

**Ascorbinsäure und Ascorbinsäuresynthese  
bei Invertebraten  
– eine vergleichende Analyse**

von

Dietmar Glaubitz

aus Holzminden

im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie

der Freien Universität Berlin eingereichte Dissertation

2004

**1. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Bartolomaeus (FU Berlin)**

**2. Gutachter: Prof. Dr. Dietmar Kuhl (FU Berlin)**

**Datum der Disputation: 05.11.2004**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

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

Berlin, den

Dietmar Glaubitz



# Inhalt

<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Vorkommen und Evolution der Ascorbinsäuresynthese bei den Vertebraten	2
1.1.1 Evolution der Synthesefähigkeit	4
1.1.2 Molekulare Daten für die phylogenetische Analyse der Gulonolacton-Oxidase	6
1.2 Bisherige Untersuchungen des Ascorbinsäurebedarfs an Wirbellosen	7
1.2.1 Untersuchungen an Dipteren unter besonderer Berücksichtigung von <i>Drosophila melanogaster</i> und die Rolle von Symbionten	9
1.2.2 Untersuchungen an Blattariae	11
1.2.3 Untersuchungen an Lepidopteren unter besonderer Berücksichtigung von <i>Manduca sexta</i>	12
1.2.4 Untersuchungen an weiteren Insekten	14
1.2.5 Untersuchungen an Crustaceen unter besonderer Berücksichtigung der Malacostraca	15
1.2.6 Untersuchungen an Nematoden	16
1.3 Biochemische Untersuchungen der Ascorbinsäuresynthese bei Invertebraten	16
1.4 Funktionen der Ascorbinsäure bei Invertebraten	17
1.4.1 Ascorbinsäure als Antioxidanz	17
1.4.2 Die Rolle der Ascorbinsäure in der Kollagensynthese	18
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>21</b>
2.1 Enzymtest	21
2.1.1 Material für den Enzymtest und die HPLC-Messung	21
2.1.1.1 Gesammeltes Tiermaterial	21
2.1.1.2 Chemikalien für den Enzymtest	22
2.1.1.3 Für den Enzymtest verwendete Lösungen	22
2.1.1.4 Für den Enzymtest und HPLC-Messung eingesetzte Geräte	23
2.1.1.5 Software für die Auswertung der Ergebnisse des Enzymtests	23
2.1.2 Methodik des Enzymtests und der HPLC-Messung	24
2.1.2.1 Aufbereitung der Proben	24

2.1.2.2 Eichung der Ascorbinsäuremessungen	24
2.1.2.3 HPLC-Messung der Ascorbinsäurekonzentration und der Erythroascorbinsäure	25
2.1.2.4 Messung der Ascorbinsäure bei verschiedenen Wellenlängen	26
2.1.2.5 HPLC-Messung der Dehydroascorbinsäure	26
2.2 Histochemischer Nachweis der Gulonolacton-Oxidase (GLO)	26
2.2.1 Material für den histochemischen Nachweis der GLO	26
2.2.1.1 Material an Tieren für den histochemischen Nachweis der Gulonolacton-Oxidase	26
2.2.1.2 Chemikalien für den histochemischen Nachweis der GLO	27
2.2.1.3 Geräte für den histochemischen Nachweis der GLO	27
2.2.2 Methodik des histochemischen Nachweises der Gulonolacton-Oxidase	27
2.2.2.1 Anfertigung der Kryo-Schnitte	27
2.2.2.2 Inkubation und Dokumentation	27
2.3 Elektronenmikroskopische Überprüfung auf Endosymbionten	28
2.3.1 Material für die Elektronenmikroskopie	28
2.3.1.1 Tiere für die elektronenmikroskopische Untersuchung	28
2.3.1.2 Chemikalien für die Elektronenmikroskopie	28
2.3.1.3 Geräte für die Elektronenmikroskopie	29
2.3.2 Methodik der Elektronenmikroskopie	29
2.3.2.1 Fixierung und Einbettung	29
2.3.2.2 Anfertigung der Schnitte, Kontrastierung und Dokumentation	29
2.4 Molekulare Untersuchungen	29
2.4.1 Material für molekulare Untersuchungen	29
2.4.1.1 Tiere für die molekularen Untersuchungen	29
2.4.1.2 Chemikalien für die molekularen Untersuchungen	30
2.4.1.3 Kits	31
2.4.1.4 Primer	31
2.4.1.5 Geräte für molekulare Untersuchungen	32
2.4.1.6 Software für die Auswertung der Daten	32
2.4.1.7 Gen-Datenbanken	32

2.4.2 Methodik der DNA-Extraktion, PCR, Gel-Elektrophorese und Sequenzierung	33
2.4.2.1 Extraktion der DNA	33
2.4.2.2 PCR	33
2.4.2.3 Aufbereitung der PCR-Proben	33
2.4.2.4 Extraktion aus dem Elektrophorese-Gel	33
2.4.2.5 Sequenzierung	33
2.4.3 Auswertung der Daten	33
<b>3 Ergebnisse</b>	<b>35</b>
3.1 Absicherung der Ascorbinsäuremessung	35
3.2 Messung der Dehydroascorbinsäure	37
3.3 Enzymtest	38
3.3.1 Enzymtest an <i>Sagartiogeton undatus</i>	39
3.3.2 Enzymtest an <i>Metridium senile</i>	40
3.3.3 Enzymtest an <i>Alcyonium digitatum</i>	42
3.3.4 Enzymtest an <i>Thuiaria thuja</i>	45
3.3.5 Enzymtest an <i>Chondrosia reniformis</i>	45
3.3.6 Enzymtest an <i>Ciona intestinalis</i>	47
3.3.7 Enzymtest an <i>Branchiostoma lanceolatum</i>	49
3.4 Erythroascorbinsäure	50
3.4.1 Absicherung der Messung der Erythroascorbinsäure mit Hilfe der Messung an <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	50
3.4.2 Messung der Erythroascorbinsäure bei Vertretern der Cnidaria	52
3.4.3 Einfluss der Temperatur auf die Konzentration der Erythroascorbinsäure	53
3.5 Histochemischer Nachweis der Gulonolacton-Oxidase	55
3.5.1 Histochemischer Nachweis der GLO bei <i>Metridium senile</i>	55
3.5.2 Histochemischer Nachweis der GLO bei <i>Alcyonium digitatum</i>	57
3.6 Elektronenmikroskopie	58
3.7 Molekulare Daten	58
3.8 Phylogenetische Analyse	60
3.8.1 Einordnung der biochemischen Daten	60
3.8.2 Einordnung der molekularen Daten	62

<b>4 Diskussion</b>	<b>63</b>
4.1 Diskussion der Methoden	64
4.1.1 Biochemische Untersuchung der Ascorbinsäuresynthese	64
4.1.1.1 Test auf ein Gulonolacton oxidierendes Enzym	64
4.1.1.2 Messverfahren für die quantitative Bestimmung der Ascorbinsäure	69
4.1.2 Methode des histochemischen GLO-Nachweis	72
4.1.3 Ausschluss von endosymbiontischen Organismen	73
4.1.4 Molekulare Untersuchungen und die phylogenetische Einordnung der Daten	73
4.2 Diskussion der Ergebnisse	75
4.2.1 Ergebnisse der biochemischen Untersuchung der Ascorbinsäuresynthese	75
4.2.1.1 Porifera	76
4.2.1.2 Cnidaria	76
4.2.1.3 Tunicata	77
4.2.1.4 Acrania	79
4.2.2 Ergebnisse aus der Histochemie	79
4.2.3 Ausschluss der Endosymbionten	80
4.2.4 Molekulare Ergebnisse	84
4.3 Stammbäume	85
<b>5 Zusammenfassung</b>	<b>87</b>
<b>6 Summary</b>	<b>89</b>
<b>7 Literatur</b>	<b>91</b>
<b>8 Anhang</b>	<b>110</b>

