

3 Ergebnisse

3.1 Absicherung der Ascorbinsäuremessung

Mit Hilfe eines Hochauflösenden-Flüssigkeits-Chromatographischen (HPLC) Verfahrens wurden verschiedene Substanzen aus den aufbereiteten Gewebeproben so aufgetrennt, dass sie zu unterschiedlichen Zeiten, den Retentionszeiten (Rt), in der Messzelle detektiert werden konnten. Dadurch ließ sich die Ascorbinsäure (Rt=5,4 min) von einer ihr

sehr ähnlichen Substanz, der D-Erythroascorbinsäure (Rt=5,2 min), wie unter 3.4 beschrieben, trennen.

Eine Trennung der beiden Formen der Ascorbinsäure, die L-Ascorbinsäure und die D-Isoascorbinsäure konnte durch die chromatographischen Bedingungen der vorliegenden Arbeit nicht erreicht werden (Abb. 3.1). L-Ascorbinsäure und die D-Isoascorbinsäure haben die gleiche Summenformel $C_6H_8O_6$, doch die Moleküle unterscheiden sich in ihrer räumlichen Struktur (Stereoisomerie).

Da L-Ascorbinsäure und D-Isoascorbinsäure sich nicht chromatographisch voneinander trennen ließen, wurde nach einem Hinweis gesucht, um welche Form der Ascorbinsäure es sich hier handelt. Dafür wurde ein Standard von jeder der beiden Formen der Ascorbinsäure bei acht verschiedenen Wellenlängen gemessen. Daraus ergaben sich ein unterschiedliche Profile für die D- und die L-Form der Ascorbinsäure. Eine Probe von einem Vertreter der Cnidaria wurde ebenfalls bei unterschiedlichen Wellenlängen gemessen und das sich daraus ergebende Profil wurde mit den Profilen der L-Ascorbinsäure und der D-Isoascorbinsäure verglichen.

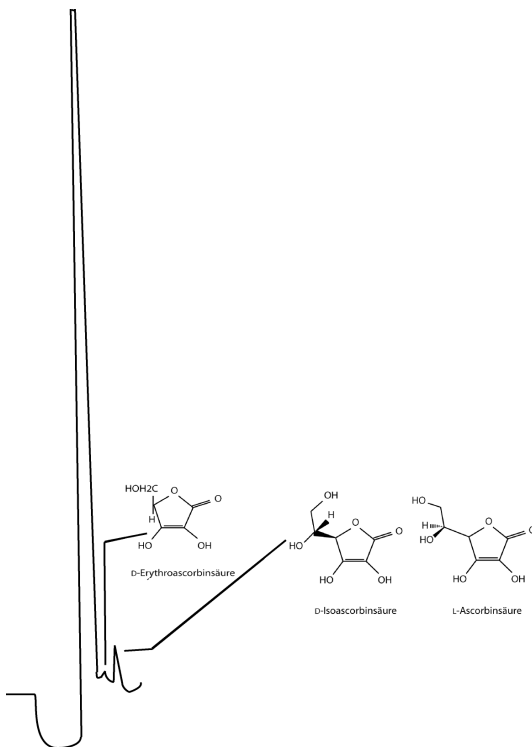


Abb. 3.1: Ausschnitt aus einem Chromatogramm am Beispiel einer Messung aus dem Enzymtest an *Sargatiogeton undatus* nach der Zugabe von L-Gulonolacton. Der erste sehr große Peak ist der Vorpeak, der in diesem Fall nach 4,2 min gemessen werden konnte. Der zuletzt abgebildete Peak nach 5,4 min ist der Ascorbinsäurepeak, der sich mit Hilfe eines inneren Standard als L- oder D-Form der Ascorbinsäure identifizieren ließ. Bei dem mittleren Peak nach 5,2 min wird angenommen, dass es sich um D-Erythroascorbinsäure handelt.

Die Messungen der Ascorbinsäure wurde mit einem UV-VIS-Detektor mit variabler Wellenlängeneinstellung durchgeführt. Bei diesem Detektor konnte jeweils eine der Wellenlängen 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270 und 280 nm eingestellt werden. Eine Standardlösung von 50 μM L-Ascorbinsäure wurde nacheinander bei jeder dieser Wellenlängen gemessen. Wurden die Flächen der Peaks (berechnet auf die Eichgerade von L-Ascorbinsäure mit $\lambda = 250$ nm) gegen die Wellenlänge aufgetragen, so ergab sich ein für diese Substanz charakteristisches Profil mit dem höchsten Wert von 226,0 $\mu\text{g/g}$ bei den Wellenlängen von 240 nm und 250 nm 207,98 $\mu\text{g/g}$ (Abb. 3.2, rote Kurve).

Die stereoisomeren Substanzen L-Ascorbinsäure und D-Isoascorbinsäure wurden ebenfalls als 50 μM Lösung bei den Wellenlängen 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270 und 280

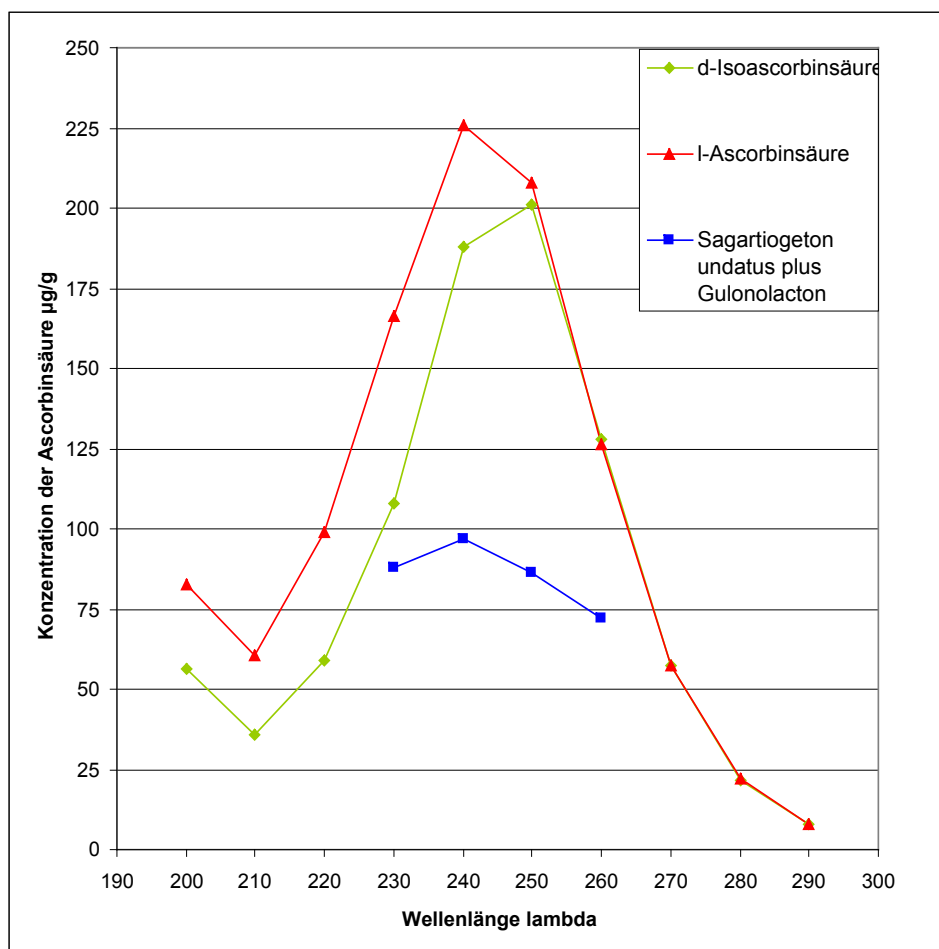


Abb. 3.2: Lösungen von L-Ascorbinsäure (rote Kurve) und D-Isoascorbinsäure (grüne Kurve) mit der Konzentration von 50 μmol wurden jeweils bei den Wellenlängen von 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280 und 290 nm gemessen. Daneben die Peakfläche von *Sagartiogeton undatus* (blaue Kurve), des Peaks mit identischer Retentionszeit wie die Ascorbinsäure. Es wurden die Wellenlängen 230, 240, 250 und 260 nm gemessen.

nm gemessen. Die Kurve der D-Isoascorbinsäure war bei den Wellenlängen von 250 - 280 nm fast identisch mit der Kurve der L-Ascorbinsäure. Der höchste Punkt lag hier mit 201,24 µg/g bei der Wellenlänge von 250 nm, während bei der Wellenlänge von 240 nm ein Wert von 188,01 µg/g gemessen wurde (Abb. 3.2, grüne Kurve).

Um zu überprüfen, welche Form der Ascorbinsäure von Nesseltieren aus der Vorstufe gebildet wurde, wurde L-Gulonolacton auf das Gewebehomogenat der Schlammmose *Sagartiogeton undatus* gegeben. Die anfängliche Konzentration der Ascorbinsäure von 83,21 µg/g stieg innerhalb von 20 min auf 86,53 µg/g an. Diese Probe (20 min nach der Zugabe von L-Gulonolacton) wurde in sechs Unterproben geteilt und bei den Wellenlängen von 220, 230, 240, 250, 260 und 270 nm gemessen. Die Werte der Ascorbinsäure bei 220 und 270 nm konnten nicht ausgewertet werden, da der Peak von einer anderen Substanz aus der biologischen Matrix überlagert wurden.

Der Verlauf der Kurve von *S. undatus* war bei den Wellenlängen 230-260 nm flacher gegenüber dem der Standardkurven. Genau wie bei dem Profil der L-Ascorbinsäure lag der höchste Punkt bei 240 nm mit 97,03 µg/g über den 86,53 µg/g bei 250 nm. Dieses Profil ist ein Hinweis darauf, dass sich L-Ascorbinsäure bildet, nachdem L-Gulonolacton auf das Gewebehomogenat von *S. undatus* gegeben wurde (Abb. 3.2, blaue Kurve).

3.2 Messung der Dehydroascorbinsäure

Die Dehydroascorbinsäure entsteht durch Oxidation aus der Ascorbinsäure. Mit der in dieser Arbeit verwendeten HPLC-Methode konnte die Dehydroascorbinsäure nicht direkt detektiert werden. Über den Umweg der Reduktion zurück zur Ascorbinsäure war die Messung der Gesamtascorbinsäure möglich. Davon wurde der Wert der Konzentration an Ascorbinsäure, die durch eine separate Messung erhalten wurde, abgezogen, und es resultierte daraus die Konzentration der Dehydroascorbinsäure (Tab. 3.1). Die Reduktion fand mit Hilfe des starken Reduktionsmittels Dithiothreitol (DTT) statt.

Tab. 3.1: Konzentrationen der Ascorbinsäure, der Gesamtascorbinsäure nach Behandlung mit DTT und der Dehydroascorbinsäure bei den verschiedenen Arthropoden: *Carcinus maenas* (Crustacea), *Lithobius forficatus* (Chilopoda) und *Thermobia domestica* (Insecta).

Tierart	Ascorbinsäure (µg/g)	Gesamtascorbinsäure (µg/g)	Dehydroascorbinsäure (µg/g)
<i>Carcinus maenas</i>	110,47	130,19	19,72
<i>Lithobius forficatus</i>	52,29	55,71	3,42
<i>Thermobia domestica</i>	86,21	207,90	121,69

Die Bedingungen während des Enzymtests, wie z. B. der nahezu neutrale pH-Wert, führten möglicherweise zu einer unzureichenden Stabilisierung der Ascorbinsäure, die als Folge daraus oxidiert werden könnte. Der Prozess der Oxidation und damit die Abnahme der Ascorbinsäurekonzentration würden einer möglichen Enzymaktivität entgegen wirken. Die Enzymreaktion zeigt sich in der Zunahme der Ascorbinsäurekonzentration, als Folge der Umwandlung einer der Vorstufen L-Gulonolacton oder L-Galactonolacton.

Von der Glasrose *Aiptasia sp.* wurden die Konzentrationen der Ascorbinsäure und der Gesamtascorbinsäure sofort und 30 min nachdem L-Gulonolacton zu dem Gewebehomogenat des Tieres gegeben wurde gemessen. Die Konzentration der Gesamtascorbinsäure von 57,63 µg/g stieg nach 30 min um 28,77 µg/g an. Der Konzentrationsanstieg der Ascorbinsäure von 23,56 µg/g nach 30 min stand einer Zunahme der Dehydroascorbinsäure von 5,49 µg/g gegenüber (Tab. 3.2).

Tab. 3.2: Konzentrationen der Ascorbinsäure, der Gesamtascorbinsäure nach Behandlung mit DTT und der Dehydroascorbinsäure bei *Aiptasia sp.* vor und 30 min nach der Zugabe von Gulonolacton.

Tierart	Ascorbinsäure (µg/g)	Gesamtascorbinsäure (µg/g)	Dehydroascorbinsäure (µg/g)
<i>Aiptasia sp.</i> 0 min	49,22	57,63	8,41
<i>Aiptasia sp.</i> 30 min	72,78	86,40	13,63

3.3 Enzymtest

Vertreter verschiedener Gruppen der wirbellosen Tiere wurden auf die Fähigkeit, Ascorbinsäure zu synthetisieren, überprüft. Dafür wurde die Aktivität eines Enzyms getestet, das den letzten Schritt zur Ascorbinsäure katalysiert. Dieser Test wurde *in vitro* an dem Gewebehomogenat der ausgewählten Tiere durchgeführt. Es wurden zwei Vorstufen der Ascorbinsäure: L-Gulonolacton und L-Galactonolacton zum Homogenat gegeben. Ein aktives Enzym führte zur Umsetzung der Vorstufen und damit zu einem Anstieg der Ascorbinsäurekonzentration des Gewebehomogenats (Abb. 3.3).

Erste Vorversuche, bei denen L-Gulonolacton und L-Galactonolacton auf Gewebehomogenat des Chilopoden *Lithobius forficatus* gegeben wurde, zeigten keine Zunahme der Konzentration der L-Ascorbinsäure. Gewebe von der Glasrose *Aiptasia sp.* wurde mit L-

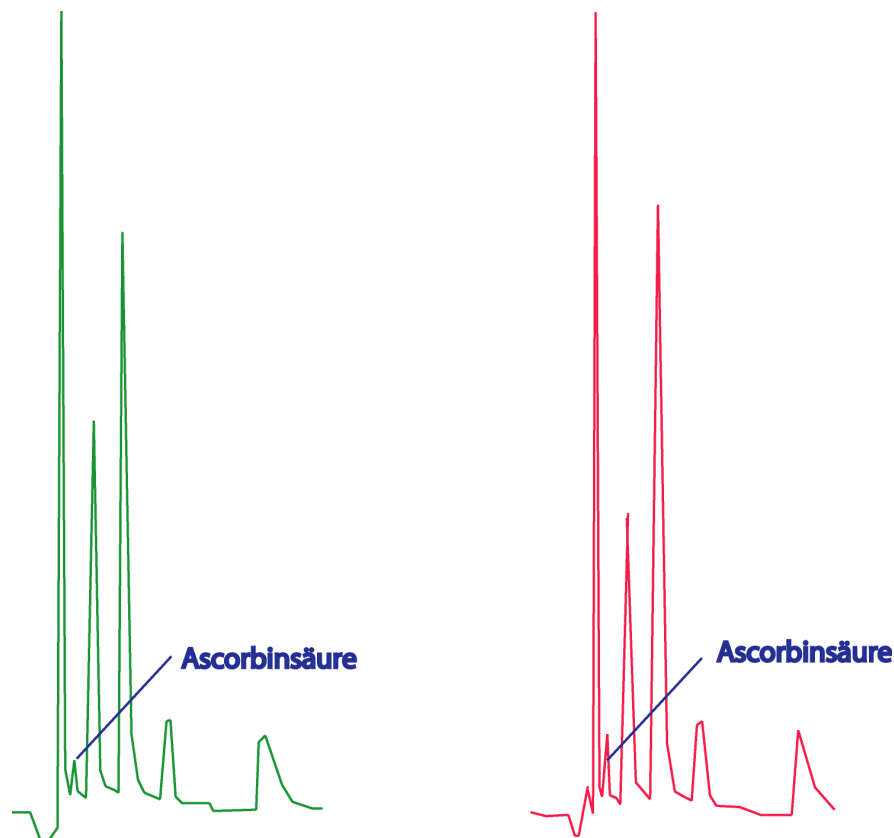


Abb. 3.3: Chromatogramm der HPLC-Messung des Gewebehomogenats von *Alcyonium digitatum* mit L-Gulonolacton. Links direkt nach der Zugabe von L-Gulonolacton und rechts 80 min nach der Zugabe von L-Gulonolacton.

Gulonolacton versetzt und die anfängliche Konzentration der L-Ascorbinsäure von 49,22 µg/ stieg nach 30 min auf 72,78 µg/g an.

Als weiterer Vertreter der Anthozoa wurde die Wachsrose *Anemonia sulcata* überprüft. Ein Teil der Fußscheibe von *A. sulcata* zeigte nach Zugabe von L-Gulonolacton einen Anstieg der Konzentration an L-Ascorbinsäure von 101,5 µg/g nach 30 min auf 113,61 µg/g. Die Gegenprobe mit Pufferlösung anstelle von L-Gulonolacton zeigte keinen Anstieg der Konzentration.

3.3.1 Enzymtest an *Sagartiogeton undatus*

Ein weiterer Vertreter der Anthozoa sollte auf die Synthesefähigkeit der Ascorbinsäure getestet und dabei die Konzentration der Ascorbinsäure über einen längeren Zeitraum betrachtet werden. Dazu wurde die Schlammrose *S. undatus* auf die Fähigkeit überprüft, Ascorbinsäure aus der Vorstufe L-Gulonolacton zu synthetisieren. Es wurde das Gewebe eines Individuum *in vitro* über einen Zeitraum von 60 min untersucht.

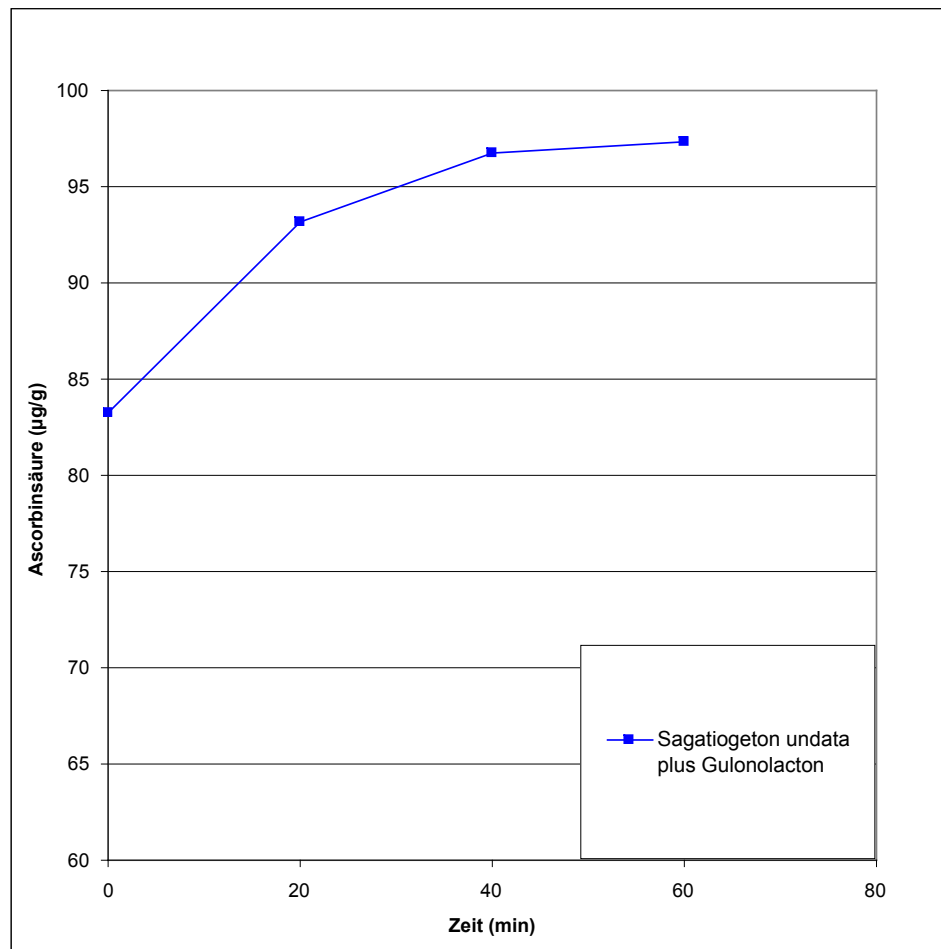


Abbildung 3.4: Enzymtest an Gewebe von *Sagartiogeton undatus*. Es wurde das Substrat Gulonolacton eingesetzt und die Veränderung der Konzentration der Ascorbinsäure über einen Zeitraum von 60 min überprüft. Die Reaktion wurde bei 4 °C untersucht und die Stichprobengröße lag bei n=1.

Nach der Zugabe von L-Gulonolacton zu Gewebehomogenat der Schlammeose *S. undatus* konnte ein Anstieg der Anfangskonzentration der Ascorbinsäure von 83,26 µg/g auf 96,72 µg/g nach 40 min gemessen werden. Danach war der Anstieg nur noch sehr flach bis auf eine Ascorbinsäurekonzentration von 97,31 µg/g nach 60 min (n=1, Abb. 3.4).

3.3.2 Enzymtest an *Metridium senile*

Als eine weitere Vertreterin der Anthozoa sollte die Seenelke *Metridium senile* über einen Zeitraum von 60 min betrachtet werden. Zusätzlich sollte *M. senile* auf L-Galactonolacton getestet werden. L-Galactonolacton ist eine Vorstufe der Ascorbinsäure, die neben L-Gulonolacton von dem Enzym Gulonolacton-Oxidase der Wirbeltiere umgesetzt werden kann.

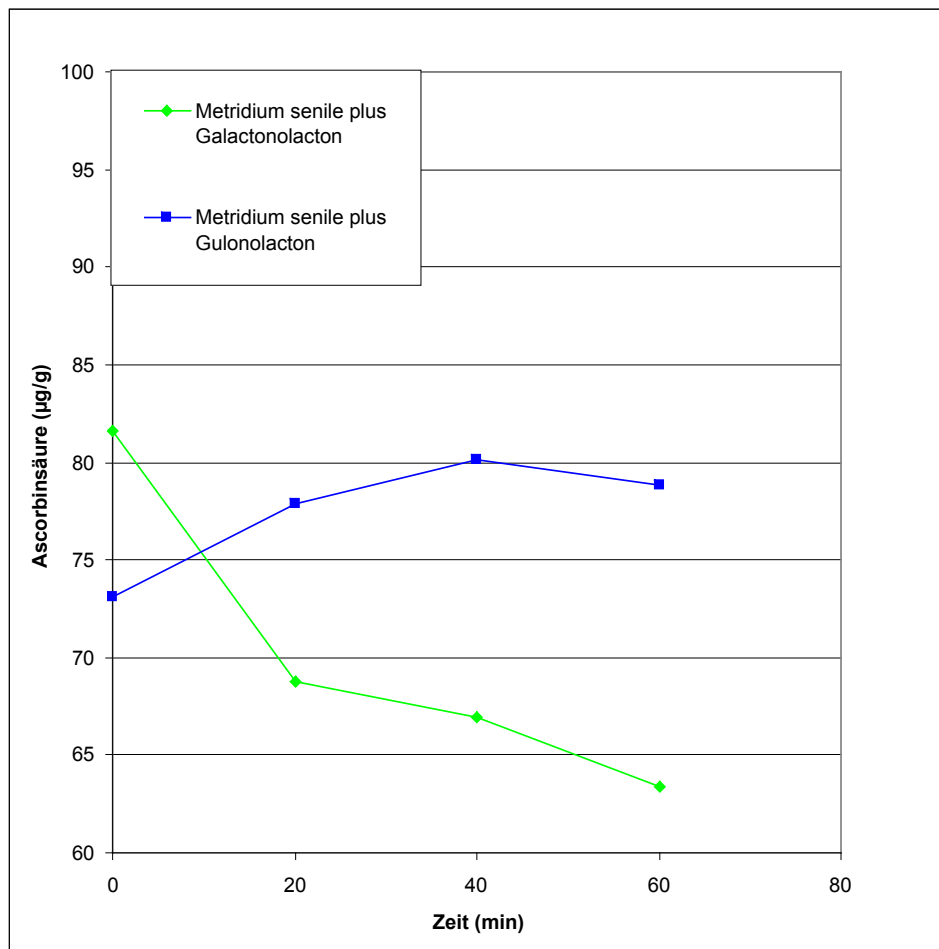


Abb. 3.5: Enzymtest an Gewebe von *Metridium senile*. Es wurden die Substrate Gulonolacton (blau) und Galactonolacton (grün) eingesetzt und die Veränderungen der Konzentration der Ascorbinsäure über einen Zeitraum von 60 min überprüft. Die Reaktion wurde bei 4 °C untersucht und die jeweilige Stichprobengröße lag bei $n=1$.

Gewebehomogenat der Seenelke *M.* wurde auf die Synthesefähigkeit für Ascorbinsäure untersucht. Diese wurde mit den Vorstufen der Ascorbinsäure L-Gulonolacton und L-Galactonolacton durchgeführt. Die Konzentration der Ascorbinsäure im Homogenat jeweils eines Individuums wurde sofort und nach 20, 40 und 60 min gemessen.

Wurde die Vorstufe L-Gulonolacton zu dem Gewebehomogenat von *M. senile* gegeben, so konnte ein Anstieg der Ascorbinsäurekonzentration innerhalb der ersten 40 min beobachtet werden. Der Wert zu Beginn der Messreihe mit 73,12 µg/g stieg innerhalb von 40 min auf 80,15 µg/g Ascorbinsäure an. Nach 60 min sank die Ascorbinsäurekonzentration wieder auf 78,79 µg/g ab ($n=1$, Abb. 3.5 blaue Kurve).

Nachdem die Vorstufe L-Galactonolacton dem Gewebehomogenat von *M. senile* zugegeben worden war, konnte eine Anfangskonzentration der Ascorbinsäure von 81,58 µg/g

gemessen werden. Dieser Wert fiel nach 20 min relativ steil auf 68,79 $\mu\text{g/g}$ Ascorbinsäure ab. Der weitere Verlauf der Konzentration der Ascorbinsäure war ein flacherer Rückgang der Konzentration bis auf 63,39 $\mu\text{g/g}$ nach 60 min ($n=1$, Abb. 3.5, grüne Kurve).

3.3.3 Enzymtest an *Alcyonium digitatum*

Die bisherigen Enzymtests fanden bei 4 °C statt. Um die optimale Temperatur der Enzymreaktion zu ermitteln, wurde Gewebe der Weichkoralle *Alcyonium digitatum* bei 10 und 20 °C über einen Zeitraum von 100 min nach Zugabe von L-Gulonolacton betrachtet. Bei der Temperatur von 10 °C und 20 °C sank die Ascorbinsäurekonzentration innerhalb von 60 min auf 0 $\mu\text{g/g}$. Es wurde jeweils nur eine Messreihe für beide Reaktionstemperaturen durchgeführt.

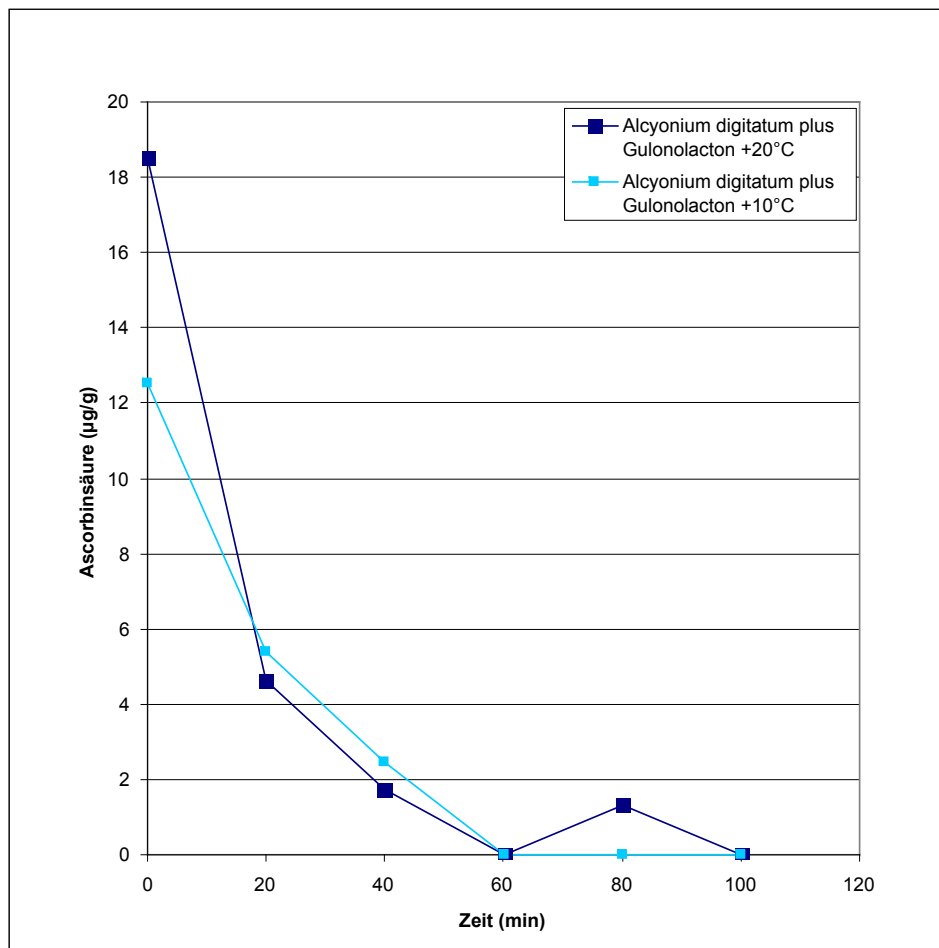


Abb. 3.6: Einfluss der Temperatur auf den Enzymtest. Beispiel der Veränderung der Konzentration der Ascorbinsäure im Gewebe von *Alcyonium digitatum* nach Zugeben von Gulonolacton über einen Zeitraum von 100 min. Der dunkelblauen Kurve lag eine Reaktionstemperatur von 20 °C und der hellblauen Kurve von 4 °C zugrunde. Die jeweilige Stichprobengröße betrug $n=1$.

Bei 10 °C betrug die anfängliche Konzentration der Ascorbinsäure 12,53 µg/g und sank innerhalb von 20 min steil auf 5,39 µg/g ab. Im weiteren Verlauf sank die Konzentration flacher bis zum Stand von 0 µg/g nach 60 min ab (Abb. 3.6, hellblaue Kurve). Bei einer Temperatur von 20 °C sank die Anfangskonzentration der Ascorbinsäure von 18,53 µg/g auf 4,65 µg/g nach 20 min und fiel dann flacher bis auf 0 µg/g nach 60 min ab. Der Wert von 1,32 µg/g Ascorbinsäure nach 80 min liegt wenig über der Nachweisgrenze und sollte deshalb vernachlässigt werden (Abb. 3.6, dunkelblaue Kurve).

Die Zunahme der Ascorbinsäurekonzentration nach Zugabe von L-Gulonolacton zum Gewebehomogenat, die bei verschiedenen Vertretern der Anthozoa beobachtet wurde, sollte statistisch überprüft werden. Dafür sollte die Weichkoralle *A. digitatum* exemplarisch auf die Ascorbinsäuresynthese getestet werden. Es wurde die Substrate L-Gulonolacton,

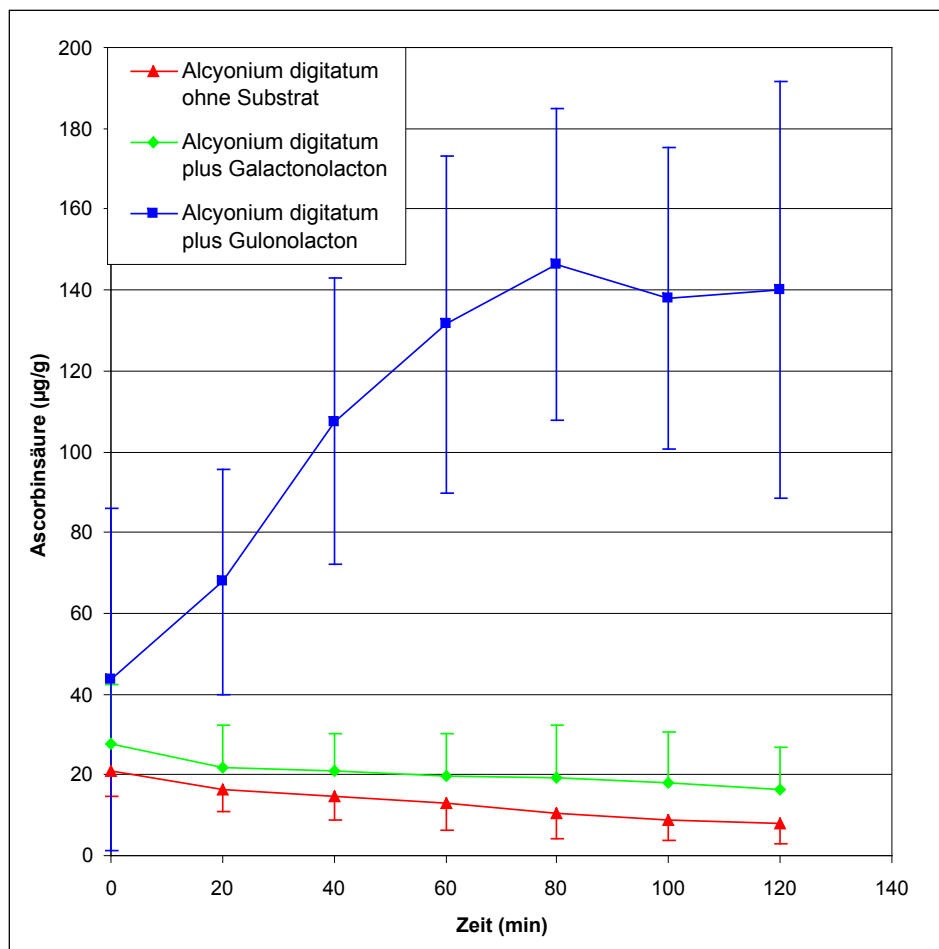


Abb. 3.7: Enzymtest an Gewebe von *Alcyonium digitatum*. Es wurden nach Zugeben der Substrate Gulonolacton (blau), Galactonolacton (grün) und Puffer A (rot) die Veränderungen der Konzentration der Ascorbinsäure über einen Zeitraum von 60 min überprüft. Die Reaktion wurde bei 4 °C untersucht und die jeweilige Stichprobengröße lag bei n=6.

L-Galactonolacton und Pufferlösung als Gegenprobe verwendet. Die jeweilige Stichprobengröße betrug sechs. Es wurde Gewebe aus unterschiedlichen Kolonien von *A. digitatum* entnommen und die Konzentration der Ascorbinsäure über einen Zeitraum von 120 min betrachtet.

Die Gegenprobe wurde mit Pufferlösung anstelle einer der Vorstufen durchgeführt. Die anfängliche Konzentration von $21,09 \pm 6,30 \mu\text{g/g}$ Ascorbinsäure im Homogenat von *A. digitatum* sank kontinuierlich auf einen Wert von $8,05 \pm 5,29 \mu\text{g/g}$ nach 120 min (n=6, Abb. 3.7, rote Kurve).

Nach der Zugabe des Substrats L-Galactonolacton zum Gewebehomogenat sank die Anfangskonzentration der Ascorbinsäure von $27,58 \pm 14,97 \mu\text{g/g}$ stetig bis auf einen Wert von $16,32 \pm 10,34 \mu\text{g/g}$ nach 120 min ab (n=6, Abb. 3.7, grüne Kurve).

Wurde das Substrat L-Gulonolacton zum Homogenat von *A. digitatum* gegeben, so stieg die anfängliche Ascorbinsäurekonzentration von $43,58 \pm 42,46 \mu\text{g/g}$ kontinuierlich bis auf $146,37 \pm 51,47 \mu\text{g/g}$ nach 80 min etwa linear an. Nach 100 min sank die Ascorbinsäu-

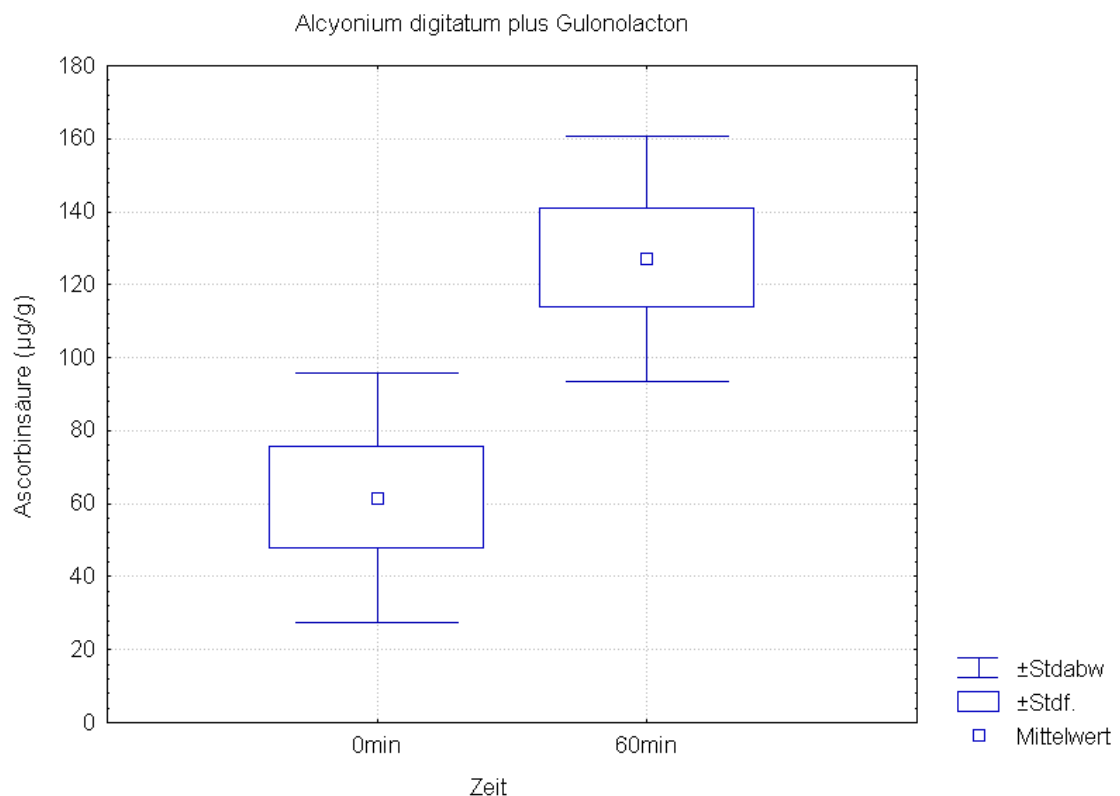


Abb. 3.8: Box & Wiskerplot der Konzentration der Ascorbinsäure im Enzymtest von Gewebe von *Alcyonium digitatum* zum Zeitpunkt 0 min und 60 min. Das kleine Kästchen in der Mitte zeigt den Mittelwert, das große Kästchen den Standardfehler und die Antennen die Standardabweichung. Es Der statistische Test ist eine nichtparametrische Klustal-Wallis-Anova. Der Anstieg der konzentration von 0 min auf 60 min ist signifikant. Die Stichprobengröße betrug n=6 ($p < 0,005$).

rekonzentration auf $137,88 \pm 37,30 \mu\text{g/g}$ und blieb mit $140,04 \pm 51,47 \mu\text{g/g}$ nach 120 min etwa auf gleich hoher Konzentration ($n=6$, Abb. 3.7, blaue Kurve).

Um die Signifikanz des Anstiegs der Konzentration der Ascorbinsäure nach Zugabe von L-Gulonolacton statistisch zu testen, wurde der Konzentrationswert zum Zeitpunkt null mit $43,58 \pm 42,46 \mu\text{g/g}$ und nach 60 min mit dem Wert von $131,47 \pm 41,62$ verglichen. Es wurde ein nichtparametrisches Verfahren in Form einer Kruskal-Wallis–Anova gewählt. Dabei ergab sich ein signifikanter Unterschied der Konzentration zu den Zeitpunkten 0 min und 60 min ($p < 0,005$; $n=6$). Die Abbildung 3.8 zeigt das Ergebnis dieser Auswertung mit der Darstellung von Box and Wiskerplots.

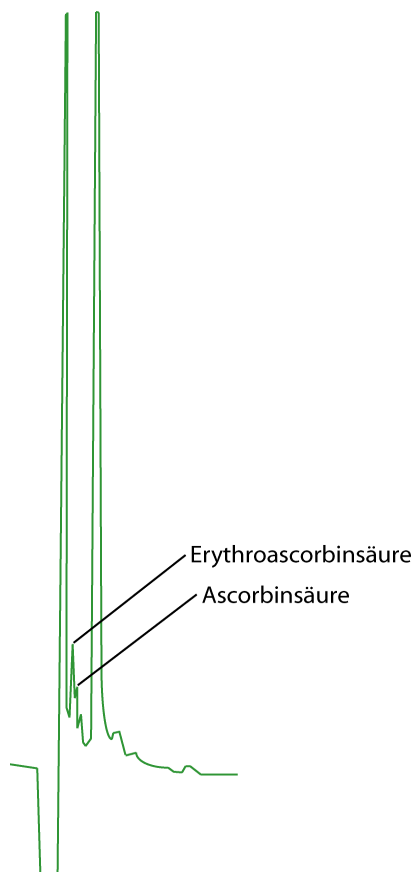


Abb. 3.9: Chromatogramm von *Thuiaria thuja*. Der Ascorbinsäurepeak mit der Retentionszeit von 5,6 min schließt direkt an einen sehr großen Peak der Erythroascorbinsäure mit der Retentionszeit von 5,4 min an. Erst nach mehreren Versuchen gelang eine gute Trennung der beiden Peaks wie in dieser Abbildung.

3.3.4 Enzymtest an *Thuiaria thuja*

Mit dem Flaschenbürsten-Polyp *Thuiaria thuja* sollte ein Vertreter einer weiteren Gruppe der Cnidaria auf die Fähigkeit der Ascorbinsäuresynthese überprüft werden. Da nur wenige Kolonien dieser Hydrozoen zur Verfügung standen, konnte nur eine Messreihe mit dem Substrat L-Gulonolacton durchgeführt werden. Der Zeitraum des Enzymtests betrug 80 min. Ein weiteres Problem lag darin, dass die Konzentration der Erythroascorbinsäure (Abb. 3.9) sehr hoch war und es nur bei einer guten Trennung zu keiner Überlagerung des Ascorbinsäurepeaks kam.

In Abbildung 3.10 ist zu sehen, dass die Anfangskonzentration der Ascorbinsäure von $43,32 \mu\text{g/g}$ auf $102,18 \mu\text{g/g}$ bis zur 40. Versuchsminute etwa linear anstieg. Danach war der Anstieg der Messreihe etwas flacher bis zu einer Ascorbinsäurekonzentration von $125,42 \mu\text{g/g}$ nach 100 min ($n=1$).

3.3.5 Enzymtest an *Chondrosia reniformis*

Die Gruppe der Porifera wird als ursprünglichste Gruppe der Metazoen angesehen. Mit dem marinen Schwamm *Chondrosia reniformis* wurde ein Vertreter dieser Gruppe auf die Synthesefähigkeit für Ascorbinsäure getestet. Diese Synthesefähig-

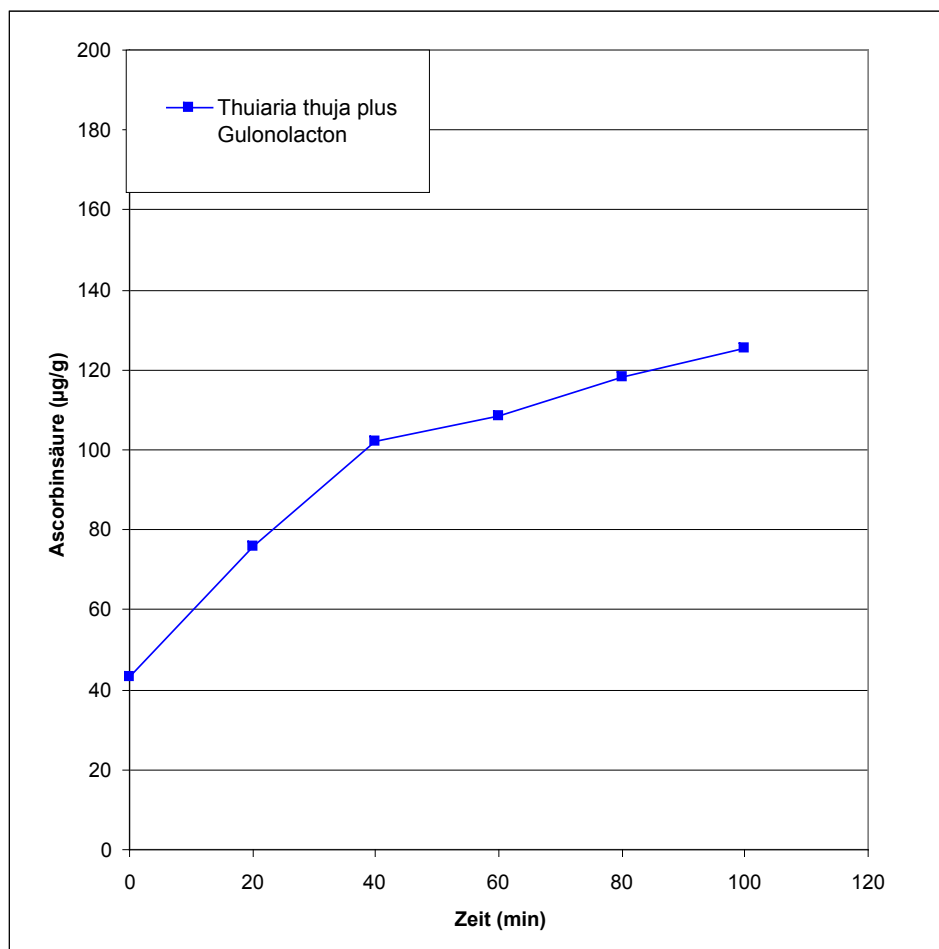


Abb. 3.10: Enzymtest an Gewebe von *Thuiaria thuja*. Es wurde das Substrat Gulonolacton eingesetzt und die Veränderung der Konzentration der Ascorbinsäure über einen Zeitraum von 100 min überprüft. Die Reaktion wurde bei 4 °C untersucht und die Stichprobengröße lag bei $n=1$.

keit bei *C. reniformis* wurde mit den Ascorbinsäure-Vorstufen L-Galactonolacton und L-Gulonolacton überprüft. Das zur Verfügung stehende Material von *C. reniformis* war begrenzt und so konnten jeweils nur drei Messreihen für jedes Substrat über einen Zeitraum von 120 min durchgeführt werden.

Nach der Zugabe von L-Galactonolacton zum Gewebehomogenat von *C. reniformis* wurde ein leichter Abfall der Ascorbinsäurekonzentration von anfänglich $36,52 \pm 17,57 \mu\text{g/g}$ auf $29,94 \pm 15,69 \mu\text{g/g}$ nach 20 min gemessen. Danach stieg der Wert der Ascorbinsäurekonzentration leicht auf $37,62 \pm 12,67 \mu\text{g/g}$ nach 80 min an und blieb mit $37,01 \pm 12,97 \mu\text{g/g}$ nach 120 min weiterhin etwa auf der Höhe dieser Konzentration ($n=3$, Abb. 3.11, grüne Kurve).

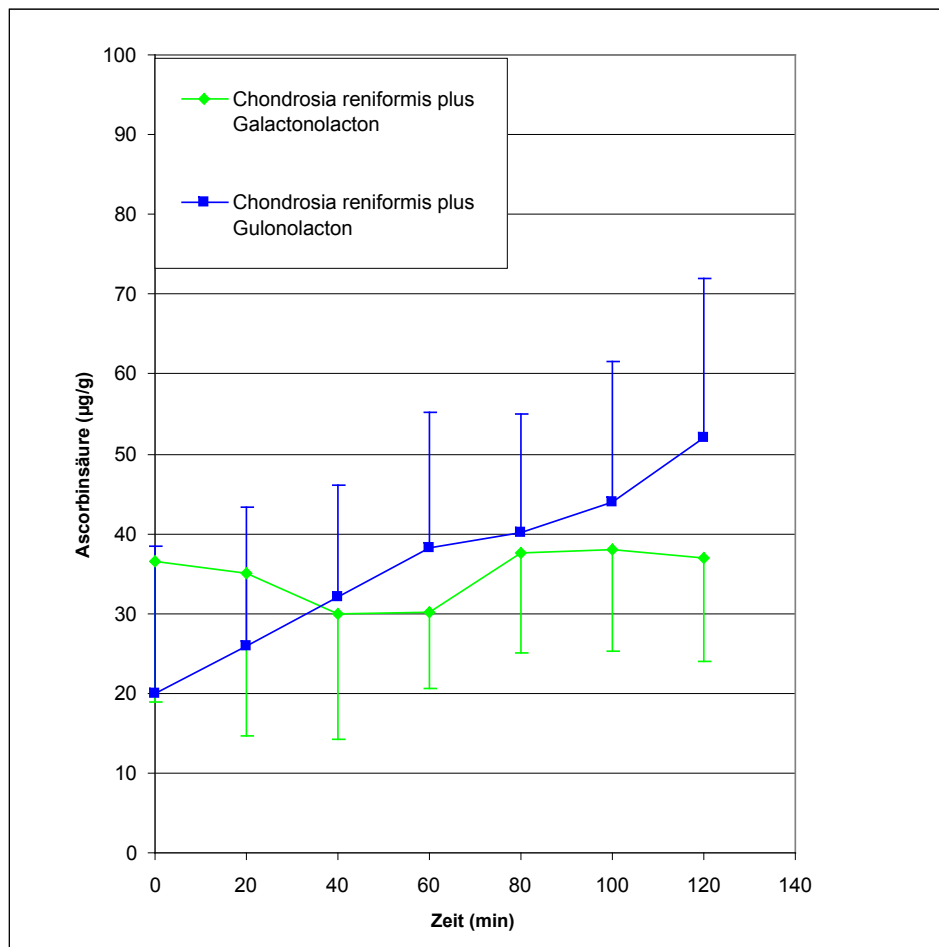


Abb. 3.11: Enzymtest an Gewebe von *Chondrosia reniformis*. Es wurden die Substrate L-Gulonolacton (blau) und L-Galactonolacton (grün) eingesetzt und die Veränderungen in der Konzentration der Ascorbinsäure über einen Zeitraum von 120 min überprüft. Die Reaktion wurde bei 4 °C untersucht und die jeweilige Stichprobengröße lag bei n=3.

Wurde L-Gulonolacton zu dem Gewebehomogenat von *C. reniformis* gegeben, so stieg die Anfangskonzentration der Ascorbinsäure von $20,00 \pm 18,44 \mu\text{g/g}$ kontinuierlich bis auf $38,15 \pm 16,95 \mu\text{g/g}$ nach 60 min an. Es folgte bis 100 min ein flacherer Anstieg der Ascorbinsäurekonzentration bis auf $43,93 \pm 17,53 \mu\text{g/g}$ und schließlich wieder ein etwas steilerer Anstieg auf $52,10 \pm 19,94 \mu\text{g/g}$ nach 120 min (n=3, Abb. 3.11, blaue Kurve).

3.3.6 Enzymtest an *Ciona intestinalis*

Die Seescheide *Ciona intestinalis* wurde auf die Fähigkeit Ascorbinsäure zu synthetisieren getestet. Dazu wurden die Substrate L-Galactonolacton und L-Gulonolacton auf Gewebehomogenat gegeben. Die Konzentration der Ascorbinsäure wurde innerhalb eines

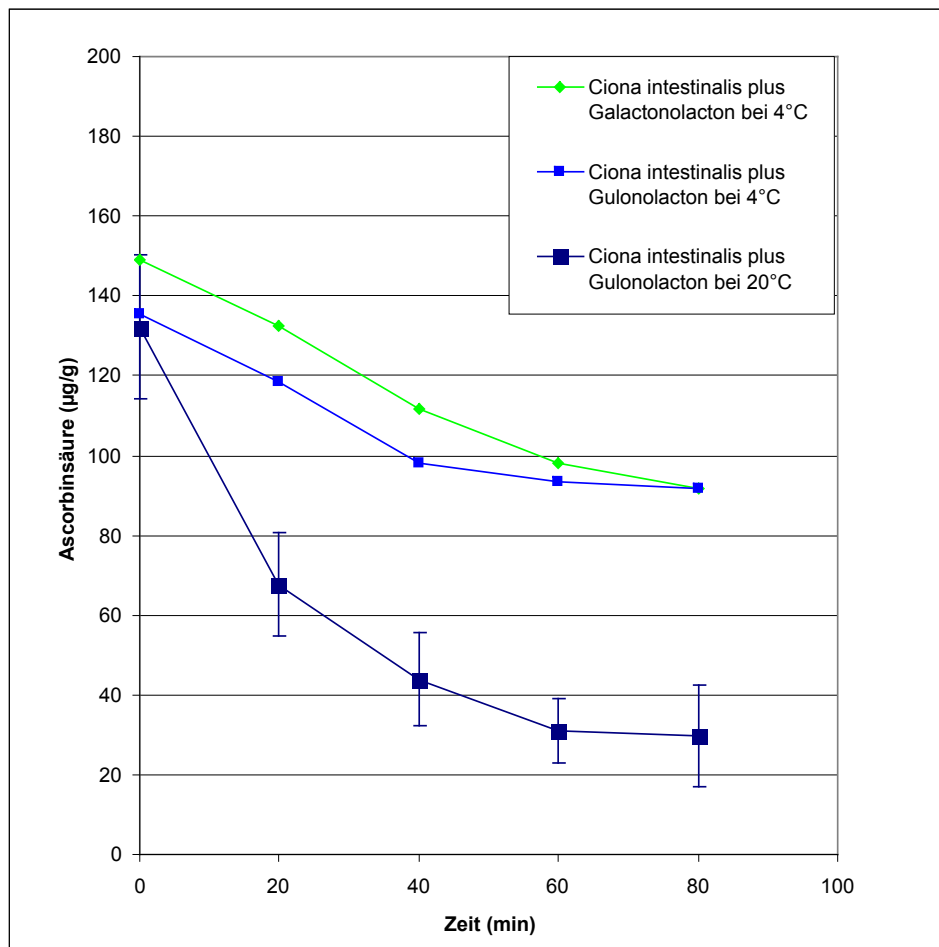


Abb. 3.12: Enzymtest an *Ciona intestinalis*. Es wurden die Substrat Gulonolacton (blau) und Galactonolacton (grün) eingesetzt und die Veränderung der Konzentration der Ascorbinsäure über einen Zeitraum von 120 min überprüft. Die Reaktion wurde bei 4 °C untersucht und die jeweilige Stichprobengröße lag bei n=3. Zusätzlich wurde der Einfluss der Temperatur auf den Enzymtest nach Zugabe von Gulonolacton untersucht. Der dunkelblauen Kurve lag eine Reaktionstemperatur von 20 °C zugrunde. Hier betrug die Stichprobengröße n=3.

Zeitraums von 80 min untersucht. Neben Versuchen bei der Reaktionstemperatur von 4 °C wurden weitere Enzymtests bei 20 °C durchgeführt.

Wurde L-Galactonolacton zu dem Gewebehomogenat von *C. intestinalis* gegeben, so sank die anfängliche Konzentration der Ascorbinsäure von 148,88 µg/g kontinuierlich bis auf 91,64 µg/g nach 80 min ab (Abb. 3.12). Dieser Enzymtest wurde bei 4 °C durchgeführt. Nach der Zugabe von L-Gulonolacton zu dem Homogenat des Gewebes von *C. intestinalis* sank die Konzentration der Ascorbinsäure von anfänglichen 135,30 µg/g auf 91,68 µg/g nach 80 min kontinuierlich, ab (Abb. 3.12).

Bei der Erhöhung der Reaktionstemperatur auf 20 °C kam es zu einem rapiden Abfall der Ascorbinsäurekonzentration. Wurde L-Gulonolacton auf das Gewebehomogenat von *C. intestinalis* gegeben fiel nach 20 min die Anfangskonzentration der Ascorbinsäure von $132,24 \pm 18,13 \mu\text{g/g}$ auf etwa die Hälfte mit $67,66 \pm 12,86 \mu\text{g/g}$ ab. Bis 60 min sank der Wert weniger steil auf $30,98 \pm 7,96 \mu\text{g/g}$ und war mit $29,74 \pm 12,74 \mu\text{g/g}$ nach 80 min etwa auf gleich bleibender Ascorbinsäurekonzentration (Abb. 3.12, n=3).

3.3.7 Enzymtest an *Branchiostoma lanceolatum*

Mit dem Lanzettfischchen *Branchiostoma lanceolatum* sollte ein weiterer Vertreter der Chordata auf die Synthese der Ascorbinsäure überprüft werden. Die Zugabe von L-Gulonolacton führte zu einem kontinuierlichen Anstieg der Ascorbinsäurekonzentration von anfänglichen $32,40 \pm 40,25 \mu\text{g/g}$ auf $125,08 \pm 19,49 \mu\text{g/g}$ nach 20 min. Danach stieg die Ascorbinsäurekonzentration in einem flacheren Verlauf auf $190,93 \pm 37,00 \mu\text{g/g}$ nach

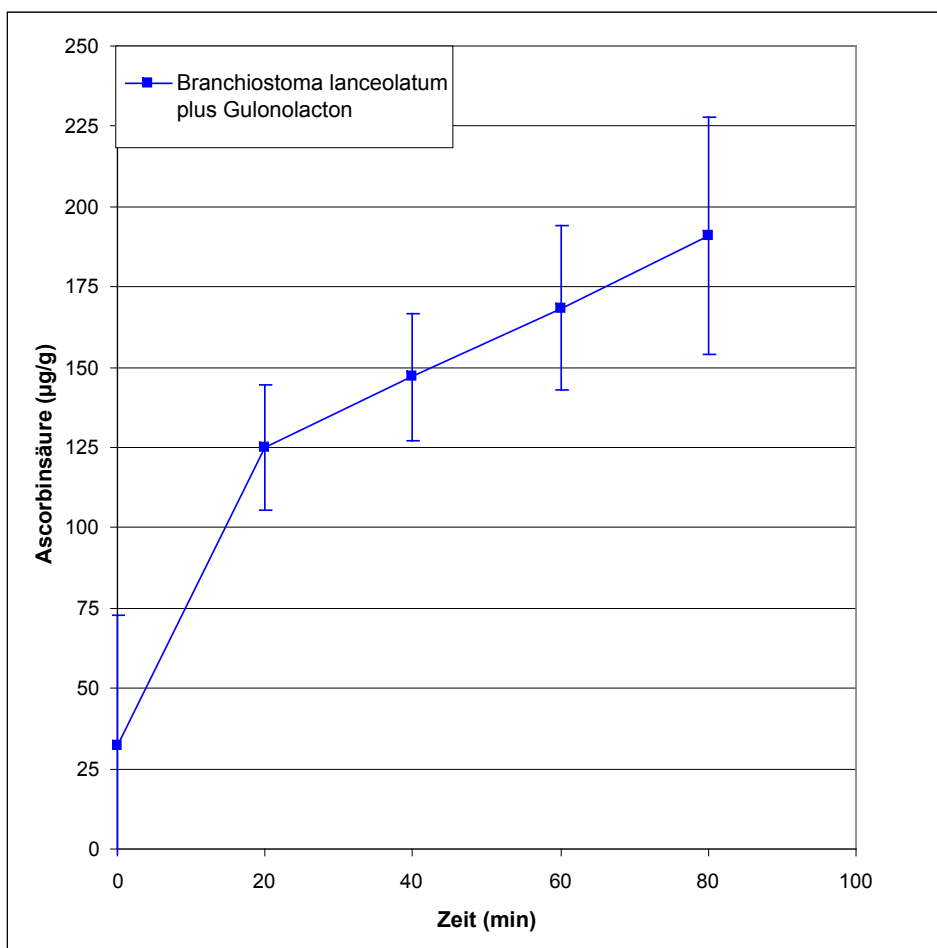


Abb. 3.13: Der Test auf die Aktivität eines Ascorbinsäure-Produzierenden Enzyms des Lanzettfischchens *Branchiostoma lanceolatum*. Nach der Zugabe von L-Gulonolacton. Die Stichprobengröße lag bei n=5.

80 min an (Abb. 3.13). Es wurde ein weibliches Tier untersucht, das mit Eiern angefüllt war. Die Stichprobengröße lag bei $n=5$.

3.4 Erythroascorbinsäure

3.4.1 Absicherung der Messung der Erythroascorbinsäure mit Hilfe der Messung an *Saccharomyces cerevisiae*

Die Zugabe von L-Gulonolacton führte bei *C. intestinalis* nicht zur Erhöhung der Ascorbinsäurekonzentration (siehe 3.3.5, Abb. 3.11). Jedoch stieg die Konzentration einer anderen Substanz, von der angenommen wurde, dass es sich um die zur L-Ascorbinsäure analoge C₅-Form die D-Erythroascorbinsäure handelt. Die Erythroascorbinsäure hatte eine Retentionszeit (Rt) von 5,2 min bei der HPLC-Messung. Dagegen durch die Zugabe eines inneren Standarts die Rt der L-Ascorbinsäure mit 5,4 ermittelt werden (Abb. 3.14, Mitte). Die Rt von d-Isoascorbinsäure lag ebenfalls bei 5,4 min (Abb. 3.14, links) und eine Mischung der beiden stereoisomeren Formen der Ascorbinsäure ergab nur einen klaren Peak (Abb. 3.14 rechts). Unter den Bedingungen der HPLC-Messung der vorliegenden Arbeit ließen sich diese beiden Substanzen nicht trennen. Die D-Erythroascorbinsäure konnte nicht mit einem inneren Standart überprüft werden, weil sie nicht als Reinsubstanz

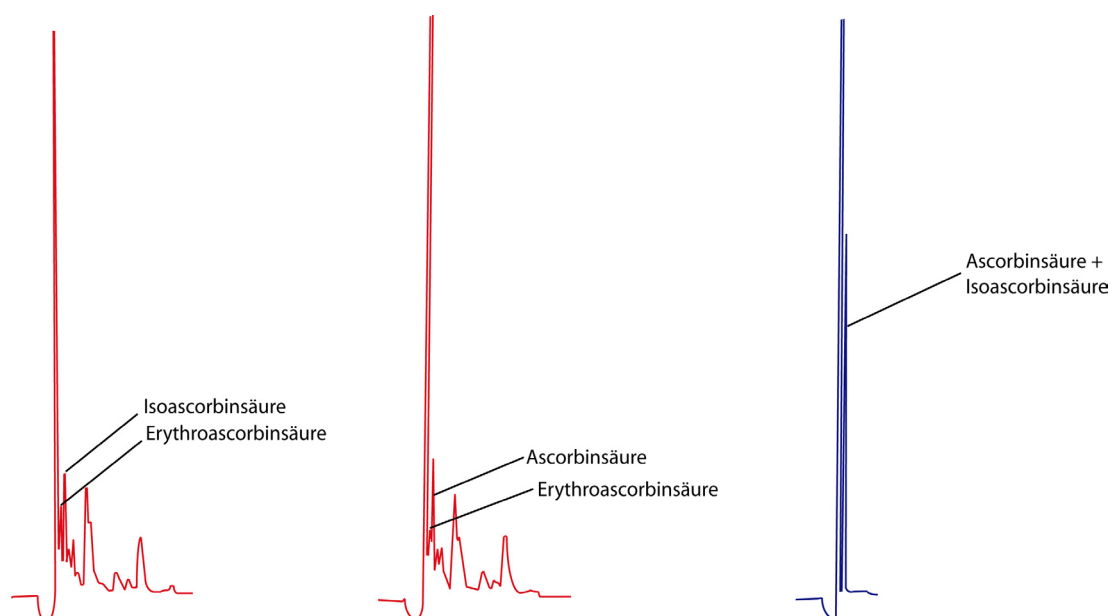


Abb. 3.14: Das linke und das mittlere Chromatogramm zeigen jeweils eine Messung von *Saccharomyces cerevisiae* 60 min nach der Zugabe von Galactonolacton. Links wurde D-Isoascorbinsäure und in der Mitte L-Ascorbinsäure als innerer Standart dazugegeben. Rechts ist eine Mischung aus D-Isoascorbinsäure und L-Ascorbinsäure ohne biologische Matrix mit der gleichen Retentionszeit zu sehen.

erhältlich war. Die Untersuchung von Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* erbrachte nach der Zugabe von L-Galactonolacton oder L-Gulonolacton eine Produktion der gesuchten Substanz mit der Rt von 5,2 min. Das Enzym Arabinono-1,4-lacton-Oxidase von *S. cerevisiae* soll aus L-Gulonolacton die D-Isoascorbinsäure produzieren (Abb. 4.1). Da mit dem inneren Standart gezeigt wurde, dass es sich nicht um D-Isoascorbinsäure handelt, wurde angenommen, dass diese Substanz D-Erythroascorbinsäure ist, die ebenfalls von *S. cerevisiae* produziert wird (Abb. 4.1). In dieser Arbeit wird die Substanz mit der Rt von 5,2 min als D-Erythroascorbinsäure bezeichnet. Die Konzentrationsangaben beziehen sich auf die Eichkurve der L-Ascorbinsäure, weil D-Erythroascorbinsäure nicht als Reinstoff für eine Eichung vorlag.

Bei *S. cerevisiae* wurde keine Ascorbinsäure gefunden. Auch konnte zu Anfang keine D-Erythroascorbinsäure gemessen werden. Die Bäckerhefe wurde vor dem Versuch bei 4 °C

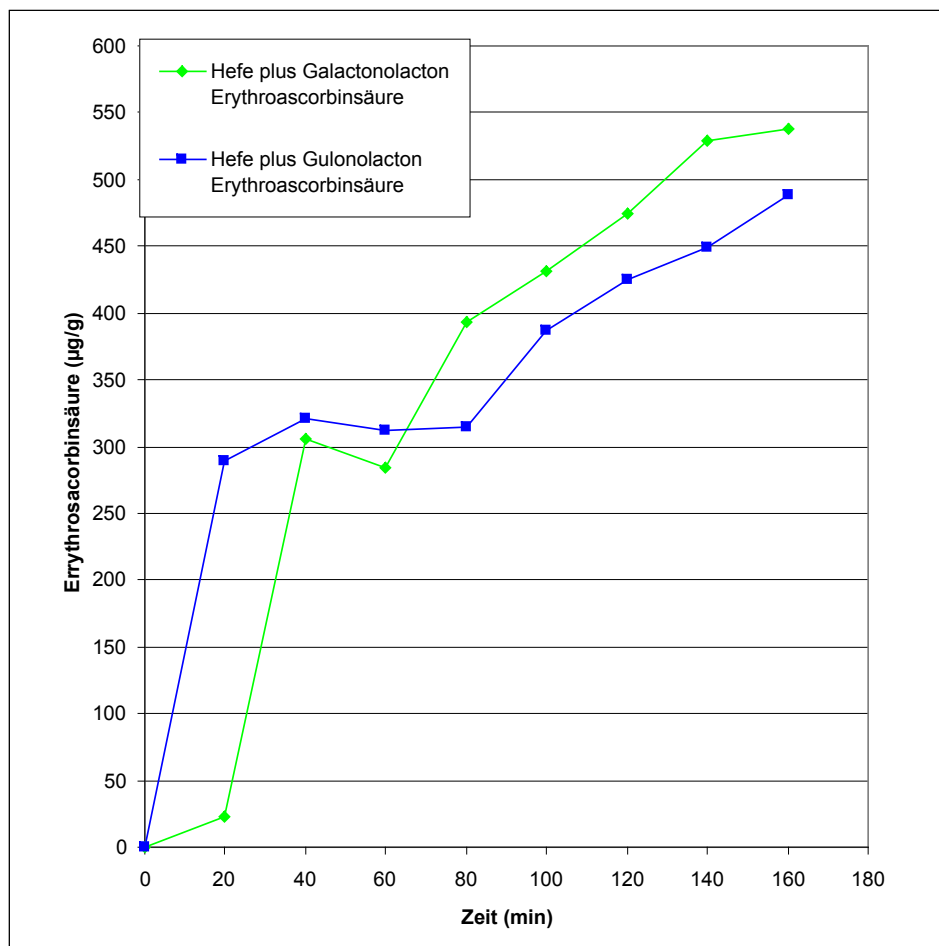


Abb. 3.15: Enzymtest an *Saccharomyces cerevisiae*. Die Umsetzung der Substrate L-Galactonolacton (grün) und L-Gulonolacton (blau) erfolgte zur Erythroascorbinsäure. Beide Versuche wurden bei 20 °C durchgeführt. Die Stichprobengröße betrug n=1.

aufbewahrt und die Zellen befanden sich in keinem aktiven Zustand. Wurde das Substrat L-Galactonolacton oder L-Gulonolacton zu der in Pufferlösung homogenisierten Hefe gegeben, so wurden beide Vorstufen in die D-Erythroascorbinsäure umgewandelt.

Nach Zugabe von L-Galactonolacton kam es im Anschluss an eine kurze Anlaufphase zu einem raschen Anstieg der Konzentration an D-Erythroascorbinsäure. Die Konzentration der D-Erythroascorbinsäure stieg von anfänglich 0 $\mu\text{g/g}$ bis auf 546,2 $\mu\text{g/g}$ (berechnet auf Ascorbinsäure) an. Auch die Zugabe von L-Gulonolacton führte von einer Konzentration von 0 $\mu\text{g/g}$ der D-Erythroascorbinsäure nach einem anfänglich raschen Anstieg, einer Phase mit gleich hoher Konzentration der D-Erythroascorbinsäure von 40 bis 80 min und schließlich einen Anstieg bis auf 496,34 $\mu\text{g/g}$ (berechnet auf Ascorbinsäure) nach 160 min (Abb. 3.15). Beide Versuche wurden bei 20 °C durchgeführt.

3.4.2 Messung der Erythroascorbinsäure bei Vertretern der Cnidaria

Nicht nur beim Enzymtest an Gewebe von *C. intestinalis* kam es zu einem Anstieg der D-Erythroascorbinsäure. Auch bei *A. digitatum* (Anthozoa, Hexacorallia) konnte nach dem Zusatz von L-Galactonolacton oder L-Gulonolacton ein Ansteigen dieser Substanz beobachtet werden. *T. thuja* zeigte eine hohe Konzentration der D-Erythroascorbinsäure ($R_t=5,2$, Abb. 3.8) und diese stieg nach Zugabe von L-Gulonolacton leicht an.

Die Konzentration der D-Erythroascorbinsäure von *Alcyonium digitatum* stieg nach der Zugabe von L-Galactonolacton von einem anfänglichen Wert von 0 $\mu\text{g/g}$ leicht auf 10,33 $\mu\text{g/g}$ (berechnet auf Ascorbinsäure) nach 120 min an (Abb. 3.16, grüne Kurve). Die Stichprobengröße betrug in diesem Fall $n=1$.

Das Zugeben von L-Gulonolacton zum Gewebehomogenat von *A. digitatum* führte zum Ansteigen der Konzentration der D-Erythroascorbinsäure anfänglich 0 $\mu\text{g/g}$ auf 19,48 $\mu\text{g/g}$ nach 20 min. Danach blieb die Konzentration trotz leichter Schwankung ungefähr gleich, und lag nach 120 min auf 25,0 $\mu\text{g/g}$ (berechnet auf Ascorbinsäure). Auch hier liegt nur eine Messreihe ($n=1$) vor (Abb.: 3.16, blaue Kurve mit kleinen Kästchen).

Bei dem Enzymtest von *T. thuja* mit L-Gulonolacton als Substrat lag die anfängliche Konzentration der D-Erythroascorbinsäure mit 164,82 $\mu\text{g/g}$ fast viermal so hoch wie der Anfangswert der Ascorbinsäure. Die Konzentration der D-Erythroascorbinsäure stieg aber langsamer an als die Ascorbinsäurekonzentration. Nach 120 min lag die Konzentration bei 184,94 $\mu\text{g/g}$ D-Erythroascorbinsäure (berechnet auf Ascorbinsäure) (Abb. 3.16, blaue Kurve mit großen Kästchen). Der Verlauf der Ascorbinsäurekonzentration ist unter (Abb. 3.10) beschrieben worden.

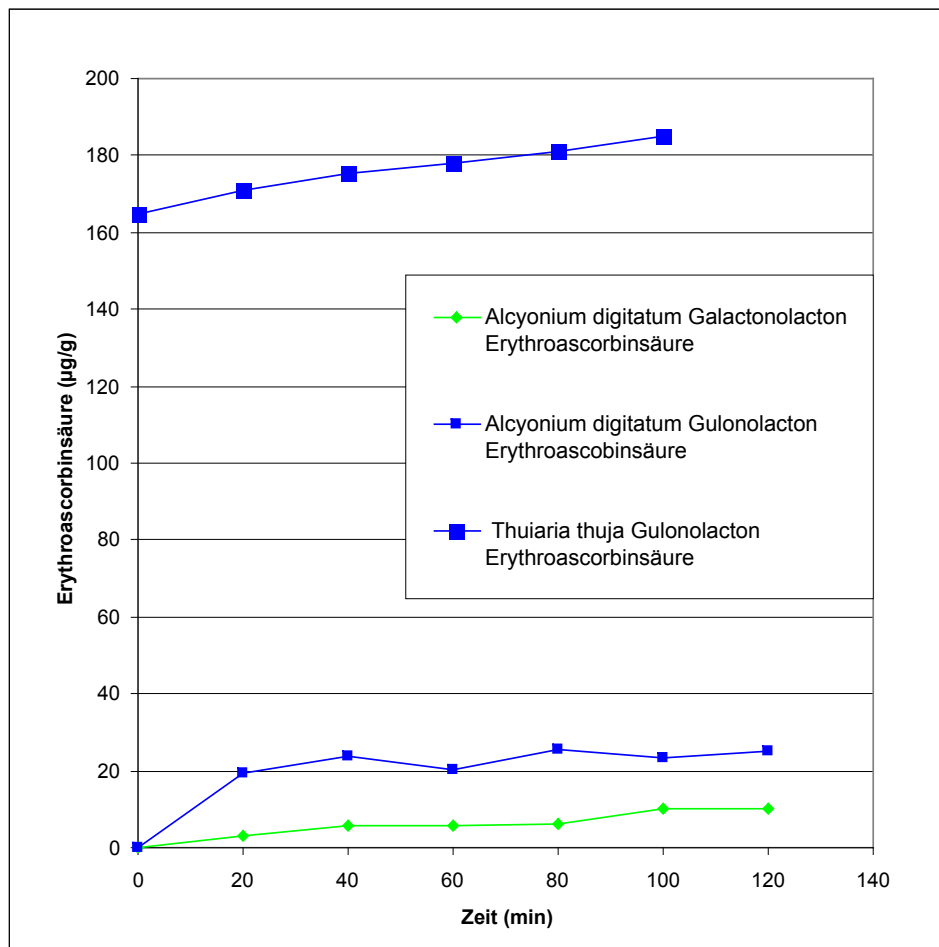


Abb. 3.16: Enzymtest der Umsetzung der Substrate L-Galactonolacton (grün) und L-Gulonolacton (blau) zu Erythroascorbinsäure. Die Kurve mit den großen Vierecken zeigt den Verlauf von *Thuiaria thuja* (100 min) und die beiden anderen den von *Alcyonium digitatum* (120 min). Alle Versuche wurden bei 4 °C durchgeführt. Die jeweilige Stichprobengröße betrug $n=1$.

3.4.3 Einfluss der Temperatur auf die Konzentration der Erythroascorbinsäure

Der Einfluss der Temperatur auf die Konzentration der D-Erythroascorbinsäure wurde am Beispiel der Seescheide *C. intestinalis* bei den Temperaturen 4 °C und 20 °C gemessen. Beide Reaktionstemperaturen führten zur Zunahme der Konzentration an D-Erythroascorbinsäure. Bei 4 °C stieg nach Zugabe von L-Gulonolacton auf Homogenat von *C. intestinalis* die Konzentration der D-Erythroascorbinsäure von anfänglichen $13,70 \pm 1,57$ µg/g auf $22,65 \pm 3,40$ µg/g nach 60 min. Danach erhöhte sich die Konzentration nur noch unwesentlich auf $22,88 \pm 2,70$ µg/g nach 80 min ($n=3$, Abb. 3.17, blau). Wurde L-Gulonolacton bei 20 °C zu dem Gewebehomogenat gegeben, stieg die Konzentration der D-Erythroascorbinsäure von anfänglichen $27,57 \pm 2,75$ µg/g kontinuierlich bis auf einen

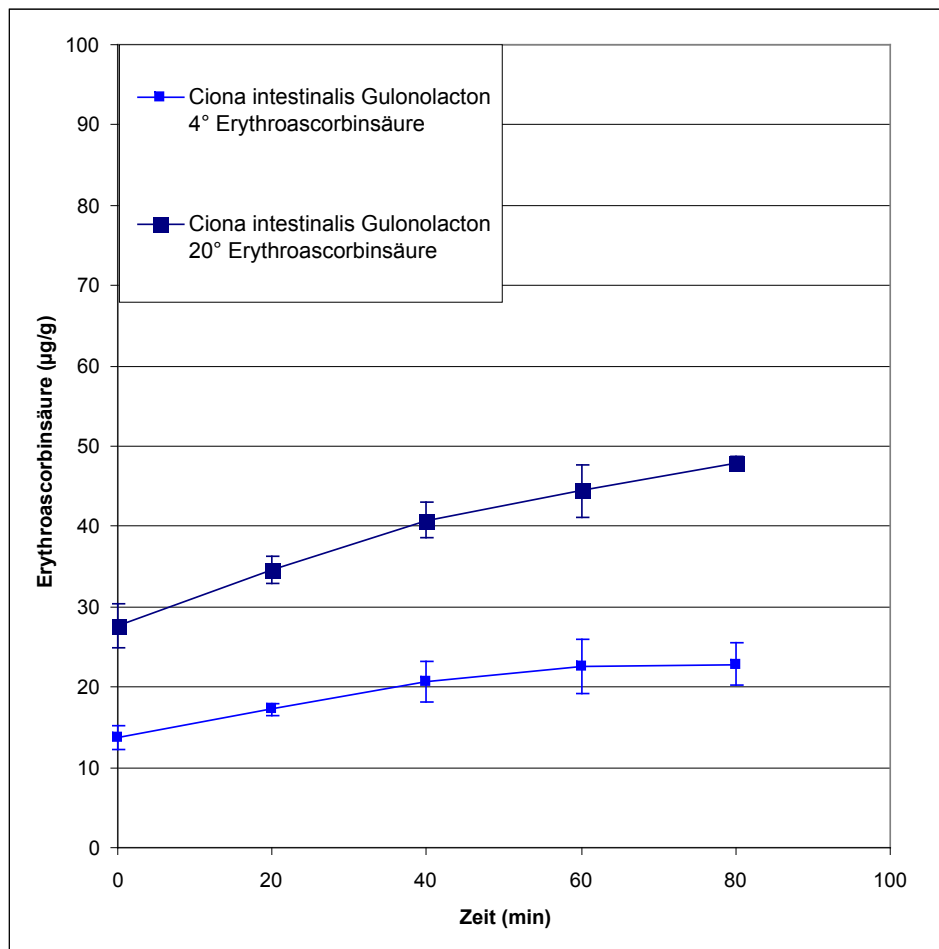


Abb. 3.17: Umsetzung des Substrats L-Gulonolacton zu Erythroascorbinsäure. Die dunkelblaue Kurve mit den großen Kästchen wurde bei 20 °C (n=3) und die blaue mit den kleinen Kästchen bei 4 °C (n=5) gemessen.

Wert von $47,83 \pm 0,81 \mu\text{g/g}$ (berechnet auf Ascorbinsäure) nach 80 min an (n=6, Abb. 3.17, dunkelblau mit großen Kästchen).

Wurden die Werte der Anfangskonzentration (0 min) der Erythroascorbinsäure von $27,57 \pm 2,75 \mu\text{g/g}$ und die Konzentration nach 60 min mit $44,43 \pm 3,34 \mu\text{g/g}$ statistisch getestet, so ergab sich ein hochsignifikanter Unterschied ($p < 0,002$, n=5) zwischen den Werten für diesen Zeitpunkt. Es wurde damit ein signifikanter Anstieg der Erythroascorbinsäure gemessen. Ein nichtparametrischer Test in Form einer Kruskal-Wallis-ANOVA wurde zur Berechnung angewendet. Die Stichprobengröße war n=5 (Abb. 3.18).

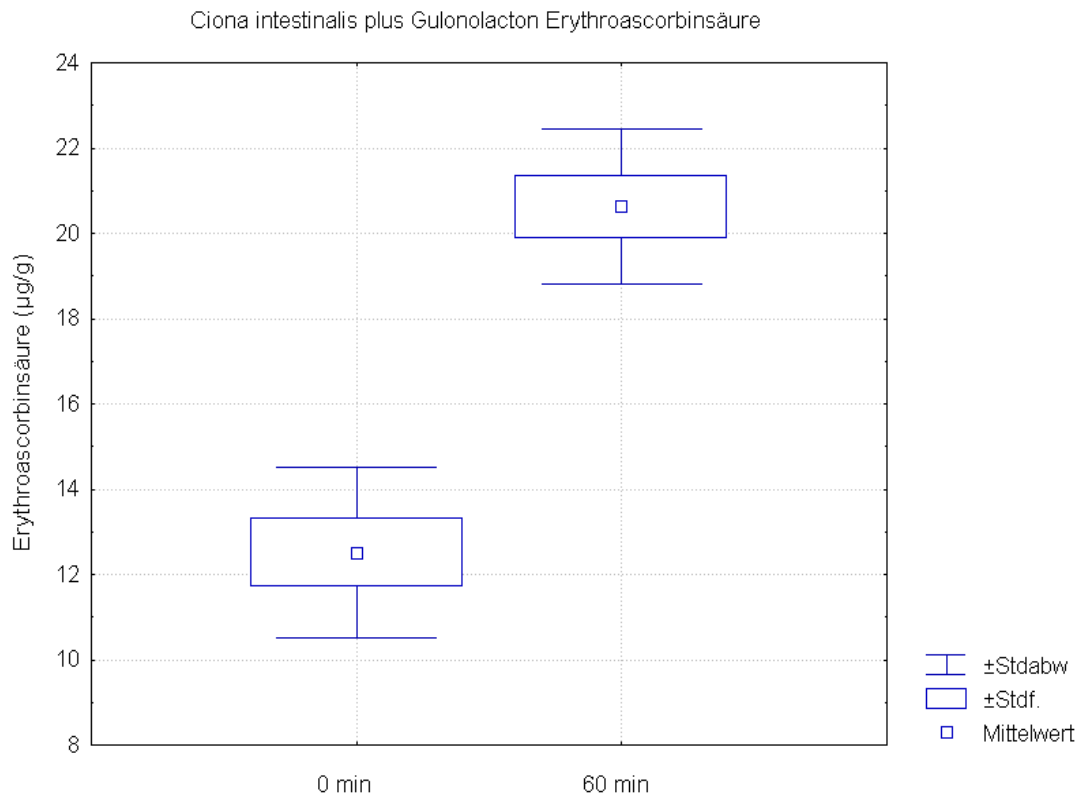


Abb. 3.18: Box & Wiskerplot der Konzentration der Erythroascorbinsäure im Enzymtest von Gewebe von *Ciona intestinalis* zum Zeitpunkt 0 min und 60 min. Das kleine Kästchen in der Mitte zeigt den Mittelwert, das große Kästchen den Standardfehler und die Antennen die Standardabweichung. Der statistische Test ist eine nichtparametrische Klustal-Wallis-Anova. Der Anstieg der Konzentration von 0 min auf 60 min war signifikant. Die Stichprobengröße war $n=5$ ($p < 0,002$).

3.5 Histochemischer Nachweis der Gulonolacton-Oxidase

Mit einer histochemischen Methode wurden die beiden Vertreter der Anthozoa *A. digitatum* und *M. senile* auf ein Gulonolacton oxidierendes Enzym überprüft. Dazu wurde neben der Ascorbinsäure-Vorstufe L-Gulonolacton auch L-Galactonolacton verwendet.

3.5.1 Histochemischer Nachweis der GLO bei *Metridium senile*

Von der Seenelke *M. senile* (Cnidaria, Anthozoa, Hexacorallia) wurden mit einem Kryomikrotom Querschnitte angefertigt. Nach der Inkubation mit L-Gulonolacton als Substrat zeigte sich eine starke Farbreaktion (Abb. 3.19, links). Wurden die Schnitte mit L-Galactonolacton inkubiert, fiel diese Farbreaktion nur sehr schwach aus (Abb. 3.19, rechts).

In der Abbildung 3.19 rechts ist bei 10-facher Vergrößerung gut zu sehen, dass sich nur ein bestimmter Gewebetyp anfärbt. Mit 40-facher Vergrößerung ist in der Abbildung 3.20

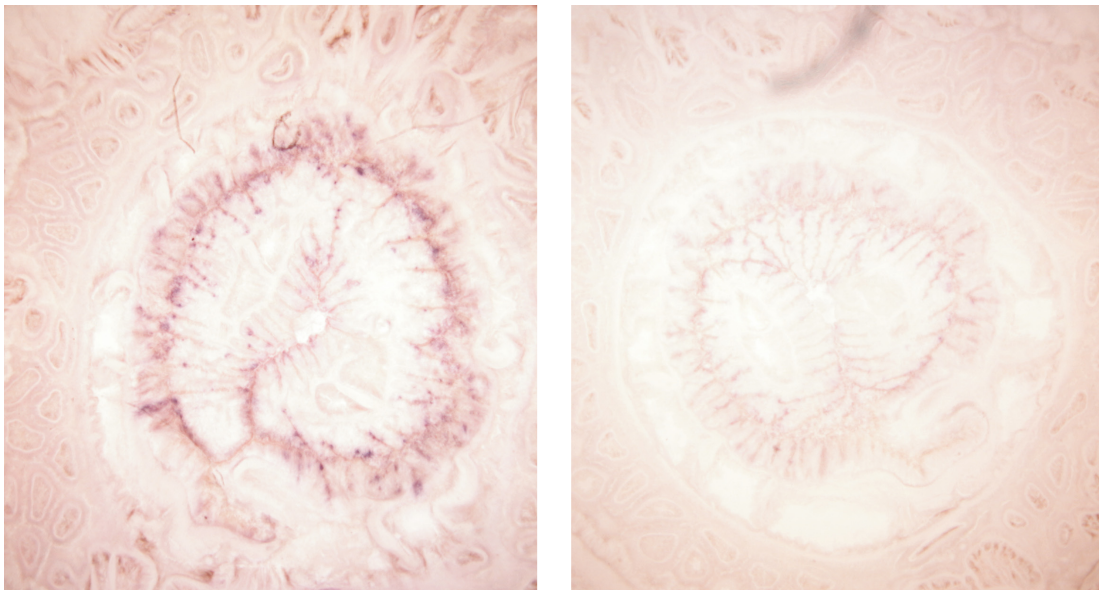


Abb. 3.19: Ein Querschnitt von *Metridium senile*. Mit einem histochemischen Nachweis wurde das Enzym angefärbt, welches L-Gulonolacton zur Ascorbinsäure umwandelt. Links: Mit L-Gulonolacton inkubiert, tritt eine starke Färbung des Gastroderm auf. Rechts: Mit L-Galactonolacton blieb diese Reaktion aus. Vergrößerung 10x.

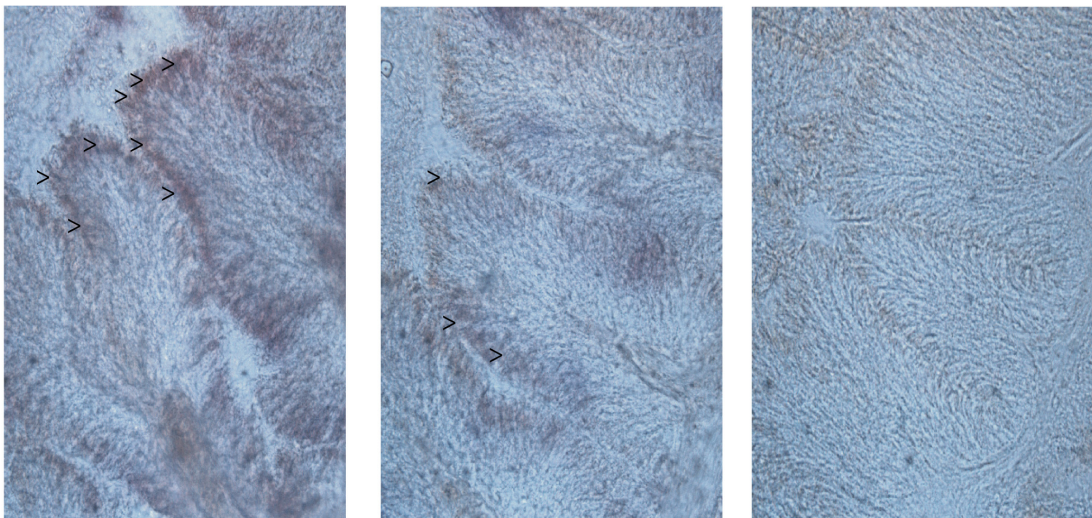


Abb. 3.20: Vergrößerter Ausschnitt aus einem Querschnitts von *Metridium senile*. Histochemischer Nachweis des Enzyms, das den Schritt vom L-Gulonolacton zur Ascorbinsäure katalysiert. Links wurde mit L-Gulonolacton inkubiert. Zu sehen ist eine starke Farbreaktion in den Zellen der Gastrodermis (Pfeile). In der Mitte wurde mit Galactonolacton inkubiert, was eine leichte Farbreaktion in den Gastrodermzellen verursachte (Pfeile). Rechts wurde kein Substrat eingesetzt, ohne Farbreaktion. Vergrößerung 40 x.

ein Ausschnitt aus dem Bereich mit starker Farbreaktion zu sehen, um den Gewebetyp deutlicher darstellen zu können. Die angefärbten Zellen konnten der Gastrodermis zugeordnet werden (Abb. 3.20, links). Ein Enzym, das die Reaktion von L-Gulonolacton zur Ascorbinsäure katalysiert befindet sich bei *M. senile* in der Gastrodermis, die damit als Ort der Ascorbinsäure-Synthese lokalisiert werden konnte. In der Mitte der Abbildung 3.20 ist zum Vergleich ein Ausschnitt dieser Region zu sehen, der mit L-Galactonolacton inkubiert wurde. Rechts wurde kein Substrat verwendet.

3.5.2 Histochemischer Nachweis der GLO bei *Alcyonium digitatum*

Von der Weichkoralle *A. digitatum* wurden ebenfalls mit einem Kryomikrotom Querschnitte erstellt. Nach der Inkubation mit L-Gulonolacton zeigte sich eine deutliche Farbreaktion (Abb. 3.21, links) Mit L-Galactonolacton inkubiert war keine Farbreaktion zu sehen (Abb. 3.21, Mitte). Die Gegenprobe ohne Substrat zeigte ebenfalls keine Farbreaktion (Abb. 3.21, rechts).

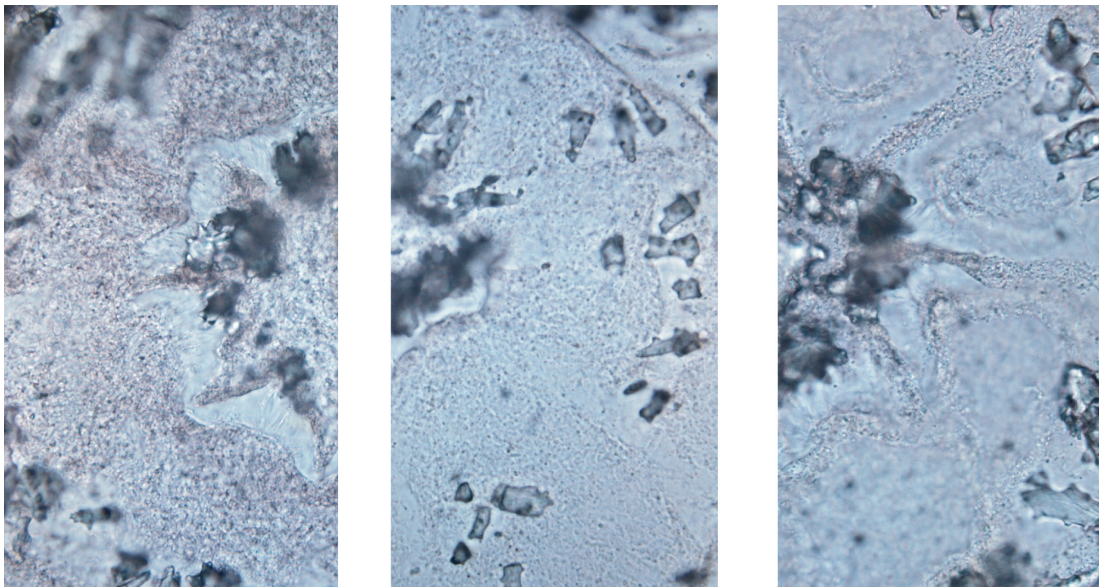


Abb. 3.21: Querschnitt von *Alcyonium digitatum*. Nachweis des Enzyms, das die Vorstufe L-Gulonolacton zur Ascorbinsäure umwandelt. Links wurde mit L-Gulonolacton inkubiert, starke Farbreaktion. In der Mitte wurde mit L-Galactonolacton inkubiert leichte Farbreaktion in den Gastrodermzellen (Pfeile). Rechts wurde kein Substrat eingesetzt, durch Kontraktion des Polypen wirkt der abgebildeten Bereich dunkle, es lag keine Farbreaktion vor. Vergrößerung 40 x.

3.6 Elektronenmikroskopie

Im Gewebe der Weichkoralle *A. digitatum* konnte über die Methode der Transmissions-Elektronenmikroskopie keine Endosymbionten im Gewebe der Tiere nachgewiesen werden. Es fanden sich keine Zellen, die außerhalb des Zellverbandes lagen und die typische Form von Bakterien oder einzellige

Algen, mit Chloroplasten, zu entdecken (Abb. 3.22).

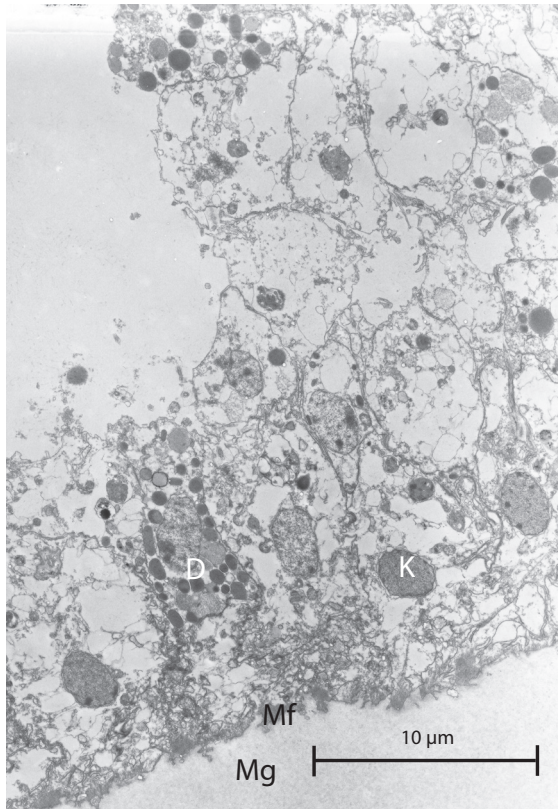


Abb. 3.22: TEM-Aufnahme eines Querschnitts des Ectoderm von *Alcyonium digitatum*. *D* = Drüsenzelle, *K* = Zellkern, *Mf* = Myofibrillen, *Mg* = Mesogloea.

3.7 Molekulare Daten

Vom DOE Joint Genome Institute (JGI, Kalifornien) wurde das komplette Genom der Seescheide *C. intestinalis* sequenziert. Die Daten aus dieser Untersuchung stehen auf der Internetseite (<http://genome.jgi-psf.org/ciona/>) des Instituts zur Verfügung. In der EST von *C. intestinalis* wurde eine Sequenz mit der Bezeichnung ci0100132519 gefunden, die eine Übereinstimmung von 47 % mit der Aminosäuresequenz der Gulonolacton-Oxidase (GLO) der Katzenhai *Scyliorhinus torazame* aufwies. Anhand dieser cDNA ci0100132519 wurden für die vorliegende Arbeit zwei verschiedene Oligonucleotid-Primer Paare entwickelt. Diese Primer sollten jeweils ein Stück von dem

Exon 4 bis Exon 7 und von dem Exon 7 bis Exon 10 amplifizieren. Beide Sequenzen konnten bei *C. intestinalis* von der Insel Helgoland wieder gefunden werden (siehe Anhang: Abb. 7.2 und 7.3, Tab. 3.3). Von 18 weiteren Deuterostomiern konnte nur bei einer weiteren Tunicate, bei *Clavelina lepardiformis* mit dem ersten Primerpaar ein Stück von etwa einem Drittel der entsprechende Sequenz wieder gefunden werden (siehe Anhang: Abb. 7.4, Tab. 3.3).

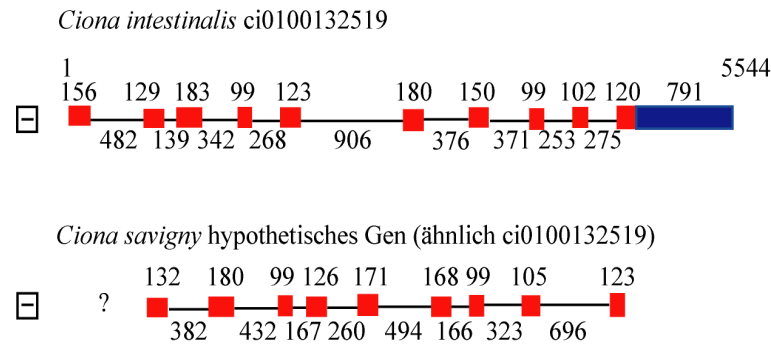


Abb. 3.24: Vergleich der cDNA ci0100132519 von *Ciona intestinalis* und einer entsprechenden Sequenz von *Ciona savignyi*. Die Zahlen sind die Basenpaare, die Exon-Bereiche sind mit roten Kästen angedeutet, die schwarzen Striche sind die die Introns und blau ist ein Tailed End.

Die BLAST-Suche in verschiedenen Datenbanken ergab keine weiteren Treffer. Auch aus der vollständig entschlüsselten Erbinformation der beiden wirbellosen Tieren *Caenorhabditis elegans* und *Drosophila melanogaster* konnte zu dem GLO-Gen keine korrespondierenden Sequenzen gefunden werden.

Der Vergleich der Exon- und Intronbereiche der cDNA ci0100132519 und dem entsprechendem Stück von *C. savignyi* zeigt, dass beide eine sehr hohe Übereinstimmung in der Struktur, wie die Anzahl und Länge der Exone aufweisen (Abb. 3.24). Das erste Exon von *C. savignyi* liegt in einem Bereich, der derzeit noch nicht sequenziert worden ist.

3.8 Phylogenetische Analyse

Von den Vertebraten wurden bisher nur Vertreter der Gruppe der Craniota auf die Fähigkeit der Ascorbinsäuresynthese untersucht. Die Untersuchung von *Petromyzon marinus* zeigte, dass basale Vertretern der Craniota in der Lage sind Ascorbinsäure zu synthetisieren (MOREAU & DABROWSKI 1998). Die Frage, ob die Eigenschaft Ascorbinsäure zu synthetisieren ein ursprüngliches Merkmal der Vertebraten ist, wurde mit der vorliegenden Arbeit geklärt.

3.8.1 Einordnung der biochemischen Daten

Der positiven biochemische Nachweis bei *Branchiostoma lanceolatum* konnte zeigen (3.3.6, Abb. 3.13), dass die Synthesefähigkeit ein Merkmal der Acrania, der ursprünglichsten Gruppe der Vertebrata ist. Jedoch bleibt offen, ob dieses Merkmal bei der Schwestergruppe der Chordata, den Tunicata vorhanden ist (Abb. 3.25). Der Enzymtest an *C. intestinalis* führte zu einem negativen Ergebnis.

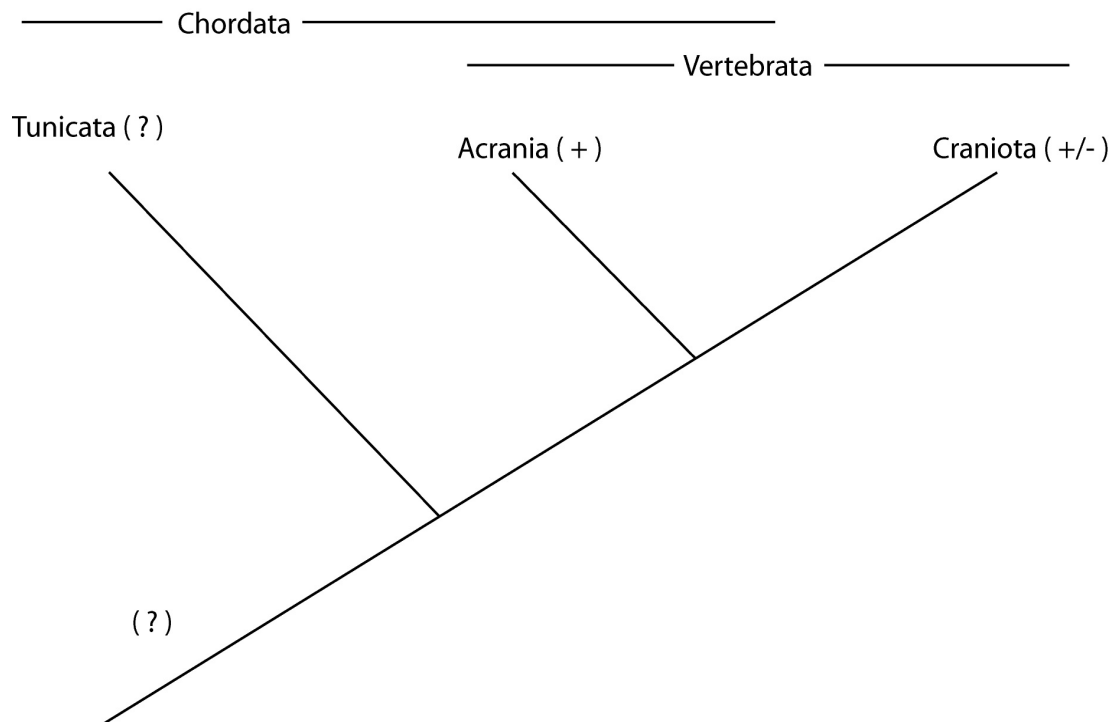


Abb. 3.25: Stammbaum der Chordata. Ein + bedeutet die Anwesenheit der Ascorbinsäuresynthese. Ein - weist die Abwesenheit der Ascorbinsäuresynthese und ein ? auf einen ungeklärten Zustand hin.

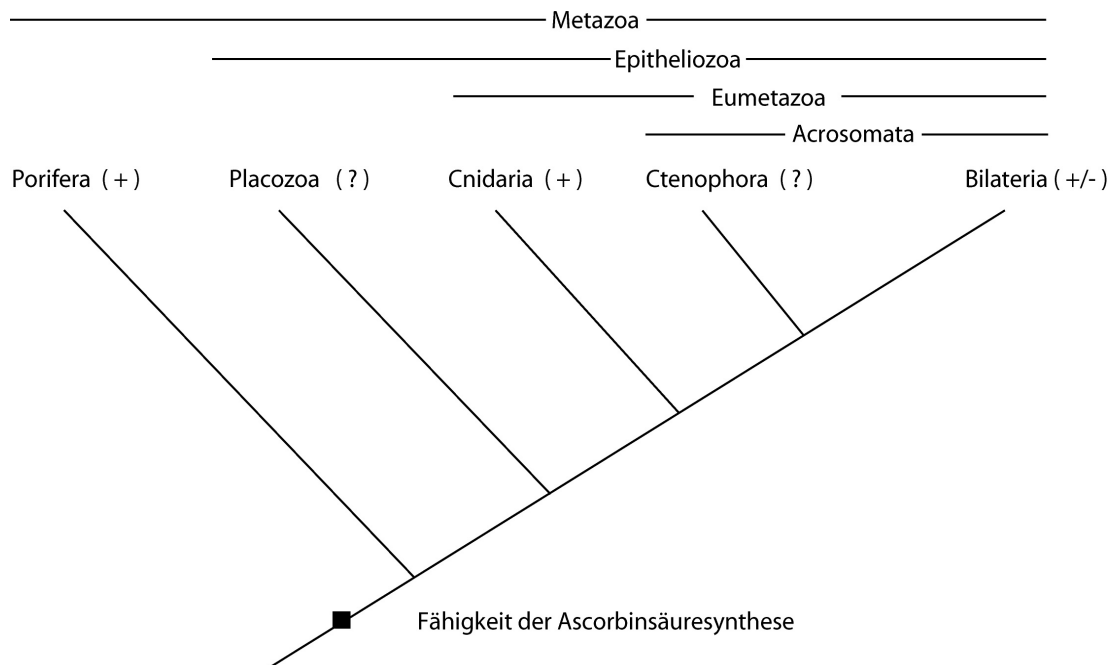
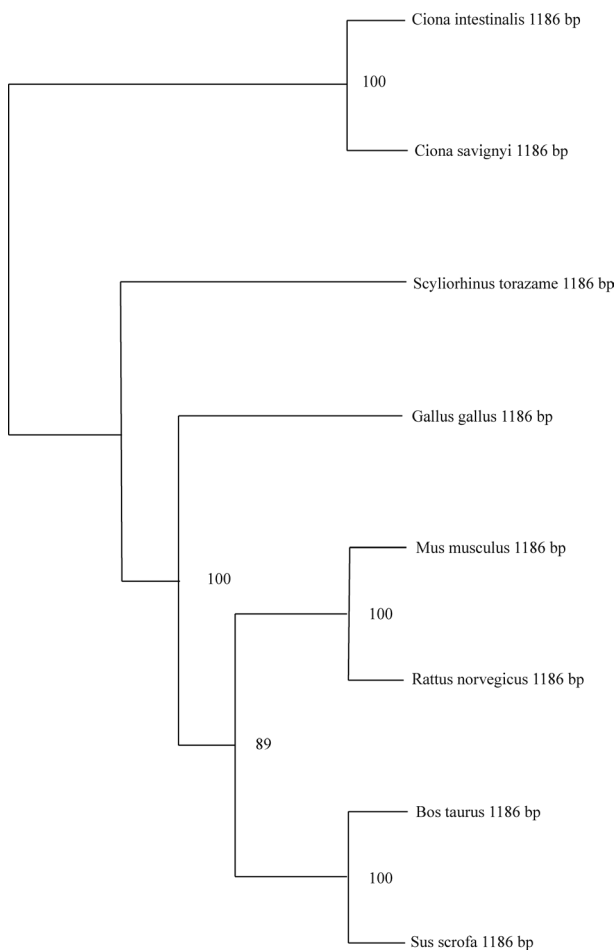


Abb. 3.26: Stammbaum der Metazoa. Ein + bedeutet die Anwesenheit der Ascorbinsäuresynthese. Ein - weist die Abwesenheit der Ascorbinsäuresynthese und ein ? auf einen ungeklärten Zustand hin. Das Kästchen deutet die Apomorphie der Fähigkeit Ascorbinsäure zu synthetisieren an.

Die positiven Ergebnisse der biochemischen Untersuchung bei verschiedenen Nesseltieren und einem Schwamm konnten zeigen, dass die Fähigkeit der Ascorbinsäuresynthese ein Merkmal dieser basalen Gruppen der Metazoa ist (Abb. 3.26). Auch wenn die Gruppen Ctenophora und Placozoa noch nicht auf diese Eigenschaft überprüft worden sind, kann die Synthese als grundsätzliches Merkmal der Metazoa angesehen werden.

3.8.2 Einordnung der molekularen Daten

Mit der Neighbor-Joining Methode wurde eine Verwandtschaftsanalyse der Nukleotid-Sequenzen der GLO-Genen von Wirbeltieren und von zwei *Ciona*-Arten durchgeführt. Da-



bei bilden die Säugetiere ein Cluster, das sich in *Rattus norvegicus* und *Mus musculus* zum einen und in *Bos taurus* und *Sus scrofa* zum anderen unterteilt. Dazu kam von den Vögeln *Gallus gallus* als gut begründete Schwestergruppe heraus. Der Katzenhai *S. torazame* stand dazu als Schwestergruppe und zu allen anderen *C. intestinalis* und *C. savignyi* als ein gut begründetes Cluster. Das Ergebnis dieser Analyse entspricht den bisherigen Verwandtschaftshypothesen der Chordata (Abb. 3.27, Ax 2001). Dieses Beispiel zeigt, dass mit molekularen Daten die Evolution der GLO gut rekonstruiert werden kann.

Abb. 3.27: Verwandtschaftsdiagramm der Chordata, erstellt an der Nucleotid-Sequenz einiger Chordata. Es wurden 1186 Basen für den Vergleich herangezogen. Die Zahlen in den Gabelungen stellen die Bootstrap-Werte dar.