$, $P < 0,001$ für die C₁₈-Extraktion. Bei allen Methoden ist sehr gut zwischen niedrigen Tag- und hohen Nachtwerten zu unterscheiden. Es ist festzuhalten, dass der „Direkt-RIA“ mit etablierten Extraktionsmethoden, wie z.B. Methanol-Extraktion und Festphasenextraktionen, konkurrieren kann. Der entwickelte „Direkt-RIA“ wurde mit einem kommerziell erhältlichen RIA verglichen, indem mit beiden Assays ein 24-h Profil von endogenem Melatonin im Serum von den Kontroll-Mäusen erstellt wurde. Beide Darstellungen des 24-h Profils zeigen niedrige Tag- und hohe Nachtwerte. Allerdings konnten mit dem „Direkt-RIA“ durchschnittlich 3-fach höhere Melatoninkonzentrationen detektiert werden, verglichen mit den Werten, die mit dem Vergleichskit ermittelt wurden. Die höheren Werte sind im Vergleich zu Literaturwerten plausibel und zeigen einen deutlicheren Unterschied zwischen Tag- und Nachtwerten. Aufgrund der Tatsache, dass dieser Test das gesamte Melatonin erfasst, wurden im Vergleich zu anderen Testsystemen höhere Werte gefunden. Außerdem ist das niedrige Probenvolumen von 50 µL pro Bestimmung ein entscheidender Vorteil. Beispielhaft wurde Melatonin bei vier unterschiedlichen Mauslinien bestimmt. Hier konnte der „Direkt-RIA“ durch seine niedrige Nachweisgrenze und weiten Arbeitsbereich überzeugen und bei allen Mauslinien konnte ein diurnaler Rhythmus des Melatoninspiegels nachgewiesen werden. Versuche, Melatonin im Serum und Plasma bei verschiedenen Mauslinien mittels ELISA oder HPLC nachzuweisen, scheiterten an dem Gebrauch eines zu hohen Probenvolumens oder an der zu geringen Sensitivität des Untersuchungsverfahrens. Das Ziel, einen RIA für die quantitative Bestimmung von Melatonin in unterschiedlichen Mauslinien zu entwickeln und zu validieren, wurde erreicht.

6. Literaturverzeichnis

1. Alders L. Liquid-Liquid-Extraction. Elsevier Publ. Company, Amsterdam, Houston, London, New York, 1955, pp. 99-123.
2. Anisimov V (2003) Effects of exogenous melatonin – a review. *Toxicol Pathol* 31: 589–603.
3. Arendt J, Paunier L, Sizonenko PC (1975) Melatonin radioimmunoassay. *J Clin Endocrinol Metab* 40: 347–350.
4. Arendt J, Wetterberg L, Heyden T, Sizonenko PC, Paunier L (1977) Radioimmunoassay of melatonin: Human serum and cerebrospinal fluid. *Hormone Res* 8: 65–75.
5. Arendt J (1995) Melatonin and the mammalian pineal gland. *Can J Zool* 79: 254–270.
6. Bach AG, Wolgast S, Mühlbauer E, Peschke E (2005) Melatonin stimulates inositol-1,4,5-trisphosphate and Ca²⁺ release from INS1 insulinoma cells. *J Pineal Res* 39: 316–323.
7. Balsalobre A (2002) Clock genes in mammalian peripheral tissues. *Cell Tiss Res* 309: 193-199.
8. Berson SA, Yalow RS (1968) Radioimmunoassay of ACTH in plasma. *J Clin Invest* 47: 2725–2751.
9. Bolton AE, Hunter WM (1973) The labelling of proteins to high specific radioactivities by conjugation to a [¹²⁵I]-containing acylation reagent. *Biochem J* 133: 529–539.
10. Brömme HJ, Mörke W, Peschke E, Ebel H, Peschke D (2000) Scavenging effect of melatonin on hydroxyl radicals generated by alloxan. *J Pineal Res* 29: 201-08
11. Brzezinski A (1997) Melatonin in humans. *New Engl J Med* 336: 186–195.
12. Butler J (1995) Negative interference in immunoassays. *Clin Chem* 41: 481–482.
13. Cardinali DP, Lynch HJ, Wurtman RJ (1972) Binding of melatonin to human and rat plasma protein. *Endocrinology* 91: 1213–1218.
14. Carter P (1978) Preparation of ligand-free human serum for radioimmunoassay by adsorption on activated charcoal. *Clin Chem* 24: 362–364.
15. Cattabeni F, Koslow SH, Costa E (1972) Gas-chromatographic mass-spectrometric assay of four indole alkylamines of rat pineal. *Science* 178: 166–168.
16. Cavallo A, Hassan M (1994) Stability of melatonin in aqueous solution. *J Pineal Res* 18: 90–92.
17. Cermakian N, Whitmore D, Foulkes NS, Sassone-Corsi P (2000) Asynchronous oscillations of two zebrafish CLOCK partners reveal differential clock control and function. *Proc Natl Acad Sci* 97: 4339-4344.
18. Chegini S, Ehrhart-Hofmann B, Kaider A, Waldhauser F (1995) Direct enzyme-linked immunosorbent assay and a radioimmunoassay for melatonin compared. *Clin Chem* 41: 381–386.
19. Conti A, Maestroni GJ (1996) HPLC validation of a circadian melatonin rhythm in the pineal gland of inbred mice. *J Pineal Res* 20: 138–144.
20. Coon SL, Ganguly S, Klein DC (2002) Control of melatonin synthesis in the mammalian pineal gland: the critical role of serotonin acetylation. *Cell Tiss Res* 309: 127–137.

21. Davies C: *The Immunoassay Handbook: Introduction to Immunoassay Principles*. Elsevier, Oxford, 2005, pp. 3-37.
22. Daya S, Walker RB, Glass BD, Anoopkumar-Dukie S (2000) The effect of variations in pH and temperature on stability of melatonin in aqueous solution. *J Pineal Res* 31: 155–158.
23. Di WL, Kadva A, Djahanbakhch O, Silman R (1998) Radioimmunoassay of bound and free melatonin in plasma. *Clin Chem* 44: 304–310.
24. DIN 32645. *Chemische Analytik; Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze; Ermittlung unter Wiederholbedingungen; Begriffe, Verfahren, Auswertung* 1994-05.
25. DIN EN ISO 8402. *Qualitätsmanagement-Begriffe* 1995-08.
26. DIN ISO 5725-1. *Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Meßverfahren und Meßergebnissen - Teil 1: Allgemeine Grundlagen und Begriffe* 1997-11.
27. Ebelt H, Peschke D, Brömme HJ, Mörke W, Peschke E (2000) Influence of melatonin on free radical induced changes in rat pancreatic beta-cells in vitro. *J Pineal Res* 28: 65-72.
28. Edwards R: *Immunoassays. Essential Data*. Wiley, Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore, 1996, pp. 33-46.
29. Emon v. JM, Gerlach CL, Bowman K (1998) Bioseparation and bioanalytical techniques in environmental monitoring. *J Chromatograph* 715: 211–228.
30. Eriksson L (1998) Diurnal Rhythm of melatonin in bovine milk: pharmacokinetics of exogenous melatonin in lactating cows and goats. *Acta vet Scand* 39: 301–310.
31. Ferrua B, Masseyeff R (1985) Immunoassay of melatonin with enzyme-labeled antibodies. *J Immunoassay* 6: 79–94.
32. Fraser S, Cowen P, Franklin M, Franey C, Arendt J (1983) Direct radioimmunoassay for melatonin in plasma. *Clin Chem* 29: 396-397.
33. Fritz JS: *Analytical Solid-Phase Extraction*. Wiley-VCH, Weinheim, New York, Chichester, Brisbane, Singapore, Toronto, 1999, pp. 99-123.
34. Friemel H: *Immunologische Arbeitsmethoden*. Gustav Fischer Verlag, Jena, 1991, S. 40-54.
35. Funk W, Dammann V, Donnevert G: *Qualitätssicherung in der Analytischen Chemie*. VCH, Weinheim, New York, Basel, Cambridge, 1992, S. 45-98.
36. Geffard MR, Puizillout JJ, Delaage MA (1982) A single radioimmunological assay for serotonin, N-acetylserotonin, 5-methoxytryptamine and serotonin. *J Neurochem* 39: 1271–1277.
37. Goldman ME, Hamm H, Erickson CK (1980) Determination of melatonin by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J Chromatogr* 190: 217–220.
38. Goodfriend TL, Levine L, Fasman GD (1964) Antibodies to bradykinin and angiotensin: a use of carbodiimides in immunology. *Science* 144: 1344–1346.
39. Grassmann P: *Einführung in die thermische Verfahrenstechnik*. Walter de Gruyter, Berlin, 1997, S. 60-84.

40. Grota LJ, Brown GM (1973) Antibodies to indolealkylamines, serotonin and melatonin. *Canad J Biochem* 52: 196–202.
41. Hardeland R, Poeggeler B (2003) Non-vertebrate melatonin. *J Pineal Res* 34: 233–241.
42. Hoff J (2000) Methods of blood collecting in the mouse. *Lab Animal* 29: 47–53.
43. Iinuma F, Hamase K, Matsubayashi S (1999) Sensitive determination of melatonin by precolumn derivatization and reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatography* 835: 67–72.
44. Jin X, Gall v. Ch, Pischl RL, Gribkoff VK, Stehle JH, Reppert SM, Weaver DR (2003) Targeted disruption of the mouse Mel1b melatonin receptor. *Mol Cell Biol* 23: 1054–1060.
45. Kawashima K, Nagakawa A (1982) Improvement of radioimmunoassay for serum and tissue melatonin. *J Pharmacol* 5: 5–26.
46. Keller P: *Klinisch-chemische Labordiagnostik für die Praxis*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1991, S. 37–52.
47. Kennaway DJ (1977) A specific radioimmunoassay for melatonin in biological tissue and fluids and its validation by gas chromatography-mass spectrometry. *Endocrinol* 101: 119–127.
48. Kennaway DJ, Gilmore TA, Seamark RF (2002) Melatonin in mice: rhythms, response to light, adrenergic stimulation, and metabolism. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 282: 358–365.
49. Kennaway DJ, Voultzios A, Varcoe TJ, Moyer RW (2003) Melatonin and activity rhythm responses to light pulses in mice with the clock mutation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 284: 1231–1240.
50. Kennaway DJ, Dawson D (2006) Circadian rhythm of free melatonin in human plasma. *J Clin Endocrinol Metabol* 83: 1276–1280.
51. Klein DC, Nambodiri MAA, Auerbach DA (1981) The melatonin rhythm generating system: development aspects. *Life Sci* 28: 1975–1986.
52. Klein DC, Gastel JA, Roseboom PH, Rinaldi PA, Weller JL (1998) Melatonin production: Proteasomal proteolysis in serotonin N-acetyltransferase regulation. *Science* 279: 1358–1360.
53. Klupiec C, Evans G, Love RJ, Kennaway DJ (1997) Clarifying plasma melatonin profiles in domestic pigs: A critical and comparative evaluation of two radioimmunoassay systems. *J Pineal Res* 22: 65–74.
54. Korf HW, Stehle H, Gall v. Ch (2006) Mice, melatonin and the circadian system. *Mol Cell Endocrinol* 252: 57–68.
55. Koster-Van Hoffen G, Mirmiran M, Bos N, Witting W, Delagrangé P, Guardiola-Lemaitre B (1993) Effects of novel melatonin analog on circadian rhythms of body temperature and activity in young, middle-aged, and old rats. *Neurobiology of Aging* 14: 565–569.
56. Kromidas S: *Handbuch Validierung in der Analytik*. Wiley-VCH Verlag, Weinheim, New York, Chichester, Brisbane, Singapore, Toronto, 2003, S. 41–204.

57. Kunkel JG : Analytical Immunological Techniques. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1988, pp. 99-123.
58. Lahiri DK, Ge YW, Sharman EH, Bondy SC (2004) Age-related changes in serum melatonin in mice: higher levels of combined melatonin and 6-hydroxymelatonin sulfate in the cerebral cortex than serum, heart, liver, and kidney tissues. *J Pineal Res* 36: 217-223.
59. Leone RM, Young IM, Silman RE (1979) A routine assay for methoxytryptophol and melatonin in the peripheral circulation using gas-chromatography-mass spectrometry. *J Endocrinol* 99: 641–644.
60. Lerner AB, Case D, Yakahashi T (1958). The structure of melatonin. *J Am Chem Soc* 81: 6084–6085.
61. Leung FC (1991) Circadian rhythms of melatonin release from chicken pineal In Vitro: Modified melatonin radioimmunoassay. *Biol Chem Department* 198: 826–832.
62. Levine L, Riceberg U (1975) Radioimmunoassay for melatonin. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 10: 693–712.
63. Lewy AJ, Markey S (1978) Analysis of melatonin in human plasma by gas chromatography negative chemical ionization-mass spectrometry. *Science* 201: 741–743.
64. Ma X, Morimura K, Kim I, Gonzalez FJ (2006) Pregnane X receptor activation ameliorates DSS-induced inflammatory bowel disease via inhibition of NF-kB target gene expression. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292: 1114–1122.
65. Manz B, Seidel A, Alexander H, Vollrath L, Wagner B, Zimmermann G (1989) Development and validation of a radioimmunoassay for serum melatonin. *J Clin Chem Clin Biochem* 27: 797–802.
66. Mersmann A: Thermische Verfahrenstechnik. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1980, S. 36-122.
67. Müller E: Flüssig-Flüssig-Extraktionen. In: Ullmanns Enzyklopädie der technischen Chemie. Verlag Chemie, Weinheim, 1971, S. 42-88.
68. Mühlbauer E, Gross E, Labucay K, Wolgast S, Peschke E (2009) Loss of melatonin signalling and its impact on circadian rhythms in mouse organs regulating blood glucose. *Eur J Pharmacol* 606: 61-71.
69. Pang SF, Tang F, Tang PL (2005) Negative correlation of age and the levels of pineal melatonin, pineal N-acetylserotonin, and serum melatonin in male rats. *J Exp Zool* 229: 41–47.
70. Patat-Kirchner: Praktikum der technischen Chemie. Walter de Gruyter, Berlin 1986, S. 123-145.
71. Peniston-Bird JF, Di WL, Street CA, Kadva A, Stalteri MA, Silman RE (1993) HPLC assay of melatonin in plasma with fluorescence detection. *Clin Chem* 39: 2242–2247.
72. Peschke E, Peschke D (1998) Evidence for a circadian rhythm of insulin release from perfused rat pancreatic islets. *Diabetologia* 41: 1085–1092.

73. Peschke E, Fauteck JD, Musshoff U, Schmidt F, Beckmann A, Peschke D (2000) Evidence for a melatonin receptor within pancreatic islets of neonate rats: functional, autoradiographic, and molecular investigations. *J Pineal Res* 28: 156–164.
74. Peschke E, Mühlbauer E, Musshoff U, Csernus V, Chankiewicz E, Peschke D (2002) Receptor (MT1) mediated influence of melatonin on cAMP concentration and insulin secretion of rat insulinoma cells INS-1. *J Pineal Res* 33: 63–71.
75. Peschke E, Frese T, Chankiewicz E, Peschke D, Preiss U, Schneyer U, Spessert R, Mühlbauer E (2006) Diabetic Goto Kakizaki rats as well as type 2-diabetic patients show a decreased diurnal serum melatonin level and an increased pancreatic melatonin receptor status. *J Pineal Res* 40: 135-43.
76. Peschke E (2008) Melatonin, endocrine pancreas and diabetes. *J Pineal Res* 44: 26–40.
77. Pierpaoli W, Regelson W (1994) Pineal control of aging: effect of melatonin and pineal grafting on aging mice. *PNAS* 91: 787–791.
78. Plebani M, Masiero M, Burlina AO, Chiozza ML, Scanarini M, Burlina A (1990) Measurement of melatonin in blood by radioimmunoassay. *Child's Nerv Syst* 6: 220–221.
79. Poirel VJ, Boggio V, Dardente H, Pevet P, Masson-Pevet M, Gauer F (2003) Contrary to other non-photoc cues, acute melatonin injection does not induce immediate changes of clock gene mRNA expression in the rat suprachiasmatic nuclei. *Neuroscience* 120: 745–755.
80. Rebollar PG (1999) Determination of plasma melatonin levels by enzyme-linked immunosorbent assay in turbot (*Scophthalmus maximus* L.) and tench (*Tinca tinca* L.). *J Physiol Biochem* 55: 341–348.
81. Reiter RJ (1986) Normal patterns of melatonin levels in the pineal gland and body fluids of humans and experimental animals. *J Neural Transm Suppl* 21: 35–54.
82. Rizzo V, Porta C, Moroni M, Scoglio E, Moratti R (2002) Determination of free and total (free plus protein-bound) melatonin in plasma and cerebrospinal fluid by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatograph* 774: 17–24.
83. Rodbard D, Lewald JE (1970) 2nd Karolinska Symposium. *Acta Endocrinol* 64: 79-103.
84. Rollag MD: Methods for Measuring Pineal Hormones. In: Reiter RJ (ed): *The Pineal Gland*. Boca Raton, 1981, pp. 273–303.
85. Römpp: *Chemie Lexikon*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 1995: S. 150-166.
86. Schumacher M, Nanninga A, Werner R, Olcese J: Advanced Immunoassays for the Direct Determination of Melatonin in Human Serum and Culture Media. In: Olcese J (ed): *Melatonin After Four Decades*. Springer, 2000, pp. 467-472.
87. Selby C (1999) Interference in immunoassay. *Ann Clin Biochem* 36: 704–721.
88. Sieghart W, Ronca E, Drexler G, Karall S (1987) Improved radioimmunoassay of melatonin in serum. *Clin Chem* 33: 604–605.

89. Simpson NJK: *Solid-Phase Extraction: Principles, Techniques, and Applications*. Marcel Dekker AG, Basel, 2000, pp. 364-369.
90. Skubitz KM, Quinn RP, Lietman PS (1982) Rapid acyclovir radioimmunoassay, using charcoal adsorption. *Antimicrob Agents Chemother* 21: 352–354.
91. Soukhthanloo M, Ansari M, Paknejad M, Parizadeh MR, Rasaei MJ (2008) Preparation and characterization of monoclonal antibody against melatonin. *Hybridoma* 27: 205–209.
92. Stehle JH, Gall v. Ch, Korf HW (2002) Organisation of the circadian system in melatonin-proficient C3H and melatonin-deficient C57BL mice: a comparative investigation. *Cell Tiss Res* 309: 173–182.
93. Strobach H: *Kochbuch der immunologischen Analytik, Radioimmunoassay und verwandte Methoden*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 1994: S. 14-61.
94. Sugden D (1989) Melatonin biosynthesis in the mammalian pineal gland. *Cell Mol Li Scie* 45: 922–932.
95. Thoreson TS (1978) Radioimmunoassay for melatonin in human serum. *Scand J Clin Lab Invest* 38: 687–692.
96. Thurman EM: *Solid-Phase Extraction: Principles and Practice*. Wiley-Interscience, 1998, pp. 40-54.
97. Tijssen P: *Practice and Theory of Enzyme Immunoassays*. Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam, 1987, pp. 99-123.
98. Treybeal RE: *Liquid Extraction*. McGraw-Hill Book Company, New York, Toronto, London, 1963, pp. 79-120.
99. Touitou Y (2001) Human aging and melatonin. Clinical relevance. *Exp Gerontol* 36: 1083–1100.
100. Vakkuri O, Leppäluoto, O., Vuolteenaho, O (1984) Development and validation of a melatonin radioimmunoassay using radioiodinated melatonin as tracer. *Acta Endocrinol (Copenh)* 106: 152–157.
101. Vaughan GM (1993) New sensitive serum melatonin radioimmunoassay employing the Kennaway G280 antibody: Syrian hamster morning adrenergic response. *J Pineal Res* 15: 88–103.
102. Vieira R, Miguez J, Lema M, Aldegunde M (2000) Determination of pineal melatonin by precolumn derivatization reversed-phase high-performance liquid chromatography and its application to the study of circadian rhythm in rats and mice. *Anal Biochem* 279: 106–110.
103. von Gall Ch, Lewy C, Schomerus B, Viviani-Roels B, Pevet P, Korf HW, Stehle JH (2000) Transcription factor dynamics and neuroendocrine signalling in the mouse pineal gland: a comparative analysis between melatonin “knockdown” C57BL mice and melatonin-proficient C3H mice. *Eur J Neurosci* 12: 964–972.

104. Waldauser F, Weiszenbacher G, Tatzer E, Gisinger B, Walshauer M, Schemper M, Frisch H (1988) Alterations in nocturnal serum melatonin levels in humans with growth and aging. *J Clin Endocrinol Metab* 66: 648–652.
105. Webley GE, Mehl H, Willey KP (1985) Validation of a sensitive direct assay for melatonin for investigation of circadian rhythms in different species. *J Endocrinol* 106: 387–394.
106. Wetterberg L, Eriksson O, Friberg Y, Vangbo B (1978) A simplified radioimmunoassay for melatonin and its application to biological fluids. Preliminary observations on the half-life of plasma melatonin in man. *Clin Chim Acta* 86: 169–177.
107. Wild D: *The Immunoassay Handbook*. Elsevier, Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo, 2005, pp. 167-177.
108. Wilson BW, Snedden W, Silman RE, Smith I, Mullen P (1977) A gas chromatography-mass spectrometry method for the quantitative analysis of melatonin in plasma and cerebrospinal fluid. *Anal Biochem* 81: 283–291.
109. Wurzbürger RJ, Kawashima K, Miller RL, Spector S (1976) Determination of rat pineal gland melatonin content by a radioimmunoassay. *Life Sci* 18: 867–878.
110. Yeh KC, Kwan KC (1978) A comparison of numerical integrating algorithms of trapezoidal, Legendre and spline approximation. *J Pharmacokinetics Biopharm* 6: 79-98.
111. Yie SM, Johansson E, Brown GM (1993) Competitive solid-phase enzyme immunoassay for melatonin in human and rat serum and rat pineal gland. *Clin Chem* 39: 2322–2325.

7. Thesen

1. Die bisherigen chromatografischen, massenspektrometrischen oder immunologischen Methoden zur Bestimmung von Melatoninkonzentrationen in Mausproben haben Nachteile, wie z.B. einen hohen apparativen Aufwand, aufwendige Probenvorbereitungen bzw. einen hohen Probeneinsatz und geringe Sensitivität.
2. Eine große Anzahl von radioimmunologischen Methoden wurden veröffentlicht. Die bekannten Assays unterscheiden sich z.B. im Gebrauch des Tracers, [^3H]-Melatonin oder [^{125}I]-Melatonin, bei der Herstellung des Immunisierungskonjugats für die Antikörpergewinnung, der Probenvorbereitung und den Extraktionsmethoden.
3. Durch die Herstellung einer spezifischen Mausausgleichsmatrix wurde die Beeinflussung von Messergebnissen aufgrund unterschiedlicher Zusammensetzung zwischen Standards und Probenmatrix verringert. Ca. 90 % des endogenen Melatonins wurde aus der Matrix extrahiert. Mit der vorgestellten Methode ist es möglich, Melatonin in Mausproben, direkt und ohne aufwendige Probenvorbereitungen und mit einem Probenvolumen von nur 50 μL , zu bestimmen.
4. Durch ein geeignetes Syntheseverfahren zur Herstellung eines Immunisierungskonjugats wurde ein spezifischer und sensitiver Antikörper gegen Melatonin gewonnen. Der Titer wurde bei 1:5000 eingestellt. Die Überprüfung der Kreuzreaktion hat gezeigt, dass Melatonin ohne Verfälschung durch strukturähnliche Substanzen erfasst und eindeutig identifiziert werden kann.
5. Durch die Einführung eines Enzymschritts wird das reversibel gebundene Melatonin von Proteinen getrennt. Die einfache Probenvorbereitung mit Pepsin ermöglicht das Gesamt-Melatonin in Mausproben zu bestimmen. Aufgrund der Tatsache, dass dieser Test das gesamte Melatonin erfasst, werden im Vergleich zu anderen Testsystemen höhere Werte gefunden.
6. Die meisten bisher entwickelten RIA zur Bestimmung von Melatonin verwenden [^3H]-Melatonin als Tracer. In dieser Arbeit erfolgte die Markierung durch Einführung eines [^{125}I]-haltigen Substituenten in das Molekül. 5-Methoxytryptamin wurde mit [^{125}I]-Bolton-Hunter-Reagenz iodiert. Die Markierung des Tracers ist reproduzierbar und liefert zuverlässige Ergebnisse bei der Melatoninbestimmung.

7. Ebenso hatte die Validierung des „Direkt-RIA“ gezeigt, dass das Analysenverfahren plausible, reproduzierbare und verlässliche Resultate liefert. Folgende Validierungsparameter wurden überprüft: Typische Standardkurve und Arbeitsbereich; Nachweisgrenze; Wiederfindungsrate; Linearität; Präzision; Probenstabilität; Robustheit und Spezifität.
Die Akzeptanzkriterien wurden erfüllt. Damit wurde nachgewiesen, dass der RIA geeignet ist, Melatonin in Mausproben zu bestimmen.
8. Diurnale Rhythmen sind durch eine endogene Periodenlänge von ungefähr 24 h (20-28 h) charakterisiert. Dabei treten in der Nacht hohe und am Tag niedrige Melatoninwerte auf. Mit dem entwickelten „Direkt-RIA“ ist es bei Kontroll-Mäusen gelungen, niedrige Melatoninkonzentrationen den Tages- und hohe Melatoninkonzentrationen den Nachtzeiten zuzuordnen.
9. Die Direkt-Methode korreliert sehr gut zur Methanol-Extraktion. Bei der Festphasenextraktion zeigt die niedrigere Wiederfindungsrate, dass es zu einem Analytenverlust kommt. Mit der Einführung einer Maus-spezifischen Ausgleichsmatrix und des vorangestellten Enzymschritts ist eine Bestimmung von Melatonin in Mausproben auch ohne aufwendige Extraktionsschritte möglich.
10. Bei einem Testvergleich zu einem kommerziell erhältlichen RIA konnte der „Direkt-RIA“ durch sein niedriges Probenvolumen und einfache Durchführung überzeugen. Die Darstellung eines 24-h Profils von endogenem Melatonin im Mausserum und der Unterschied zwischen niedrigen Tag- bzw. hohen Nachtwerten ist mit dem „Direkt-RIA“ deutlicher.
11. Mithilfe des entwickelten „Direkt-RIA“ ist es gelungen, die Melatoninkonzentration bei vier unterschiedlichen Mauslinien zu bestimmen. Die detektierten Werte lagen über der Nachweisgrenze und im linearen Bereich der Standardkurve. Mit dem „Direkt-RIA“ ist es möglich, niedrige Tag- und hohe Nachtwerte zu erfassen und einen diurnalen Rhythmus des Melatoninspiegels bei unterschiedlichen Mauslinien nachzuweisen.

Lebenslauf**Persönliche Daten**

18.08.1971 geboren in Ankum

Schulausbildung

1990 bis 1993 Gymnasium Bersenbrück mit dem Abschluss der Allgemeinen Hochschulreife

Wehrdienst

1993 bis 1994 Transportbataillon 11, Transportgruppe, Logistik in Dörverden, Niedersachsen

Studium

1995 bis 2000 Studium der Biotechnologie an der Hochschule Gießen
Abschluss: Dipl. Ing. für Biotechnologie

Beruflicher Werdegang

September 1999 Anfertigung der Diplomarbeit mit dem Thema: „Herstellung eines Boronat-Affinitätsgels zur Extraktion von cis-Diolen aus biologischen Proben“ bei LDN.

März 2000 Abschlussprüfung zum Dipl.-Ing. für Biotechnologie

März 2000 Anstellung bei Labor Diagnostika Nord GmbH & Co KG in Nordhorn als Dipl.-Ing. für Biotechnologie

April 2000 Laborleitung Abteilung Produktion Westernblot

August 2000 Erwerb der Qualifikation eines Qualitätsmanagement-beauftragten für das Umfeld Labor, Chemie und Analytik

Oktober 2002 Projektleitung Forschung und Entwicklung

Mai 2003 Ausbilder-Eignungsprüfung mit Abschluss vor der Handwerkskammer Osnabrück

Februar 2004 Übernahme der Funktionen eines Sicherheitsbeauftragten für Medizinprodukte

Oktober 2004 Qualitätskontrollleiter und Validierungsverantwortlicher

Seit Januar 2006 Promotion am Institut für Anatomie und Zellbiologie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Selbständigkeitserklärung

Die vorliegende Arbeit wurde von mir ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen habe. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

André Welp
Kettenkamp,

Erklärung über Promotionsversuche

Ich erkläre, dass ich keinerlei frühere Promotionsversuche unternommen habe und dass an keiner anderen Fakultät oder Universität ein Promotionsverfahren anhängig ist.

André Welp
Kettenkamp,

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denen danken, die mir bei der Anfertigung dieser Arbeit geholfen haben.

Mein ganz besonderen Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. habil. Elmar Peschke für die Überlassung des Promotionsthemas und der stets umfangreichen und sehr liebevollen Unterstützung bei der Bearbeitung der Aufgabenstellungen.

Ganz herzlich möchte ich mich beim gesamten Team der Labor Diagnostika Nord (LDN) für die Hilfsbereitschaft und Kollegialität und bei Herrn Dr. Bernhard Manz für die Möglichkeit, diese Arbeit bei LDN durchzuführen, bedanken.

Insbesondere möchte ich auch meinen Eltern und Großeltern danken, die mich jederzeit persönlich unterstützt und mir den Rücken gestärkt haben.

Ich möchte mich auch bei Ulla und Dieter Brinkmann bedanken, die immer ein sehr großes Interesse an meiner Arbeit zeigten.

Ohne die Unterstützung und unermüdliche Motivation meiner Frau Anja wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Danke für Dein Verständnis und Deine Geduld.