

5 Zusammenfassung

Vergleichende Darstellungen der Ascorbinsäuresynthese bei Tieren kamen in der Vergangenheit zu der Annahme, dass sich diese Eigenschaft mehrfach entwickelt hat. Da die Ascorbinsäure essentiell für die Kollagensynthese und Kollagen als verbindendes Element der Zellen die Voraussetzung für alle vielzelligen Tiere ist, wird in der vorliegenden Arbeit die Idee verfolgt, dass die Ascorbinsäuresynthese ein altes Merkmal der Metazoa darstellt. Um diese These zu überprüfen, wurden zum Einen ursprüngliche Gruppen der mehrzelligen Tiere und zum Anderen den Wirbeltieren nahe stehende Gruppen untersucht. Für die experimentellen Bearbeitung wurden ein *in vitro* Enzymtest und eine HPLC-Methode für die Messung der Ascorbinsäurekonzentration etabliert. Zur Validisierung des *in vitro* Tests wurde mit einem histochemischen Verfahren die Aktivität eines in der Synthese entscheidenden Enzyms überprüft und mit molekularen Methoden nach der genetischen Grundlage dieses Enzyms gefahndet.

Die vorliegende Arbeit zeigt die Ascorbinsäuresynthese bei dem Acrania *Branchiostoma lanceolatum*. Dies ist der erste Nachweis der Synthese für die Schwestergruppe der Wirbeltiere. Damit ist diese Eigenschaft nicht, wie derzeit angenommen, erst bei den Craniota vorhanden, sondern hat sich schon früher entwickelt. Mit dieser Arbeit wurde zusätzlich die Ascorbinsäuresynthese bei Schwämmen und Nesseltieren als ursprünglichen Vertretern der mehrzelligen Tiere nachgewiesen. Die Cnidaria *Alcyonium digitatum*, *Aiptasia* sp., *Metridium senile*, *Sargatiogeton undata*, *Thuiaria thuja* und der Vertreter der Porifera *Chondrosia reniformis* zeigten *in vitro* eine Synthese der Ascorbinsäure. Der Nachweis der Synthese bei diesen Gruppen zeigt, dass es sich um eine ursprüngliche Eigenschaft aller Metazoa handelt. Die Ergebnisse bei *A. digitatum* und *M. senile* konnten mit einer histochemischen Methode abgesichert werden. Dabei stellte sich das Gastroderm als Ort der Synthese heraus.

Bei der Untersuchung der Tunicate *Ciona intestinalis* konnte keine Produktion der Ascorbinsäure gefunden werden. Nur die Untersuchung weiterer Tunicata kann klären, ob keine Synthesefähigkeit in dieser Gruppe existiert oder ob *C. intestinalis* eine Ausnahme ist.

Der Nierenschwamm *C. reniformis* war in der Lage sowohl aus der Vorstufe L-Gulonolacton, als auch L-Galactonolacton Ascorbinsäure zu synthetisieren. Dagegen konnte für *A. digitatum* und *M. senile* gezeigt werden, dass sie spezifisch das Substrat L-Gulonolacton zur Ascorbinsäure umsetzen und L-Galactonolacton keine Vorstufe der Ascorbinsäure bei diesen beiden Nesseltieren darstellt.

Das entscheidende Enzym der Synthese bei den Wirbeltieren, die Gulonolacton-Oxidase (GLO), katalysiert den letzten Schritt zur Ascorbinsäure. Eine als ci0100132519 bezeichnete cDNA von *C. intestinalis* weist eine deutliche Ähnlichkeit zum GLO-Gen der Wirbeltiere auf. Diese aus einer Gen-Datenbank stammende cDNA diente als Grundlage für die Entwicklung von Primern. Mit diesen Primern wurden in der vorliegenden Arbeit einige Vertreter der Chordaten, Bryozoen und Echinodermaten untersucht. Jedoch konnten nur zwei entsprechende Sequenzen von *C. intestinalis* und ein Stück von einer weiteren Tunicate *Clavelina lepardiformis* gefunden werden. Die Untersuchung von weiteren 17 Arten der Deuterostomier erbrachte kein Ergebnis. Die hohe Differenz der Sequenzen von *C. intestinalis* aus unterschiedlichen Populationen dieser Art zeigten, dass hier Primer nur für nah verwandte Arten einsetzbar sind. Neben der experimentellen Arbeit wurden verschiedene Gen-Datenbanken mit einer BLAST-Suche auf Sequenzen durchsucht, die Übereinstimmungen zur ci0100132519 aufwiesen. Nur von *Ciona savignyi* wurde eine Sequenz gefunden und diese wurde zusammen mit ci0100132519 von *C. intestinalis* und den bekannten GLO-Sequenzen der Wirbeltiere *Rattus norvegicus*, *Mus musculus*, *Bos taurus*, *Sus scrofa*, *Gallus gallus* und *Scyliorhinus torazame* in eine Verwandtschaftsanalyse mit einbezogen. Mit dem Neighborjoining-Verfahren wurden die Daten berechnet und in einem Verwandtschaftsdiagramm dargestellt, das den bisherigen Verwandtschaftshypothesen entsprach. Damit konnte gezeigt werden, dass das GLO-Gen für phylogenetische Analysen geeignet ist

Mit dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Ascorbinsäuresynthese innerhalb größerer Einheiten, wie den Vertebraten, auf einen gemeinsamen Ursprung zurückzuführen ist. Diese Fähigkeit ist innerhalb dieser Gruppen mehrfach verloren gegangen. Dadurch ist die Ausgangshypothese erhärtet worden, dass die Ascorbinsäuresynthese als ursprüngliches Merkmal der Metazoa angenommen werden kann.