

2 Material und Methoden

2.1 Enzymtest

2.1.1 Material für den Enzymtest und die HPLC-Messung

2.1.1.1 Gesammeltes Tiermaterial

Alle Tiere, die für den Enzymtest verwendet wurden, sind in der Tabelle 2.1 aufgeführt. Die marinen Tiere wurden im Flachwasserbereich gesammelt oder von der Biologischen Anstalt Helgoland (Stiftung Alfred-Wegener-Institut) lebend versendet. Sie wurden bis zu ihrer Verwendung in einem Meerwasseraquarium gehältert. *Lithobius forficatus* und *Thermobia domestica* wurden in Glasgefäßen aufbewahrt, die mit einer Gaze abgedeckt waren.

Tab. 2.1: Die Wirbellosen, die für den Enzymtest verwendet wurden und deren Herkunft.

Taxon	Art	Herkunft
Porifera		
Demospongia	<i>Chondrosia reniformis</i>	Elba (Italien)
Cnidaria		
Anthozoa, Octocorallia	<i>Alcyonium digitatum</i>	Helgoland (Deutschland)
Anthozoa, Hexacorallia	<i>Aiptasia sp.</i>	Seewasseraquarium der Universität Bielefeld (Deutschland)
Anthozoa, Hexacorallia	<i>Metridium senile</i>	Helgoland (Deutschland)
Anthozoa, Hexacorallia	<i>Sargatiogeton undatus</i>	Concarneau (Frankreich)
Anthozoa, Hexacorallia	<i>Anemonia sulcata</i>	Concarneau (Frankreich)
Hydrozoa	<i>Thuiaria thuja</i>	Helgoland (Deutschland)
Arthropoda		
Chilopoda	<i>Lithobius forficatus</i>	Bienengarten Universität Bielefeld (Deutschland)
Crustacea, Decapoda	<i>Carcinus maenas</i>	Helgoland (Deutschland)
Insecta, Zygentoma	<i>Thermobia domestica</i>	Bielefeld, Zucht (Deutschland)
Chordata		
Tunicata	<i>Ciona intestinalis</i>	Helgoland (Deutschland)

2.1.1.2 Chemikalien für den Enzymtest

Die Chemikalien, die für den Enzymtest und für die HPLC-Messung verwendet wurden und deren Herkunft sind in der Tabelle 2.2 zusammengestellt.

Tab. 2.2: Auflistung der Chemikalien für den Enzymtest, die Messung der Ascorbinsäure und der Dehydroascorbinsäure.

Chemikalie	Qualität	Firma
Enzymtest		
Ethylendinitrilotetraessigsäure (EDTA)	p.A.	Merck, Darmstadt
L-Galactono-1,4-lacton	p.A. 99%	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Gulono-1,4-lactone	p.A. 98%	Sigma-Aldrich, Steinheim
Gluthation (GSH)	Sigma Ultra	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kaliumhydroxid	p.A.	Merck, Darmstadt
Perchlorsäure	70 %	T.J. Baker Analysis, Holland
Laufmittel		
Natriumoctylhydrogensulfat	p.A.	Sigma-Aldrich, Steinheim
di-Natriumphosphat (Na ₂ PO ₄)	p.A.	Merck, Darmstadt
Ethylendinitrilotetraessigsäure (EDTA)	p.A.	Merck, Darmstadt
Standart-Reinstoffe		
L-Ascorbinsäure	p.A.	Merck, Darmstadt
D-Isoascorbinsäure	p.A.	Sigma-Aldrich, Steinheim
Reduktionsmittel		
Dithiothreitol (DTT)	p.A.	Sigma-Aldrich, Steinheim

2.1.1.3 Für den Enzymtest verwendete Lösungen

12% Perchlorsäure

6 M Kaliumhydroxid-Lösung

50 mM Gluthation-Lösung

100 mM L-Gulono-1,4-lacton-Lösung

100 mM L-Galactono-1,4-lacton-Lösung

Puffer A (Natriumphosphatpuffer):

50 mM di-Natriumphosphat

1 mM Ethylendinitrilotetraessigsäure (EDTA)

Der Puffer A war ein wässriger Natriumphosphat-Puffer. Er enthielt 50 mM Na_2HPO_4 und 1 mM EDTA. Mit Ortho-Phosphorsäure wurde der Puffer A auf einen pH-Wert von 6,8 eingestellt.

Laufmittel:

Die mobile Phase war ein wässriger Natriumphosphat-Laufmittelpuffer, bestehend aus 100 $\mu\text{M/l}$ Na_2PO_4 , 70 μM EDTA und 150 μM Natriumoctylhydrogensulfat. Mit Phosphorsäure wurde das Laufmittel auf einen pH-Wert von 3,1 eingestellt. Das Wasser für das Laufmittel wurde mit einer Milli-Q® Reinstwasseranlage Millipore „Academic“ aufgereinigt.

2.1.1.4 Für den Enzymtest und HPLC-Messung eingesetzte Geräte

Homogenisierer: IKA-Werk, Ultra-Turrax TP 18/10

Zentrifuge: Kühlbare Labofuge 400R, Rotor #3765 Firma Heraeus

HPLC-Anlage:

Entgaser Degasys DG-1310

Pumpe LKB Bromma 2150 HPLC Pump

Detektor LKB Bromma 2141 Variable Wavelength Monitor (gewählte Wellenlänge 255 nm)

Schreiber Shimadzu C-R3A Chromtopac

HPLC-Trennsäule Merck LiChroCART® 250-4 (5 μm) Superspher® 60 RP-Select B

Vorsäule Merck LiChroCART® (5 μm) 4 x 4 mm

2.1.1.5 Software für die Auswertung der Ergebnisse des Enzymtests

Es wurde das Statistikprogramm STATISTICA von der Firma StatSoft, Inc. eingesetzt (Copyright 1984-1999). Als Verfahren wurde eine nichtparametrische Kluska-Wallis-ANOVA eingesetzt, nachdem die Daten mit dem K-S/Lilliefors-Normalverteilungstest auf Normalverteilung überprüft worden waren.

2.1.2 Methodik des Enzymtests und der HPLC-Messung

2.1.2.1 Aufbereitung der Proben

Die Aufbereitung der Proben wurde nach einer Methode von DABROWSKI (1990) durchgeführt. Die Methode wurde in Bezug auf die Reaktionstemperatur von 25 °C auf 4 °C geändert, nachdem die Synthese bei 20 °C und 10 °C experimentell bei *Alcyonium digitatum* nicht nachgewiesen werden konnte (3.3.3, Abb. 3.6). Außerdem stabilisierte die niedrige Temperatur von 4 °C die Ascorbinsäure (3.3.6 Abb. 3.12). Die Zentrifugation wurde zudem nicht mit Desoxycholat durchgeführt, da WALLACE ET AL. (1985) eine negative Wirkung dieser Substanz auf den Enzymtest an *Limulus polyphemus* feststellten.

Von den untersuchten Tieren wurde ein Teil des Gewebes (0,3-0,5g) eingewogen und mit 2,5-4 ml 50 mM Puffer A (Natriumphosphat-Puffer 50 mM Na₂HPO₄, 1 M EDTA; pH 6,8) und 100 µl GSH 50 mM im IKA-Werk Ultraturrax (TP 18/10) 0,5 min homogenisiert. Das Homogenat wurde mit 13.300 g 5 min zentrifugiert um größere Proteinmoleküle abzutrennen. 2 ml des Überstands wurden mit 220 µl 100 mM L-Gulono-1,4-lacton oder 220 µl 100 µM L-Galactono-1,4-lacton versetzt und gevortext. Aus diesem Ansatz wurde die erste Probe sofort entnommen und weitere Entnahmen erfolgten nach 20, 40, 60 min und jeweils immer 20 min nach der vorher entnommenen Probe. Es wurden jeweils 250 µl der Lösung entnommen und in ein Eppendorfgefäß mit 150 µl 12% Perchlorsäure und 50 µl NaPO₄-Puffer pH 6,8 0,1 mM EDTA pipettiert, gevortext und für 2 min mit 13.300 g zentrifugiert. 300 µl des Überstands wurden auf 18 µl 6 M NaOH-Lösung pipettiert, gevortext und nach 2 min Reaktionszeit 2 min lang mit 13300 g zentrifugiert. Aus der so aufbereiteten Probe konnte ein Teil für die Messung der Konzentration der Ascorbinsäure entnommen werden. Die Zentrifugation und alle weiteren Schritte wurden bei 4 °C durchgeführt (Abb. 2.1).

2.1.2.2 Eichung der Ascorbinsäuremessungen

Die Ascorbinsäure wurde mit einem HPLC-Verfahren (siehe 2.1.4.3) gemessen. Die Konzentration der Ascorbinsäure wurde nach der chromatographischen Trennung in der Messzelle des Detektors, einem Durchfluss-Photometer, aufgenommen. Die Extinktion pro Zeit des Durchflusses durch die Messzelle wurde in mV/min mit dem Schreiber dokumentiert. Für die quantitative Bestimmung der L-Ascorbinsäure wurde eine Eichreihe mit definierten Konzentrationen der L-Ascorbinsäure von 1 mM bis 20 mM Ascorbinsäure gemessen. Die Abbildung der Eichkurve befindet sich im Anhang (Abb. 8.1). Die Proben der Eichung wurden genau wie die Proben zur Bestimmung der Konzentration der L-Ascorbinsäure behandelt. Bei der Messung der L-Ascorbinsäure in einer biologischen Ma-

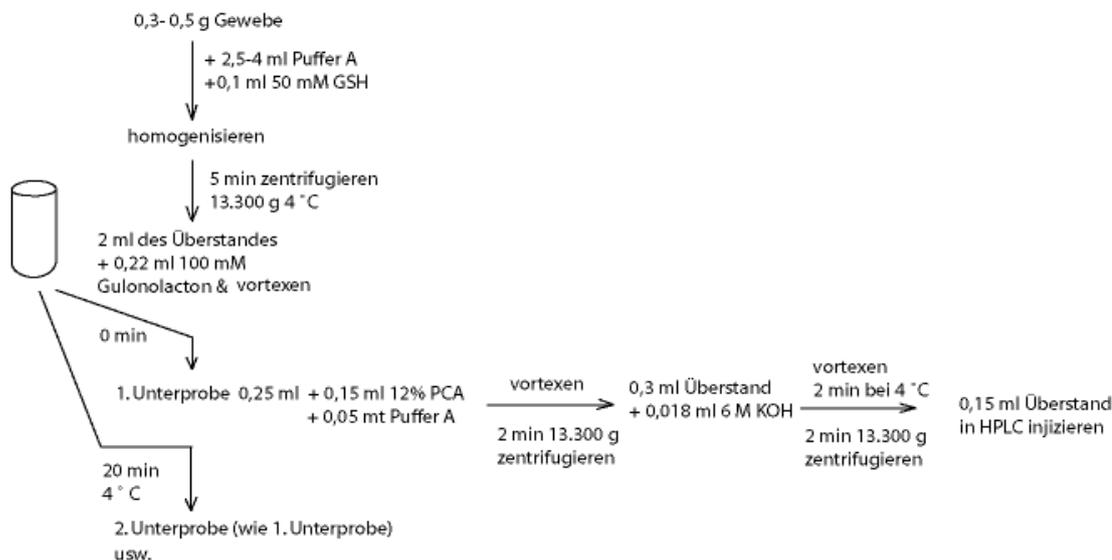


Abb. 2.1: Schemazeichnung der Arbeitsschritte des Enzymtests. Die Unterproben wurden sofort (0 min) nach 20, 40, 60 min usw. entnommen.

trix lag die Retentionszeit (Rt) der Ascorbinsäure auf einem späteren Zeitpunkt als die Rt des Eich-Standarts. Um mögliche Schwankungen der Rt der Ascorbinsäure zu erkennen, wurde ein innerer Standard mit L-Ascorbinsäure gemessen. Diese Überprüfung der Rt mit einem inneren Standard wurde für jede Messreihe durchgeführt.

2.1.2.3 HPLC-Messung der Ascorbinsäurekonzentration und der Erythroascorbinsäure

Für die quantitative Analyse der Ascorbinsäure wurde ein Verfahren von REIBER ET AL. (1993) leicht abgeändert eingesetzt. Das Laufmittel wurde im Durchfluss mit einem Degasys DG-1310 Entgaser von Luftblasen befreit. Die Detektion mit einem 2141 Variable Wavelength Monitor fand bei der Wellenlänge von 250 nm statt. Der Schreiber C-R3A Chromtopac nahm die Daten für die Dokumentation auf. Die Injektion der Proben erfolgte mit einer 250 µl Exmire Micro Syringe MS-R 250 über ein Rheodyne Ventil auf eine 50 µl Probenschleife. Als Trennsäule wurde eine Umkehrphasensäule von der Firma Merck, eine LiChroCART® 250-4 (5 µm) Superspher® 60 RP-Select B mit der Vorsäule LiChroCART® (5µm) 4 x 4 mm eingesetzt.

Es wurde ein Fluss von 0,5 ml/min an der LKB Bromma 2150 HPLC Pump eingestellt. Daraus resultierte ein Druck von 12 MPa. Jeder Probenlauf wurde über 20 min aufgenommen. Die Ascorbinsäure hatte dabei eine Retentionszeit (Rt) von ca. 5,4 min und die Erythroascorbinsäure eine Rt von ca. 5,2 min. Mit einem inneren Standard wurde die Rt

der L-Ascorbinsäure pro Messreihe überprüft, da leichte Schwankungen der Rt durch äußere Einflüsse, wie Änderung der Temperatur oder des Luftdrucks auftreten konnten.

2.1.2.4 Messung der Ascorbinsäure bei verschiedenen Wellenlängen

Die beiden stereoisomeren Formen der Ascorbinsäure, die L-Ascorbinsäure und die D-Isoascorbinsäure, konnten mit dem hier beschriebenen Trennverfahren nicht voneinander separiert werden (siehe 3.1 Abb.3.1). Um einen Hinweis zu bekommen, um welche der beiden Stereoisomere es sich handelt, wurde eine 50 mM Standardlösungen von L-Ascorbinsäure und eine 50 mM Standardlösung D-Isoascorbinsäure jeweils bei den Wellenlängen 200, 210, 220, 230, 240, 250, 270 und 280 nm geprüft. Die Peakflächen wurden gegen die Wellenlängen aufgetragen. Mit den daraus entstandenen Profilen wurde das Profil des Gewebehomogenates von der Anthozoe *Sargatiogeton undatus*, das zuvor mit L-Gulonolacton versetzt wurde, bei den Wellenlängen 230, 240, 250 und 260 nm verglichen.

2.1.2.5 HPLC-Messung der Dehydroascorbinsäure

Mit der HPLC-Messung war Dehydroascorbinsäure (DHA) nicht erfassbar. Sie musste erst durch Reduktion in Ascorbinsäure umgewandelt werden. Die DHA konnte nur indirekt gemessen werden. Dazu wurde zuerst von einem Teil der Probe die Konzentration der Ascorbinsäure bestimmt. Nach WUNDERLING et al. (1984) wurde mit dem Reduktionsmittel Dithiothreitol (DTT) ein weiterer Teil der Probe zur Ascorbinsäure reduziert. Es wurden 50 µl einer 1 mM DTT-Lösung auf 1,2 ml Probenlösung gegeben und nach eine Reaktionszeit von 30 min die zweite Messung der Gesamtascorbinsäure durchgeführt. Die Differenz dieser beiden Werte ergab die Konzentration der DHA.

2.2 Histochemischer Nachweis der Gulonolacton-Oxidase (GLO)

2.2.1 Material für den histochemischen Nachweis der GLO

2.2.1.1 Material an Tieren für den histochemischen Nachweis der Gulonolacton-Oxidase

Die Tiere für die histochemische Untersuchung der Gulonolacton-Oxidase waren die beiden Vertreter der Cnidaria *A. digitatum* und *Metridium senile*. Sie wurden von der Biologischen Anstalt Helgoland (Stiftung Alfred-Wegener-Institut) lebend verschickt und wurden bis zu ihrer Verwendung in einem Seewasseraquarium aufbewahrt. Die Kryofixierung der Tiere fand im Kryomikroton bei minus 40 °C statt.

2.2.1.2 Chemikalien für den histochemischen Nachweis der GLO

Die für den histochemischen Nachweis der Gulonolacton-Oxidase verwendeten Chemikalien sind mit ihrer Herkunft in der Tabelle 2.3 aufgelistet.

Tab. 2.3: Die Chemikalien für den histochemischen Enzymnachweis der Gulonolacton-Oxidase und deren Herkunft.

Chemikalie	Firma
Aquatex	Merck, Darmstadt
Chromatrix Frozen Specimen Embedding Medium	Thermo Shandon, USA
Nitro Blue Tetrazolium (nitro BT)	Sigma Aldrich, Steinheim
Phenazin Metosulfat (PMS)	Sigma Aldrich, Steinheim
Formaldehyd 37%	Merck, Darmstadt
Kaliumcyanid (KCN)	Sigma, Deisenhofen
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt

2.2.1.3 Geräte für den histochemischen Nachweis der GLO

Kryomikrotom: Thermo Shandon Cryotome SME (Special Motorised Electronic)

Lichtmikroskop: Olympus BX 50

Kamera: Polaroid Digitalkamera

2.2.2 Methodik des histochemischen Nachweises der Gulonolacton-Oxidase

2.2.2.1 Anfertigung der Kryo-Schnitte

Die Methode von NAKAJIMA ET AL. (1969) des histochemischen Nachweises der Gulonolacton-Oxidase wurden leicht modifiziert bei *A. digitatum* und *M. senile* angewendet. Dazu wurde ein Individuum von *M. senile* oder ein Stück von einer Kolonie von *A. digitatum* in Chromatrix Frozen Specimen Embedding Medium eingebettet und im Kryomikrotom auf minus 40 °C herunter gekühlt. Mit dem Kryomikrotom wurden dann zehn Mikrometer dicke Schnitte angefertigt und mit einem Objektträger aufgenommen.

2.2.2.2 Inkubation und Dokumentation

Die Objektträger mit den Schnitten wurden für 30 min, bei 20 °C in einer Lösung inkubiert, die aus 40 mg L-Gulonolacton, 10 mg Nitro Blue Tetrazolium (nitro BT), 0,2 ml

0,2% Phenazin Metosulfat (PMS) und 0,13 mg Kaliumcyanid (KCN) bestand und in 15 ml 0,2 M Phosphate Puffer gelöst wurde. Weil die Substanz PMS lichtsensitiv ist wurde die Inkubation im Dunkeln durchgeführt. Nach der Inkubation wurden die Schnitte zweimal mit 0,9% Kochsalzlösung (NaCl) gewaschen. Anschließend wurden sie mit 10% Formaldehydlösung für 10 min fixiert und zwei bis dreimal mit Wasser ausgewaschen. Schließlich wurden die Schnitte mit Aquatex unter Deckgläschen eingedeckelt. Diese Präparate wurden mit dem Lichtmikroskop untersucht und fotografiert.

2.3 Elektronenmikroskopische Überprüfung auf Endosymbionten

2.3.1 Material für die Elektronenmikroskopie

2.3.1.1 Tiere für die elektronenmikroskopische Untersuchung

Das Tier für die transmissions-elektronenmikroskopische Untersuchung war *A. digitatum*. Es wurde von der Biologischen Anstalt Helgoland (Stiftung Alfred-Wegener-Institut) lebend versendet und in einem Seewasseraquarium aufbewahrt. Ein Stück aus einer Kolonie von *A. digitatum* wurde sofort in Glutaraldehyd fixiert.

2.3.1.2 Chemikalien für die Elektronenmikroskopie

Die Chemikalien, die für die Fixierung und Einbettung der Tiere eingesetzt wurden und deren Herkunft, sind in der Tabelle 2.4 aufgeführt.

Tab. 2.4: Die Chemikalien für die Elektronenmikroskopie und deren Herkunft

Chemikalie	Firma
Glutaraldehyd	Fluka/Riedel-de Haën, Seelze
Rutheniumrot	Chroma Technology Corp., USA
Osmiumtetroxid	Plano, Wetzlar
Bleicitrat Ultrastain II	Leica, Wien Österreich
Uranylacetat Ultrastain I	Leica, Wien Österreich
Propylenoxid	Fluka/Riedel-de Haën, Seelze
BDMA-Beschleuniger	Plano, Wetzlar
Araldit M	Plano, Wetzlar
Araldit Härter	Plano, Wetzlar
Aceton	Roth, Karlsruhe
Natriumcacodylat	Merck, Darmstadt

2.3.1.3 Geräte für die Elektronenmikroskopie

Ultramikrotom REICHERT Ultracut S

Leica Ultrastain

Philips CM 100

2.3.2 Methodik der Elektronenmikroskopie

2.3.2.1 Fixierung und Einbettung

Ein Stück aus einer Kolonie von *A. digitatum* wurde in 2,5% Glutaraldehydlösung, die mit 0,1 M Natriumcacodylatpuffer auf pH 7,2 eingestellt worden war, bei 4 °C fixiert. Diesem Fixativ wurde etwas Rutheniumrot zugesetzt, das die extrazelluläre Matrix anfärbt. Nach Ablauf einer Stunde wurde das Primärfixativ mit 0,1 M Natriumcacodylatpuffer (pH7,2) ausgewaschen und das Präparat über Nacht im Kühlschrank bei 4 °C gelagert. Mit einer 1% Osmiumtetroxydlösung in 0,1 M Natriumcacodylatpuffer wurde das Präparat eine Stunde nachfixiert. Im Anschluss wurden die Tiere über eine aufsteigende Acetonreihe entwässert und in Propylenoxid überführt. Danach wurde das Präparat in Gemische aus 3:1, 1:1 und 1:3 Volumenanteilen Propylenoxid zu Araldit und zuletzt in reines Araldit gebracht.

2.3.2.2 Anfertigung der Schnitte, Kontrastierung und Dokumentation

Am Ultramikrotom REICHERT Ultracut S wurden silbern interferierende Serienschritte mit einer Schnittdicke von 65-75 nm angefertigt. Die Schnitte wurden 30 min lang in Uranylacetatlösung bei 30 °C und in Bleicitratlösung für 25 min bei 25 °C im Leica Ultrastain kontrastiert. Mit dem Elektronenmikroskop Philips CM 100 wurden die Schnitte auf die Anwesenheit symbiontischer Organismen im Gewebe von *A. digitatum* überprüft.

2.4 Molekulare Untersuchungen

2.4.1 Material für molekulare Untersuchungen

2.4.1.1 Tiere für die molekularen Untersuchungen

Das für die molekularen Untersuchungen verwendete Tiermaterial und dessen Herkunft ist in der Tabelle 2.5 aufgelistet. Die Tiere wurden im Flachwasserbereich gesammelt und in unvergälltem 98%igen Alkohol fixiert oder von der Biologischen Anstalt Helgoland (Stiftung Alfred-Wegener-Institut) in unvergälltem 98%igen Alkohol versendet. Bis zu der DNA-Extraktion wurden die Präparate bei 4 °C aufbewahrt.

Tab. 2.5: Die Tiere, die mit den molekularen Methoden untersucht worden sind und deren Herkunft

Taxon	Art	Herkunft
Echinodermata		
	<i>Asteria rubens</i>	Helgoland (Deutschland)
	<i>Astropecten irregularis</i>	Helgoland (Deutschland)
	<i>Psammechinus miliaris</i>	Helgoland (Deutschland)
Bryozoa		
	<i>Flustra foliacea</i>	Helgoland (Deutschland)
	<i>Electra crustulenta</i>	Helgoland (Deutschland)
Acrania		
	<i>Branciostoma lanceolatum</i>	Helgoland (Deutschland)
Tunicata		
	<i>Oikopleura dioica</i>	Helgoland (Deutschland)
	<i>Asciidiella aspersa</i>	Helgoland (Deutschland)
	<i>Botryllus schlosserii</i>	Helgoland (Deutschland)
	<i>Ciona intestinalis</i>	Helgoland (Deutschland)
	<i>Polyclinum aurantia</i>	Helgoland (Deutschland)
	<i>Clavelina lepardiformis</i>	Helgoland (Deutschland)
	<i>Morchelium argus</i>	Roscoff (Frankreich)
	<i>Styela partia</i>	Roscoff (Frankreich)
	<i>Dendrodora grossularia</i>	Roscoff (Frankreich)
	<i>Halocynthia papillosa</i>	Korsika (Frankreich)
	<i>Ascidia mentula</i>	Korsika (Frankreich)
	<i>Ascidia virganeae</i>	Korsika (Frankreich)
	<i>Pyura tessellata</i>	Korsika (Frankreich)

2.4.1.2 Chemikalien für die molekularen Untersuchungen

Die Chemikalien für die molekularen Untersuchungen und ihre Herkunft sind in der Tabelle 2.6 aufgeführt.

Tab. 2.6: Die Chemikalien für die molekularen Untersuchungen

Chemikalie	Firma
Agarose für analytische Nucleinsäuren Elektrophorese	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
DNA-Leiter 14b	peqLab, Erlangen
Ladepuffer DNA-Loading Buffer	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf

2.4.1.3 Kits

Die Kits für die molekularen Untersuchungen und deren Herkunft sind in der Tabelle 2.7 verzeichnet.

Tab. 2.7: Die für die molekularen Methoden verwendeten Kits und ihre Herkunft.

Kit	Firma
DNeasy Tissue Kit (DNA-Extraktion)	Qiagen, Hilden
Hot Master™ Taq Polymerase Kit (PCR Kit)	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
QIAquick PCR Purification Kit (Aufreinigung nach der PCR)	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit (Extraktion aus dem Gel)	Qiagen, Hilden
CEQ DTCS Quickstart Kit (Sequenzierung)	Beckman Coulter, Krefeld

2.4.1.4 Primer

Die Oligonucleotid-Primer wurden von der Firma Metabion, Martinsried, bezogen. Es wurden die beiden folgenden Primerpaare verwendet:

Primerpaar 1

5'-GTT GCC ATC TTG GGA TTC TTG G-3' for

5'-GAA GTG ATG AGC GGA ACT ATG C-3' rev

Primerpaar 2

5'-CTG AGT GTA TCG ACC GCA GTG-3' for

5'-TCG CCC TCC ATA TTT CAA AGC-3' rev

2.4.1.5 Geräte für molekulare Untersuchungen

Gelelektrophorese-Kammer Horizon® BRL 58 Gibco

Station Electrophoresis Power Supply EPS 300 Pharmacia Biotech

Zentrifuge Centrifuge 5415 Eppendorf

Aufnahmekammer LTF-Labortechnik

Schreiber P 91 Mitsubishi

Sequenzierer CEQ 8000 Genetic Analysis System Beckman Coulter

2.4.1.6 Software für die Auswertung der Daten

Chromas 1.5 (Copyright 1998 Technelysium Pty Ltd.)

Clustal W 1.7 (Copyright 1997 Julie Thompson & Toby Gibson 01)

TreeView 1.6.5 (Copyright 2001 bei Roderic D. M. Page)

Paup* version 4.0b6 (Copyright 2001 Swoffort)

BioEdit (Copyright Tom Hall Department of Microbiology North Carolina State University 1997-2001)

2.4.1.7 Gen-Datenbanken

Aus den folgenden Datenbanken wurden die Gensequenzen des Gulonolacton-Oxidase-Gens der verschiedenen Wirbeltiere und die Sequenzen der Tunicata *Ciona intestinalis* und *Ciona savignyi* entnommen:

Whitehead-Institut: (<http://www.broad.mit.edu/annotation/ciona/>)

JGI: (<http://genome.jgi-psf.org/ciona/>)

NCBI Genbank: (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Swissprot: (<http://us.expasy.org/sprot/>)

TiGR: (<http://www.tigr.org/>)

2.4.2 Methodik der DNA-Extraktion, PCR, Gel-Elektrophorese und Sequenzierung

2.4.2.1 Extraktion der DNA

Für die Extraktion der DNA wurden etwa 10-25 mg des Gewebes der in Alkohol fixierten Tiere in kleine Stücke geschnitten und mit dem DNeasy Tissue Kit nach dem zugehörigen Protokoll bearbeitet. Die so gewonnene DNA wurde bei 4 °C aufbewahrt.

2.4.2.2 PCR

Von den DNA-Proben wurden 0,5 µl auf 19,5 µl aus dem PCR Hot Master™ Taq Polymerase Kit, bestehend aus 2 µl Puffer, 0,2 Taq-Polymerase, 16,4 µl Wasser, 0,5 µl Primermix (0,025 µl Primer for plus 0,025 µl Primer rev plus 0,45 µl Wasser), gegeben. Diese Probe wurde in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß in den Thermocycler gegeben.

2.4.2.3 Aufbereitung der PCR-Proben

Nach der PCR wurden zwei bis drei Mikroliter der Probe durch Auftragen auf ein qualitatives Elektrophorese-Gel überprüft. War nur eine Bande in der erwarteten Größe zu sehen, so wurde die Probe mit dem QIAquick PCR Purification Kit für die Sequenzierung aufgereinigt.

2.4.2.4 Extraktion aus dem Elektrophorese-Gel

Sobald neben einer starken Bande, deren Sequenzstücke die erwartete Größe aufwiesen, noch andere Banden auf dem Elektrophorese-Gel zu sehen waren, wurden die interessanten Banden mit einem scharfen Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten. Mit dem QIAquick Gel Extraction Kit wurde das ausgeschnittene Stück extrahiert, wie es im zugehörigen Protokoll beschrieben ist.

2.4.2.5 Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde mit einem Beckmann Coulter Sequenzierer mit dem CEQ DTCS Quickstart Kit nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

2.4.3 Auswertung der Daten

Die in Tabelle 1.1 aufgelisteten Nucleotidsequenzen von *Rattus norvegicus*, *Mus musculus*, *Sus scrofa*, *Bos taurus*, *Gallus gallus*, *Scyliorhinus torazame* und die cDNA ci0100132519 von *C. intestinalis* und die entsprechende Sequenz von *C. savignyi* wurden mit Hilfe des Programms Clustal W aligniert. Mit dem Programm BioEdit wurde aus diesen Sequenzen jeweils ein 1186 Basenpaare großes Stück ausgewählt und mit dem Programm Paup* wurde mit dem Neighbor-Joining Verfahren nach dem Modell HKY85

mit 1000 Replikanten die Bootstrap-Werte errechnet. Der Baum aus dieser Analyse wurden mit Tree View dargestellt.