

4 Diskussion

Erst wenige Vertreter der wirbellosen Tiere wurden auf die Fähigkeit zur Ascorbinsäuresynthese untersucht. Diese Untersuchungen kamen zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen. Aus den verschiedenen Gruppen der Insekten zeigten z. B. nur einzelne Arten eine Synthesefähigkeit (KRAMER & SEIB 1982, DADD 1984). Bisherige Untersuchungen zur Evolution der Ascorbinsäure-Synthesefähigkeit der Tiere behandelten die Wirbellosen nur ganz nebensächlich (CHATTERJEE 1973a). Aus diesem Grund wurden einige Gruppen der Wirbellosen bisher noch nicht auf die Fähigkeit der Ascorbinsäuresynthese untersucht. Die vorliegende Arbeit ist die erste Untersuchung der Ascorbinsäuresynthese basaler Gruppen der mehrzelligen Tiere wie die der Cnidaria und ursprünglicher Vertreter der Chordata, wie die Tunicata und die Acrania. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen nicht nur, dass auch ursprüngliche Vertreter der Wirbeltiere in der Lage sind Ascorbinsäure zu synthetisieren, sondern diese Synthesefähigkeit auch bei basalen Gruppen der Metazoa verbreitet ist.

Für die Betrachtung der Evolution der Ascorbinsäuresynthese der Wirbeltiere wurde in der Vergangenheit das Merkmal der Synthesefähigkeit in die bestehenden Verwandtschaftsmodelle eingetragen. Dieses wurde bereits an unterschiedlichen Gruppen der Vertebraten, wie den Vögeln (CHAUDHUDRI & CHATTERJEE 1969), den Primaten (STONE 1972) oder den Craniota (MOREAU & DABROWSKI 2000) durchgeführt und konnte bestimmte evolutive Mechanismen, wie die Verlagerung des Syntheseorts oder den Verlust der Synthese aufklären. CHATTERJEE (1973) weitete die Betrachtung der Evolution der Ascorbinsäuresynthese auf die gesamten Metazoa aus, er untersuchte jedoch dafür nur sehr wenige Arten der Wirbellosen und der Fische. Diese Untersuchungen fielen negativ aus, weil die kleine Stichprobe zufällig aus Gruppen gewählt wurde, die nicht fähig sind Ascorbinsäure zu synthetisieren, wie die Teleostei (MOREAU & DABROWSKI 2000). Als Folge daraus wurde die Ascorbinsäuresynthese bei Wirbellosen und Fischen generell abwesend erklärt und als eine neue Entwicklung der Tetrapoden angenommen. Weitere Untersuchungen der Ascorbinsäuresynthese der Fische zeigten, dass diese Fähigkeit generell bei den Craniota vorhanden und bei den Teleostei verloren gegangen ist (MOREAU & DABROWSKI 2000, siehe 1.1.1, Abb. 1.2).

Wie bereits erwähnt, konnte mit der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass ursprüngliche Vertreter der Wirbeltiere und basale Gruppen der Metazoa in der Lage sind Ascorbinsäure zu synthetisieren. Die Frage, ob die Ascorbinsäuresynthese der Wirbeltiere und der Wirbellosen auf einen Ursprung zurückgeht, kann letztlich nur durch den Vergleich der

genetischen Information der Enzyme für die Ascorbinsäuresynthese beantworten helfen. Bisher wurden nur die molekularen Daten des Gens für eine phylogenetische Betrachtung herangezogen, welches das Enzym Gulonolacton-Oxidase (GLO) kodiert, das den letzten Schritt im Syntheseweg der Ascorbinsäure katalysiert. Es wurden dazu wenige Vertreter der Primaten untersucht, bei denen kein aktives Enzym vorhanden ist (OHTA & NISHIKIMI 1999). Deshalb wurde nur eine kurze Sequenz für diese Untersuchung ausgewählt, die dem Exon 10 der Gulonolacton-Oxidase der Ratte entspricht. In der hier vorliegenden Arbeit wurden die bisher in Gen-Datenbanken veröffentlichten GLO-Gen-Sequenzen von Wirbeltieren für eine phylogenetische Analyse herangezogen. Zusätzlich eine cDNA-Sequenz von *Ciona interstinalis*, die erkennbare Ähnlichkeit zu dem GLO-Gen der Wirbeltiere aufwies. Es existieren allerdings bisher noch zu wenig molekulare Daten für die Enzyme der Ascorbinsäuresynthese, um die Evolution dieser Synthese bei den Metazoa abschließend klären zu können.

Im Folgenden werden zunächst die Methoden, die für die Bearbeitung der vorliegenden Untersuchung verwendet wurden, diskutiert. Im Anschluss werden die gewonnenen Ergebnisse mit der bestehenden Literatur erörtert.

4.1 Diskussion der Methoden

4.1.1 Biochemische Untersuchung der Ascorbinsäuresynthese

Die biochemische Untersuchung der Ascorbinsäuresynthese gliedert sich in zwei Teile, dem *in vitro*-Test auf ein Gulonolacton oxidierendes Enzym und der Messung der Ascorbinsäurekonzentration.

4.1.1.1 Test auf ein Gulonolacton oxidierendes Enzym

Mit dem biochemischen Verfahren eines *in vitro*-Enzymtests wurden bereits häufig Vertreter verschiedener Gruppen der Invertebraten auf die Ascorbinsäure-Synthese untersucht (GAMO & SEKI 1954 nach LEGAY 1958, ROUSELL 1957, BRIGGS 1962, PIERRE 1962, RAYCHANDHURI & BANERJEE 1968, GUPTA et al. 1972, CHATTERJEE 1973a, KRAMER et al. 1981, WALLACE et al. 1985, DEJARDINS et al. 1985, DABROWSKI 1990, Tab. 4.1).

Diese Untersuchungen kamen zum Teil sogar für dieselben Tierarten zu unterschiedlichen Ergebnissen. So wurde für *Bombyx mori* von GAMO & SEKI (1954 nach LEGAY 1958) eine Synthese der Ascorbinsäure beschrieben. GUPTA et al. (1972) konnten dieses Ergebnis nicht bestätigen und wiesen auf eine Störung des von GAMO & SEKI (1954 nach LEGAY 1958) verwendeten Messverfahren durch das eingesetzte Substrat Mannose hin. Der gleiche Messfehler könnte auch ROUSELL (1957, 1958) und RAYCHANDHURI & BANERJEE

(1968) bei der Feststellung der Ascorbinsäuresynthese durch *Periplaneta americana* unterlaufen sein. KRAMER et al. (1981) fanden mit einem anderen Verfahren keine Syntheseleistung bei *P. americana*. Da auch BRIGGS (1962) die Mannose als Substrat einsetzte, ist auch sein Ergebnis fraglich. Damit bleiben lediglich die positiven Ergebnisse von DEJARDINS et al. (1985) an *Homarus americanus* und von WALLACE et al. (1985) an *Limulus polyphemus* bestehen. Leider wurden die Wirbellosen von CHATTERJEE (1973a) nur sehr unzureichend bestimmt, so dass die Ergebnisse sich für einen Teil der untersuchten Tiere nicht mehr nachvollziehen lassen.

Tab. 4.1: Bisher biochemisch *in vitro* untersuchte Invertebraten.

Autoren	Tiere	Ergebnis
GAMO & SEKI (1954 nach LEGAY 1958)	<i>Bombyx mori</i> (Lepidoptera)	Synthese mit D-Mannose
ROUSELL (1957)	<i>Periplaneta americana</i> (Blattariae)	Synthese mit D-Mannose
BRIGGS (1962)	<i>Musca domestica</i> (Diptera)	Synthese mit D-Mannose
RAYCHANDHURI & BANNERJEE (1968)	<i>Periplaneta americana</i> (Blattariae)	Synthese mit D-Mannose
PIERRE (1962)	<i>Leucophaea maderae</i> (Blattariae)	Keine Synthese
GUPTA et al. (1972)	<i>Periplaneta americana</i> (Blattariae)	Keine Synthese
GUPTA et al. (1972)	<i>Coryra sp.</i> (Lepidoptera)	Keine Synthese
GUPTA et al. (1972)	<i>Tryptophyr incerculas</i> (Lepidoptera)	Keine Synthese
GUPTA et al. (1972)	<i>Auripennis lepel</i> (Lepidoptera)	Keine Synthese
GUPTA et al. (1972)	<i>Bombyx mori</i> (Lepidoptera)	Keine Synthese
GUPTA et al. (1972)	<i>Spingomorpha chlorae</i> (Lepidoptera)	Keine Synthese
GUPTA et al. (1972)	<i>Polistes herbraeus</i> (Hymenoptera)	Keine Synthese
GUPTA et al. (1972)	<i>Apis indica</i> (Hymenoptera)	Keine Synthese
GUPTA et al. (1972)	<i>Plebeiogryllus guttiventris</i> (Ensifera)	Keine Synthese
CHATTERJEE (1973a)	<i>Pila sp.</i> (Gastropoda)	Keine Synthese
CHATTERJEE (1973a)	<i>Spider sp.</i> (evtl. Araneae) ¹	Keine Synthese
CHATTERJEE (1973a)	<i>Myriapod sp.</i> (evtl. Symphyla) ¹	Keine Synthese

¹ Die Benennungen *Spider sp.* und *Myriapod sp.* sind wenig detailliert, so dass die Untersuchungen für diese Tiere nicht reproduzierbar sind.

Autoren	Tiere	Ergebnis
CHATTERJEE (1973a)	<i>Palemon sp.</i> (Decapoda)	Keine Synthese
CHATTERJEE (1973a)	<i>Scylla sp.</i> (Decapoda)	Keine Synthese
CHATTERJEE (1973a)	<i>Pheretima sp.</i> (Annelida)	Keine Synthese
CHATTERJEE (1973a)	<i>Hirudinaria sp.</i> (Annelida)	Keine Synthese
KRAMER et al. (1981)	<i>Manduca sexta</i> (Lepidoptera)	Keine Synthese
KRAMER et al. (1981)	<i>Plodia interpunctella</i> (Lepidoptera)	Keine Synthese
KRAMER et al. (1981)	<i>Periplaneta americana</i> (Blattari-ae)	Keine Synthese
WALLACE et al. (1985)	<i>Limulus polyphemus</i> (Xiphosura)	Synthese mit L-Gulonolacton
DEJARDINS et al. (1985)	<i>Homarus americanus</i> (Decapoda)	Dehydroascorbinsäure – Synthese mit Glucose
DABROWSKI (1990)	<i>Astacus leptodactylus</i> (Decapoda)	Keine Synthese

Der *in vitro*-Test auf ein Gulonolacton oxidierendes Enzym ist ein schnelles Verfahren zur Untersuchung der Ascorbinsäuresynthese. Diese Methode weist jedoch je nach Versuchsprotokoll Schwächen auf, wie die unterschiedlichen Ergebnisse der Untersuchungen an *B. mori* und *P. americana* zeigen. Ein vermeintlich positives Ergebnis kann durch endosymbiontische Organismen hervorgerufen werden, die in der Lage sind, Ascorbinsäure oder ähnliche Substanzen zu produzieren (PIERRE 1962). Zum anderen können Fehler in der Messmethode nach ROE & KUETHER (1943) durch eine Farbreaktion auftreten, sobald die Mannose als Substrat verwendet wurde (GUPTA et al. 1972). Das Problem der Endosymbionten wird unter 4.2.3 ausführlich diskutiert. Ein fehlerhaftes Ergebnis kann auftreten, wenn die Ascorbinsäure während der Inkubation nicht ausreichend stabilisiert wird und der Zerfall die Neubildung überwiegt (MASSIE 1991, siehe 3.3.3, Abb. 3.6). Auch kann die Aktivität der Enzyme durch Substanzen wie Desoxycholat negativ beeinflusst werden (WALLACE et al. 1985).

Die früheren *in vitro*-Untersuchungen auf die Ascorbinsäuresynthese der Wirbellosen wurden mit sehr unterschiedlichen Versuchsabläufen durchgeführt. Gewebe der Tiere wurde direkt als Homogenat verwendet (ROUSELL 1957) oder nach der Homogenisierung mit Hilfe der Zentrifugation vorgereinigt (WALLACE et al. 1985, DABROWSKI 1990). Eine bessere Trennung erbrachte eine Dichtegradienten-Zentrifugation nach der Methode von

AYAZ et al. (1976) mit dem Einsatz einer 0,2 %igen Natriumdesoxycholat-Lösung. Wie bereits beschrieben, fand WALLACE et al. (1985) eine negative Wirkung von Natriumdesoxycholat auf die Aktivität der Gulonolacton-Oxidase von *L. polyphemus* und damit eine Verminderung in der Ascorbinsäuresynthese. In der hier vorliegenden Arbeit wurden die Proben ohne Desoxycholat zentrifugiert, um diesen Effekt zu vermeiden.

Bei mehrmaliger Wiederholung des *in vitro*-Test, konnte die Konzentration der Ascorbinsäure in der vorliegenden Arbeit hohe Schwankungen aufweisen, wie z. B. bei *Alcyonium digitatum* (3.3.3, Abb. 3.7). Ein Grund für diese Abweichungen kann darin liegen, dass das Feuchtgewicht als Bezugsgröße diente. Bei Weichkorallen, Seeanemonen und Seescheiden hängt das Feuchtgewicht vom Wassergehalt der Tiere ab, der sich bei Kontraktion der Tiere verändert. Eine bessere Referenzgröße als das Feuchtgewicht wäre deshalb die Bestimmung der Proteingehalts des zentrifugierten Gewebehomogenates. Da viele der vorhergehenden Arbeiten sich auf das Feuchtgewicht bezogen, wurde diese Methode für die hier vorliegende Arbeit gewählt.

In vorhergehenden Untersuchungen wurde teilweise eine Vielzahl von möglichen Vorstufen der Ascorbinsäure eingesetzt, da kein Syntheseweg der Ascorbinsäure für Wirbellose bekannt war. Als Vorstufen wurden Monosaccharide wie Mannose, Glucose, Fructose, Galactose oder Xylose getestet (ROUSELL 1957, BRIGGS 1962). Die Beschreibung des Syntheseweges der Säugetiere (ISHERWOOD et al. 1953, 1954, BURNS & EVANS 1956, Abb. 1.1) führte dazu, dass zusätzlich die einzelnen Schritte dieses Weges bei Wirbellosen überprüft wurden. GUPTA et al. (1972) setzen neben Glucose, Fructose und Galactose die Substrate D-Glucoronolacton, D-Gluconsäure, L-Gulonolacton und L-Galactonolacton als Substrate bei Insekten ein. In anderen Untersuchungen wurde nur der letzte Schritt vom L-Gulonolacton zur L-Ascorbinsäure überprüft (KRAMER et al. 1981, DABROWSKI 1990). In der hier vorliegenden Arbeit wurde die Vorstufe L-Gulonolacton getestet. Bei einigen Tieren wurde auch L-Galactonolacton eingesetzt, um weitere Informationen über die Substratverwertung der untersuchten Tiere zu erhalten.

Der pH-Wert für eine optimale Ascorbinsäuresynthese wurde von BRIGGS (1962) für *Musca domestica* zwischen 6,5 und 7,0 angegeben. In diesem Bereich wählte auch ROUSELL (1957) die Bedingungen für den *in vitro*-Test. Andere Untersuchungen setzten für die Inkubation einen pH-Wert von 7,4 ein (WALLACE et al. 1985, DABROWSKI 1990). Der pH für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurde nach den Angaben von BRIGGS (1962) auf 6,8 eingestellt.

MASSIE et al. (1991) erreichten eine Stabilisierung der Ascorbinsäure durch den Einsatz von Chelatbildnern. Bei der Homogenisierung des Gewebes und dem Aufschluss der Zel-

len könnten Metall-Ionen freigesetzt werden und den Zerfall der Ascorbinsäure durch Oxidation verursachen, wie es DODDS (1948) für Kupfer-Ionen und KAHN & MARTELL (1967) für Eisen- und Kupfer-Ionen beschrieben hatten. Eine Möglichkeit die Metall-Ionen unschädlich zu machen, ist, sie als Chelat zu binden. Um dieses zu bewirken, wurde EDTA (DABROWSKI 1990) oder DTPA / Hepes² (MASSIE et al. 1991) bei der Untersuchung von Insekten oder Krebsen dem Reaktionspuffer zugefügt. Einen weiteren Schutz vor Oxidation der Ascorbinsäure stellt nach WINKLER (1987) der Einsatz von Glutathion (GSH) dar. Für die vorliegende Arbeit wurden deshalb erfolgreich EDTA und GSH zur Stabilisierung der Ascorbinsäure während der Inkubation mit dem Substrat eingesetzt.

Auch bezüglich der Inkubations-Temperatur der Proben existieren unterschiedliche Angaben. ROUSELL (1957) ermittelte 25-30 °C als beste Temperatur. DABROWSKI (1990) wählte 25 °C. WALLACE et al. (1985) untersuchten den Pfeilschwanz sogar bei 37 °C. Diese Temperatur wurde vorher bei den Untersuchungen von Säugetieren eingestellt (CHATTERJEE et al. 1961). In den vorliegenden Untersuchungen wurden für die Ermittlung der optimalen Temperatur einige Vortests bei 4, 10 und 20 °C durchgeführt. Bei 20 °C und 10 °C kam es bei *A. digitatum* zur Abnahme der Ascorbinsäurekonzentration (3.3.3 Abbildung 3.6). Nur bei einer Temperatur von 4 °C wurde bei *A. digitatum* eine Produktion der Ascorbinsäure beobachtet. Es wird angenommen, dass die Ascorbinsäure durch die niedrige Temperatur stabilisiert wird (BRADLEY et al. 1973) und die Enzymaktivität auch bei Eiskühlung vorhanden war. Kälte führt bei Tieren und auch bei Pflanzen zum Ansteigen des Ascorbinsäuregehalts. Die Ascorbinsäurekonzentration von *Drosophila melanogaster* stieg, nachdem die Fliegen für kurze Zeit bei einer Temperatur von 4 °C gehalten worden waren (MASSIE et al. 1991). Bei der alpinen Pflanze *Soldanella alpina* führten Kälte und Licht zu einer Verdoppelung des Ascorbinsäuregehalts der Blätter (STREB et al. 2003).

Auch die Inkubationszeit der Proben ist in der Literatur sehr unterschiedlich angegeben. ROUSELL (1957) ermittelte drei Stunden als die optimale Zeit, die für die Inkubation. WALLACE et al. (1985) inkubierten die Proben über siebeneinhalb Stunden und DESJARDINS et al. (1985) sogar zwölf Stunden. DABROWSKI (1990) konnte mit einem photometrischen Verfahren über einen Zeitraum einer Stunde alle zehn Minuten die Konzentration der Ascorbinsäure bestimmen. In der vorliegenden Arbeit gab die Dauer eines HPLC-Laufs von zwanzig Minuten den Abstand zwischen den einzelnen Proben vor, so dass nach dem Ende eines Chromatographie-Laufs sofort die nächste Probe injiziert wurde. Es wurde ein Verlauf von mindestens 60 min bis maximal 120 min beobachtet. Die Messreihen mit nur 60 min wurden durch die geringe Menge an Material mancher Tiere begrenzt, die nur wenige Unterproben aus dem Homogenat zuließ. Bei den Messungen der Ascorbin-

² DTPA (Diethylenetriaminpentaessigsäure), Hepes (N[2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure)

säuresynthese von *A. digitatum* konnte nach 80 min ein Abflachen des Anstiegs der Ascorbinsäurekonzentration beobachtet werden (Abb. 3.7, blaue Kurve), so dass eine obere Grenze von 120 min gesetzt wurde.

4.1.1.2 Messverfahren für die quantitative Bestimmung der Ascorbinsäure

Das erste chemische Verfahren zur quantitativen Messung der Ascorbinsäure wurde von TILLMANS (1927) beschrieben. Dieses titrimetrische Verfahren mit 2,6-Dichlorophenol-indophenol ist nicht spezifisch für Ascorbinsäure, genau wie andere Titrations mit Jod, Natriumhexacyanoferrat III, Methylenblau, Chloramin oder 1,2-Naphthochinon-1-sulfonsäure (JAFFE 1984). Andere reduzierende Substanzen wie Aminosäuren, Zucker oder Metall-Ionen können bei der Messung interferieren. Bei einem anderen Verfahren mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin nach ROE & KUETHER (1943) bewirkte durch eine Farbreaktion der Mannose eine Störung der Ascorbinsäuremessung (GUPTA et al. 1972). Chromatographische Verfahren können die Ascorbinsäure und ähnliche Substanzen voneinander trennen. Die Papierchromatographie (CRAMER 1962) und die Dünnschichtchromatographie (SAARI et al. 1967, STAHL 1967, WALLACE et al. 1985) zeigten eine hohe Empfindlichkeit und eine gute Auflösung. Auch die Gaschromatographie ist sehr präzise, benötigt aber eine Derivatisierung der Ascorbinsäure (ARYA et al. 2000). Direkt und mit hoher Empfindlichkeit kann die Ascorbinsäure mit der Hochauflösende-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) gemessen werden. Diese Methode wurde bereits für die quantitative Analyse der Ascorbinsäure aus dem Gewebe verschiedener Wirbelloser angewendet (KRAMER et al. 1981, MASSIE et al. 1991, LUCCHETTI et al. 1999).

Für die HPLC-Messung müssen die Proben vorgereinigt werden. Dafür wurden unbehandelte Gewebeprobe zentrifugiert, wie bereits unter 4.1.1.1 beschrieben. Aus dem zentrifugierten Gewebehomogenat wurden Proteine durch die Behandlung mit Säure gefällt und im Anschluss noch einmal zentrifugiert. In der vorliegenden Untersuchung wurden Proteine aus dem Homogenat mit 12 %iger Perchlorsäure gefällt und damit gleichzeitig die Reaktion der Ascorbinsäurebildung gestoppt. Diese Aufreinigung wurde von REIBER et al. (1993) mit leichter Abänderung übernommen. REIBER et al. (1993) verwendeten Perchlorsäure für die Fällung der Proteine von Blut- und Cerebrospinalflüssigkeits-Proben vor der HPLC-Messung der Ascorbinsäure. In einer anderen Untersuchung wurden z. B. die enzymatische Bildung der Ascorbinsäure mit Trichloressigsäure und Perchlorsäure abgestoppt und damit die Proteine gefällt (DABROWSKI 1990). Diese leichten Unterschiede in der Aufbereitung der Proben, wie sie in der Literatur beschrieben wurden, fasste JAFFE (1984) zusammen.

Da aus der Perchlorsäurefällung ein niedriger pH-Wert resultierte, der die Qualität der Trennsäule beeinträchtigen kann, wurden die Proben im Anschluss mit wenig hochkonzentrierter Kalilauge versetzt um den pH zu erhöhen (REIBER et al. 1993). Für die vorliegende Arbeit wurde nach der Perchlorsäurefällung der pH-Wert der Proben mit Natronlauge leicht erhöht, um so die Trennsäule zu schonen.

Für die HPLC-Messung der Ascorbinsäure wurden in der Vergangenheit sehr unterschiedliche Eluenten eingesetzt. Dabei variierte die mobile Phase von rein wässrigen Pufferlösungen, einer Mischung mit organischen Lösungsmitteln wie Methanol oder Acetonitril, bis zu rein organischen Lösungsmitteln (JAFFE 1984). Für die vorliegende Arbeit wurde der Eluent und eine Umkehrphasensäule wie in den Untersuchungen von REIBER et al. (1994) verwendet. Bei diesem Verfahren wurde ein wässriger Natriumphosphatpuffer mit einem saurem pH-Wert (3,2) eingesetzt. REIBER et al. (1993) setzen der mobilen Phase 1,6 %iges Methanol bei. Für die vorliegende Untersuchung wurde kein Methanol eingesetzt, weil dadurch das Laufmittel etwas weniger polar wurde und sich die Trennung verschlechterte. Ein niedriger pH-Wert stabilisierte die Ascorbinsäure (SÁNCHEZ-MATA et al. 2000). Zusätzlich wurde dem Laufmittel EDTA zugesetzt, dessen Wirkung unter 4.1.1.1 beschrieben wurde und Natriumoctylhydrogensulfat als Konter-Ion verwendet.

In der Literatur wurden unterschiedliche Möglichkeiten zur Detektion von Ascorbinsäure angegeben. Es wurden elektrochemische Detektoren (GEIGERT et al. 1981, CARR et al. 1983, BEHRENS & MADERE 1992, ROSE & BODE 1995) oder photometrische Detektoren (REIBER et al. 1993, REIBER et al. 1994, ROSS 1994) eingesetzt. In wässriger Lösung hat die Ascorbinsäure ein UV-Extinktions-Maximum bei 262 nm (ISLER et al. 1988). Die Messung der Ascorbinsäure bei unterschiedlichen Wellenlängen zeigte, dass bei den Messbedingungen in der vorliegenden Arbeit das Maximum der L-Ascorbinsäure ungefähr bei 240 nm lag (3.1, Abb. 3.2). Der UV-Detektor mit variabler Wellenlängeneinstellung wurde auf 250 nm eingestellt, da durch zahlreiche Vorversuche eine gute Trennung der Ascorbinsäure von benachbarten Peaks bei dieser Wellenlänge ermittelt werden konnte.

In der Vergangenheit wurden einige Methoden beschrieben, die in der Lage waren, die stereoisomeren Formen der Ascorbinsäure, L-Ascorbinsäure und D-Isoascorbinsäure, zu trennen (DONER & HICKS 1981, BEHRENS & MADRE 1992, KIMOTO et al. 1997). Mit der Methode der vorliegenden Arbeit war es nicht möglich, die beiden Formen der Ascorbinsäure zu trennen. Sowohl die L-Ascorbinsäure als auch die D-Isoascorbinsäure hatte bei der HPLC-Messung eine Retentionszeit (Rt) von ca. 5,4 min aus verschiedenen Gruppen. Eine Mischung der Reinsubstanzen beider Formen der Ascorbinsäure ergab bei der HPLC-Messung nur einen klaren Peak (Abb. 3.13, rechte Kurve).

Die Ascorbinsäure zeigt bei der Messung mit unterschiedlichen Wellenlängen ein typisches UV-Spektrum (ISLER et al. 1988). Die Aufnahme einer Standard-Lösung von L-Ascorbinsäure (Abb. 3.2, grüne Kurve) und D-Isoascorbinsäure (Abb. 3.2, rote Kurve) bei den Wellenlängen von 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280 und 290 nm ergab, dass die Spektren dieser beiden Substanzen leicht voneinander abwichen (3.1). Das Profil der Ascorbinsäure, die sich nach der Zugabe von L-Gulonolacton bei *Sargatiogeton undatus* bildete, zeigte bei den Wellenlängen von 230, 240, 250 und 260 nm (Abb. 3.2, blaue Kurve) eine größere Ähnlichkeit zu dem Profil der L-Ascorbinsäure.

Wie unter 3.4.3 beschrieben wurde die Zunahme einer Substanz nach der Zugabe von L-Gulonolacton auf das *C. intestinalis* beobachtet, die als D-Erythroascorbinsäure angenommen wurde. Diese Erythroascorbinsäure hatte in der HPLC-Messung eine Rt von 5,2 min (L-Ascorbinsäure und D-Isoascorbinsäure hatten eine Rt von 5,4 min). Ein Anstieg des Peaks bei der Rt von 5,2 zeigte sich auch nach dem Zugeben von L-Gulonolactone oder L-Galactonolactone auf die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*. Aus der Literatur ging hervor, dass Hefen nicht in der Lage sind L-Ascorbinsäure zu produzieren, sondern nur D-Isoascorbinsäure und D-Erythroascorbinsäure (Arrigoni & DeTullio 2002, Smirnoff 2003). Mit Hilfe eines inneren Standards konnte die D-Isoascorbinsäure ausgeschlossen werden. Daraus folgte die Annahme, dass es sich um d-Erythroascorbinsäure handelt, die sich nach der Zugabe von L-Gulonolactone oder L-Galactonolactone auf *C. intestinalis* bildet.

Durch Oxidation der Ascorbinsäure entsteht Dehydroascorbinsäure (DHA). Bei weniger stabilisierenden Bedingungen konnte die Ascorbinsäure zur DHA zerfallen. Die DHA zeigt aber nur eine schwache Absorption des Lichtes (SÁNCHEZ-MATA et al. 2000) und konnte mit der eingesetzten Messmethode nicht gemessen werden. Ein Zerfall der Ascorbinsäure konnte z. B. bei der Gegenprobe von *A. digitatum* beobachtet werden (3.3.3). Wurde kein Substrat zu dem Homogenat gegeben, so nahm die Konzentration der Ascorbinsäure kontinuierlich ab (Abb. 3.7, rote Kurve). Es wurden Messmethoden zur direkten Messung der DHA beschrieben (DAVEY et al. 1997). SAUBERLICH et al. (1982) zeigten eine Absorption der DHA bei 228 nm. Die DHA konnte erst nach Reduktion zur Ascorbinsäure mit einer indirekten Messung erfasst werden. Von der dadurch gebildeten Gesamtascorbinsäure musste die anfängliche Konzentration der Ascorbinsäure abgezogen werden, um die Konzentration der DHA zu erhalten. Als Reduktionsmittel wurde in der vorliegenden Arbeit Dithiothreitol (DTT) verwendet (WUNDERLING et al. 1986). Bei dieser Methode mussten immer zwei Messungen durchgeführt werden. Da der Zerfall der Ascorbinsäure in einigen Vorproben nicht so hoch war (3.2, Tab. 3.1), wurde die DHA nicht weiter

untersucht. DESJARDINS et al. (1985) beobachteten bei dem Hummer *H. americanus* eine Produktion von DHA mit Glucose als Substrat. In der vorliegenden Arbeit konnte z. B. bei *Aiptasia sp.* ein direkter Anstieg der Ascorbinsäure um 47 % nach 30 min beobachtet werden (Tab. 3.2). Der Anstieg der DHA war mit 62,07 % in der gleichen Zeit zwar etwas höher, aber weil die Messung der DHA die Messzeit verdoppelt hätte, wurde auf diese Messung verzichtet.

Die Messung der Ascorbinsäure mit der HPLC-Methode ergab eine differenzierte Analyse, die in der Lage war Ascorbinsäure und Erythroascorbinsäure zu erfassen. Es fand keine Trennung von L-Ascorbinsäure und D-Isoascorbinsäure auf der Umkehrphasensäule statt. Mit der Aufnahme des Profils von L-Ascorbinsäure und D-Isoascorbinsäure bei verschiedenen Wellenlängen ergab sich der Hinweis, dass es sich bei der Ascorbinsäure, die sich bei *S. undatus* nach der Zugabe von L-Gulonolacton bildete, um L-Ascorbinsäure handelt. Diese Unterscheidung der unterschiedlichen Formen der Ascorbinsäure und der Erythroascorbinsäure half dabei, die Ascorbinsäuresynthese des Tieres von einer eventuellen Produktion symbiontischer Organismen (4.1.3, Abb. 4.1) abzugrenzen.

4.1.2 Methode des histochemischen GLO-Nachweis

Mit histochemischen Methoden wurden Wirbellose bisher nur qualitativ auf die Anwesenheit von Ascorbinsäure untersucht (DAY 1944, SMYTH et al. 1944, BRIGGS 1962). Bei diesem Verfahren wurde Silbernitrat in Silberchlorid reduziert und die Ascorbinsäure oxidiert. Dadurch konnte sichtbar gemacht werden, in welchen Geweben und Organen höhere Ascorbinsäurekonzentrationen auftreten, wie in den Gonaden oder im Nervengewebe (BRIGGS 1962). Jedoch konnte keine Aussage getroffen werden, ob die Ascorbinsäure von dem Tier produziert oder über die Nahrung aufgenommen wurde. Eine hohe Konzentration in den Zellen des Verdauungstraktes kann z. B. für eine Aufnahme aus einer ascorbinsäurereichen Nahrung sprechen. Da in ascorbinsäurereicher Pflanzennahrung gleichzeitig Sauerstoffradikale vorhanden sind, ist eine Anreicherung von Ascorbinsäure in den Zellen des Verdauungstrakts zur Entschärfung dieser Radikale erforderlich (BARBEHENN et al. 2001). Außerdem erfasst diese Methode nur reduktive Substanzen und ist deshalb nicht sehr spezifisch für die Detektion der L-Ascorbinsäure.

Der Nachweis der Aktivität des Enzyms GLO, welches eine in der Synthese der Ascorbinsäure entscheidende Funktion einnimmt, wurde mit einer histochemischen Methode an verschiedenen Wirbeltieren durchgeführt (COHEN 1961, NAKAJIMA et al. 1969, IJIMA 1977). Wirbellose wurden bisher nicht mit dieser Methode untersucht. NAKAJIMA (1969) veränderte die Methode von COHEN (1961), weil bei dieser Methothione (ein K-Vitamin)

verwendet wurde. Dies ist eine Substanz, die die Tätigkeit der Gulonolacton-Oxidase (GLO) überdecken soll. Die Substanz Kaliumzyanid (KCN) wirkte bei der Ratte stimulierend auf die Aktivität der GLO (CHATTERJEE et al. 1957).

Die Methode des histochemischen GLO-Nachweises ist in der Lage, mit einer Färbereaktion das Enzym zu markieren. Damit können die Zellen, in denen eine Synthese der Ascorbinsäure stattfand angefärbt werden, und der Ort der Synthese kann lokalisiert werden. In der vorliegenden Arbeit konnte der Einsatz der beiden Substrate L-Gulonolacton und L-Galactonolacton bei *Metridium senile* und *A. digitatum* zeigen, welche Substanz die Vorstufe der Ascorbinsäure darstellt und die Ergebnisse aus dem *in vitro*-Test (3.3.2, Abb.3.4, 3.3.3, Abb. 3.6) bestätigen.

4.1.3 Ausschluss von endosymbiontischen Organismen

Da es in der Literatur keine Hinweise auf Endosymbionten bei *A. digitatum* gibt, wurde diese Weichkoralle für die hier vorliegenden Arbeit ausgewählt, um mit ihr die biochemischen *in vitro*-Untersuchungen statistisch abzusichern. Das Gewebe von *A. digitatum* wurde mit dem Elektronenmikroskop auf kugelige Strukturen, wie die von Bakterien oder einzelligen Algen mit doppelten Membranen untersucht, um diese potenziellen Endosymbionten darin feststellen zu können.

Eine andere Möglichkeit könnte die Untersuchung von Zellkulturen darstellen. Dieses wäre z. B. für Schwämme mit dem Einsatz von Antibiotika durchführbar. In der letzten Zeit ist es gelungen, die Zellen von einigen Porifera u.a. auch von dem in dieser Arbeit untersuchten *Chondrosia reniformis*, in Zellkultur zu bringen (NICKEL & BRÜMMER 2003). Mit der Untersuchungen der Ascorbinsäuresynthese dieser Zellkulturen wäre ein vollständiger Ausschluss anderer Organismen durchführbar.

4.1.4 Molekulare Untersuchungen und die phylogenetische Einordnung der Daten

Abschließend kann die Evolution der Ascorbinsäuresynthese der Metazoa nur durch den Vergleich der genetischen Information, der an dieser Synthese beteiligten Enzyme geklärt werden. Um an diese Erbinformation zu kommen, muss zuerst das entsprechende Enzym isoliert und seine Aminosäurefrequenz sequenziert werden. Das Enzym im Ascorbinsäuresyntheseweg, welches in der Vergangenheit für phylogenetische Betrachtungen herangezogen wurde, war die L-Gulonolacton-Oxidase (GLO) (OHTA & NISHIKIMI 1999). Es katalysiert den letzten Schritt vom L-Gulonolacton zur L-Ascorbinsäure. Die erste Entschlüsselung der GLO-Aminosäuresequenz und deren DNA-Sequenz gelang KOSHIZAKA et al. (1988) bei der Ratte *Rattus norvegicus*. Später wurden die GLO-Gene von weite-

ren Säugetieren wie der Maus *Mus musculus*, dem Schweins *Sus scrofa* und dem Rinds *Bos taurus* sequenziert. Mit dem Huhn *Gallus gallus*, wurde dieses Gen von einem Vogel entschlüsselt und auch von dem Katzenhai *Scyliorhinus torazame*, einem Selachier (Tab. 1.1). Alle diese Befunde stammen von Vertretern der Craniota, die in zahlreichen Untersuchungen eine Enzymaktivität der GLO zeigten. Überraschend war, dass von einer Vertreterin der Tunicata, der Seescheide *C. intestinalis*, eine cDNA-Sequenz gefunden wurde, die in weiten Teilen mit dem GLO-Gen des Katzenhais übereinstimmt. Diese Sequenz mit der Bezeichnung ci0100132519 wurde von dem DOE Joint Genome Institute im Zuge der kompletten Sequenzierung von *C. intestinalis* veröffentlicht.

Die cDNA ci0100132519 wurde herangezogen, um Primer zu entwickeln (2.4.1.4) um vergleichbare Sequenzstücke bei verschiedenen Vertretern der Chordata, der Bryozoa und der Echinodermata zu gewinnen (Tab. 2.5). Die Suche nach einer der cDNA-Sequenz ci0100132519 bzw. ihrer hypothetischen Aminosäuresequenz konnte zusätzlich mit einer BLAST-Suche in den Datenbanken bisher vollständig entschlüsselter Tiere durchgeführt werden. Zu diesen Tieren zählten der Nematode *Caenorhabditis elegans* und die Taufliege *D. melanogaster*. Besonders die Taufliege war sehr interessant, da sie in Fütterungsversuchen ohne Ascorbinsäure überleben konnte. Neben dem Projekt der Sequenzierung der DNA von *C. intestinalis* arbeitet das Broad Institute (Cambridge, USA) an der Sequenzierung von *Ciona savignyi*. Durch die nahe Verwandtschaft dieser beiden Schwesterarten könnte eine entsprechende Sequenz zu der cDNA ci0100132519 in der *Ciona savignyi*-Database gefunden werden.

Zusätzlich sollten die bisher veröffentlichten Daten zu den Sequenzen für die Gulonolacton-Oxidase (GLO) als Grundlage für eine Verwandtschaftsanalyse dienen. Die in der Tabelle 1.1 aufgeführten GLO-Gene wurden bis auf die Sequenz des Krallenfroschs für eine phylogenetische Analyse herangezogen. Zusätzlich wurden die Sequenzen von den beiden Seescheiden, *C. intestinalis* (ci 0100132519) und dem entsprechenden Stück von *C. savignyi* in die Analyse mit einbezogen. Die bekannten DNA-Sequenzen vom Meer-schweinchen und dem Menschen, die dem GLO-Gen der Ratte entsprechen, wurden bei dieser Berechnung nicht berücksichtigt. Bei beiden handelt es sich um funktionslose Gene, die durch eine Vielzahl von Mutationen stark verändert und deshalb nicht vergleichbar sind. Aus gleichem Grund wurden die Sequenzstücke des Rhesusaffen, des Orang-Utans und des Schimpansen, die OHTA & NISHIKIMI (1999, Abb. 1.3) für ihre phylogenetische Analyse benutzten, in diese Betrachtung nicht mit aufgenommen. Die vorliegende Bearbeitung bereits bekannter molekularer Daten ist die erste Betrachtung der Evolution der Gulonolacton-Oxidase der Chordata und damit einer größeren Gruppe der Tiere. Weitere

Daten werden von der Sequenzierung des Lanzettfischchens erwartet, die einen besseren Vergleich mit den Sequenzen von *C. intestinalis* und *C. savignyi* und dem GLO-Gen von *S. torazame* erbringen werden.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Ergebnisse der biochemischen Untersuchung der Ascorbinsäuresynthese

Die vorliegende Arbeit ist die erste Untersuchung der Ascorbinsäuresynthese ursprünglicher Metazoa, wie die der Cnidaria und der Porifera. Mit einer biochemischen Methode wurde die Synthese bei diesen Gruppen nachgewiesen. Dieses Ergebnis führt zu der Annahme, dass die Ascorbinsäuresynthese eine ursprüngliche Fähigkeit der mehrzelligen Tiere ist (Abb. 3.26). Die Craniota wurden bisher am intensivsten auf die Synthese der Ascorbinsäure untersucht (CHATTERJEE 1973, MOREAU & DABROWSKI 2003, Abb. 1.2). Mit dem Nachweis der Ascorbinsäuresynthese beim Neunauge konnte diese Fähigkeit bei einem basalen Vertreter dieser Gruppe nachgewiesen werden (MOREAU & DABROWSKI 1998, 1998a). Es war jedoch nicht geklärt, ob auch mit den Wirbeltieren nah verwandte Taxa Ascorbinsäure synthetisieren können. Die Acrania, die als Schwestergruppe der Wirbeltiere angesehen werden, sind bisher noch nicht auf diesen Punkt untersucht worden. Die vorliegende Arbeit ist der erste Nachweis der Ascorbinsäuresynthese beim Lanzettfischchen *B. lanceolatum*, das zu den Acrania gehört (Abb. 3.25). Um eine noch ursprünglichere Gruppe auf die Ascorbinsäuresynthese zu testen, wurde die Seescheide *C. intestinalis* untersucht. *C. intestinalis* gehört zur Gruppe der Tunicata, die zusammen mit ihrer Schwestergruppe, den Vertebrata, die Chordata bilden. Nicht allein wegen ihrer verwandtschaftlichen Stellung wurde *C. intestinalis* ausgewählt, sondern auch, weil von ihr eine entschlüsselte cDNA-Sequenz existiert, die dem Gen der Gulonolacton-Oxidase einiger Wirbeltiere ähnelt.

In der Vergangenheit wurde die Evolution der Ascorbinsäuresynthese sehr widersprüchlich diskutiert. Von einer neuen Entwicklung der Tetrapoden (CHATTERJEE 1973) bis zum Ursprung der Ascorbinsäuresynthese bei einem gemeinsamen Vorfahr von Pilzen und Tieren (NIKISHIMI et al. 1978) reichten die Annahmen. Mit dem Befund der Ascorbinsäuresynthese bei den Acrania konnte gezeigt werden, dass diese Eigenschaft ein ursprüngliches Merkmal der Vertebraten ist. Zusätzlich konnte mit der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass basale Vertreter der Metazoa in der Lage sind, Ascorbinsäure zu produzieren. Jedoch kann mit den vorliegenden Daten nicht geklärt werden, ob ein Zusammenhang zwischen der Synthese der Porifera, Cnidaria und der von den Vertebraten existiert. Weitere Untersuchungen müssen folgen, um die Frage abschließend zu klären, ob sich die

Ascorbinsäuresynthese dieser Gruppen auf denselben Ursprung zurückführen lässt. Die Ergebnisse aus den biochemischen *in vitro*-Untersuchungen werden im Folgenden für die einzelnen untersuchten Tiergruppen diskutiert. Dabei soll noch einmal die besondere Rolle hervorgehoben werden, die die Ascorbinsäure in der jeweiligen Gruppe einnimmt.

4.2.1.1 Porifera

Da die Porifera die ursprünglichste Organisationsform der Metazoa darstellen, kann mit der Untersuchung dieser Tiergruppe mehr über den Ursprung der Ascorbinsäuresynthese in Erfahrung gebracht werden. BAVESTRELLO et al. (1995) beschrieben, dass der Nierenschwamm *C. reniformis* in der Lage ist, Quarzkörnchen mit Hilfe von Ascorbinsäure zu lösen. Diese angelösten Körner wurden in die kollagenreiche, äußere Schicht (Cortex) des Schwammes eingebaut. BAVESTRELLO et al. (1995) nahmen an, dass die hohe Ascorbinsäurekonzentration im Cortex sich mit deren Notwendigkeit bei der Bildung des Kollagens begründen lässt (siehe 1.4.2). Zusätzlich wurde Ascorbinsäure verbraucht, weil sie eine Vorstufe der vom Schwamm produzierten Oxalsäure darstellt. Die Ascorbinsäuresynthesefähigkeit von *C. reniformis* wurde angenommen, da die Konzentration der Säure anstieg, nachdem der Schwamm mit Kunststoffstöcken mechanisch manipuliert worden war (BAVESTRELLO et al. 1995). Diese induzierte Konzentrationszunahme und die insgesamt hohe Ascorbinsäurekonzentration brachten auch LUCCHETTI et al. (1999) zu der Annahme, dass *C. reniformis* Ascorbinsäure produzieren kann.

Mit der vorliegenden Arbeit konnten die vorhergehenden Annahmen *in vitro* bestätigt werden. Die biochemische Untersuchung von *C. reniformis* zeigte einen kontinuierlichen Anstieg der Ascorbinsäurekonzentration nach der Zugabe von L-Gulonolacton (Abb. 3.11, blau). Das Substrat L-Galactonolacton führte zu keinem deutlichen Anstieg (Abb. 3.11, grün).

4.2.1.2 Cnidaria

Das Vorkommen von Ascorbinsäure in Vertretern der Cnidaria wurde schon in den 1930er Jahren nachgewiesen (v. EULER & v. EULER 1933, VAN EEKELEN 1933, GIROUD & RACOTORATSIMAMANGA 1935, Tabelle 4.2). Bemerkenswert ist, dass bei der Hydrozoe *Pelmatohydra oligactis* die Ascorbinsäure als chemischer Reiz für die Erkennung von Nahrung wirkt. Mit Ascorbinsäure getränkte Papierstücke wurden ab einer bestimmten Ascorbinsäurekonzentration von den Polypen zur Mundöffnung transportiert und geschluckt (BALKE & STEINER 1958).

Tab. 4.2: Gehalt der Ascorbinsäure von verschiedenen Vertretern der Cnidaria.

Autoren	Art	Körperteil	Methode	Ascorbinsäure-konzentration
V. EULER & V. EULER 1933	<i>Cyanea capillata</i>	Muskel	Tillmans	0,004mg/g
V. EULER & V. EULER 1933	<i>Sagartia viduata</i>	Total	Tillmans	0,12mg/g
VAN EEKELEN 1933	<i>Metridium senile</i>	Total	Tillmans & Harris	0,047 mg/g 0,110 mg/g Gesamt.
GIROUD & RAKOTO-RATSIMAMANGA 1935	<i>Anemona sulcata</i>	Innerer Teil	Tillmans	0,05mg/g
GIROUD & RAKOTO-RATSIMAMANGA 1935	<i>Méduse blanche</i>	Verdauungs-trakt	Tillmans	0,18mg/g

Die in dieser Arbeit *in vitro* gemessene Ascorbinsäuresynthese von *Aiptasia sp.*, *S. undatus*, *M. senile*, *A. digitatum* und *Thuiaria thuja* sind die ersten Untersuchungen auf diese Synthesefähigkeit bei den Cnidaria (3.3.1, 3.3.2, 3.3.3 und 3.3.4). Bei *A. digitatum* konnte ein signifikanter Anstieg der Konzentration der Ascorbinsäure mit L-Gulonolacton als Substrat beobachtet werden (3.3.3, Abb. 3.8). Die Konzentration der Ascorbinsäure stieg innerhalb von einer Stunde um 87,89 µg/g signifikant an. Die Vorstufe L-Galactonolacton bewirkte keinen Anstieg der Ascorbinsäurekonzentration (GLAUBITZ & BARTOLOMAEUS 2002, 3.3.3, 3.7).

Der Bedarf der Cnidaria an Ascorbinsäure besteht nicht zuletzt bei der Bildung von Kollagen (1.4.2). Aus diesem besteht die oft sehr voluminöse Mesogloea verschiedener Cnidaria. Zusätzlich werden die Nesselkapseln aus Kollagen aufgebaut (LEHNHOFF et al. 1957, ENGEL et al. 2001). Es besteht eine hohe Abhängigkeit der Cnidaria von der Ascorbinsäure. Die in der vorliegenden Arbeit gemessene Synthese dieser Substanz wird essenziell, sobald die Nahrung keine oder zu wenig Ascorbinsäure enthält.

4.2.1.3 Tunicata

Für die Tunicata liegen zwar einige Angaben zu ihrem Gehalt an Ascorbinsäure vor (GIROUD & RAKOTO-RATSIMAMANGA 1935, Tab. 4.3). Bisher gab es jedoch keine Untersuchungen zur Ascorbinsäuresynthesefähigkeit dieser Tiergruppe. Die in der vorliegenden Untersuchung gemessene Konzentration der Ascorbinsäure von ca. 132-149 µg/g bei *C. in-*

testinalis stimmt sehr gut mit den Daten von GIROUD & RAKOTO-RATSIMAMANGA (1935) z. B. bei *Phallusia mamillata* mit 130-150 µg/g (0,13-0,15 mg/g) überein. Es konnte jedoch keine Ascorbinsäuresynthese bei *C. intestinalis* gemessen werden, obwohl eine hohe Anfangskonzentration dieser Substanz vorlag. Weder L-Gulonolacton noch L-Galactonolacton wirkten bei *C. intestinalis* als Substrat (3.3.6, Abb. 3.11). Keine Syntheseleistung kann aber auch bedeuten, dass nicht die richtigen Bedingungen für den *in vitro*-Test gefunden wurden. Der Enzymtest wurde deshalb leicht in Bezug auf die Temperatur variiert, doch auch das führte zu keinem Anstieg der Ascorbinsäure. Eine andere Erklärung für dieses negative Ergebnis könnte eine Variation der Syntheseleistung sein. MOREAU & DABROWSKI (1998) beobachteten beim Neunauge eine erhöhte Ascorbinsäureproduktion in der reproduktiven Phase der Tiere. Deshalb sollten weitere Untersuchungen der Ascorbinsäuresynthese verschiedener Tunicata folgen und es sollten dabei unterschiedlichen Lebensphasen berücksichtigt werden.

Tab. 4.3: Gehalt der Ascorbinsäure von verschiedenen Vertretern der Tunicata.

Autoren	Art	Körperteil	Methode	Ascorbinsäurekonzentration
GIROUD & RAKOTO-RATSIMAMANGA 1935	<i>Microcosmus sulcatus</i> (violett)	Kiemen, Gonaden, Total. Hepatopancreas	Tillmans	0,06-0,30 mg/g 0,50 mg/g
GIROUD & RAKOTO-RATSIMAMANGA 1935	<i>Botryllus schlosseri</i>	Gonaden, Hepatopancreas, Exkretionsorgane	Tillmans	0,28 mg/g
GIROUD & RAKOTO-RATSIMAMANGA 1935	<i>Phallusia mamillata</i>	Gonaden, Hepatopancreas, Exkretionsorgane. Kiemen & Muskel	Tillmans	0,15 mg/g 0,13 mg/g

In der vorliegenden Arbeit wurde ein leichter Anstieg der Erythroascorbinsäure gemessen (3.4.3, Abb. 3.16). Doch die Zunahme dieser Substanz konnte auch bei *A. digitatum* oder *T. thuja* beobachtet werden (3.4.2, Abb. 3.15). Diese Zunahme der Erythroascorbinsäurekonzentration kann damit erklärt werden, dass die Anfangskonzentration der Ascorbinsäure zur Dehydroascorbinsäure (DHA) oxidiert wird und diese sich anschließend spontan zur Erythroascorbinsäure umwandeln kann (VANDUIJN et al. 2000, JUNG & WELLS 2003).

Aus der Literatur geht hervor, dass die Ascorbinsäure eine wichtige Funktion bei der Bildung der Tunica einnimmt. Diese konnte durch Zugabe von reduzierenden Substanzen

wie Ascorbinsäure oder Glutathion bei Larven von *Ascidia callosa* gesteigert werden (ROBINSON et al. 1986). Außerdem konnte bei *Botryllus schlosseri* durch Zusatz von Ascorbinsäure der zytotoxische Effekt von reaktiven oxigenen Metaboliten (ROM) herabgesetzt werden (BALLARIN et al. 1998). Es war ein überraschendes Ergebnis, dass *C. intestinalis* nicht in der Lage war, Ascorbinsäure zu produzieren. Dieses Ergebnis sollte mit *C. intestinalis*, aus anderen Populationen überprüft werden.

4.2.1.4 Acrania

Bisher wurden aus der Gruppe der Vertebrata nur Vertreter der Craniota auf die Fähigkeit zur Ascorbinsäuresynthese untersucht (MOREAU & DABROWSKI 2000, Abb. 1.2). Als die ursprünglichste Gruppe der Vertebraten nehmen jedoch die Acrania eine besondere phylogenetische Stellung für das Grundmuster der Wirbeltiere ein. Die vorliegende Arbeit konnte die Ascorbinsäuresynthese bei *B. lanceolatum* und damit zum ersten Mal bei den ursprünglichsten Vertretern der Wirbeltiere nachweisen (3.3.6, Abb. 3.13). Ein stetiger Anstieg der Ascorbinsäurekonzentration wurde mit dem Substrat L-Gulonolacton gemessen (3.3.6, Abb. 3.13), während L-Galactonolacton noch nicht überprüft werden konnte. Das Ergebnis einer Ascorbinsäureproduktion der Acrania bedeutet, dass die mögliche Entstehung dieser Synthese wieder einmal in der Zeitachse nach unten verschoben wurde. Die Annahme der Entwicklung der Ascorbinsäuresynthese bei den Tetrapoden (CHATTERJEE 1973, NANDI et al. 1996) konnten MOREAU & DABROWSKI (1998, 1998a) mit dem Fund der Synthese bei ursprünglicheren Vertebraten widerlegen. Ob sich die Eigenschaft der Ascorbinsäuresynthese der Tiere überhaupt ein zweites Mal entwickelt hat, oder es sich um eine ursprüngliche Fähigkeit der Metazoa handelt, können nur weitere Untersuchungen abschließend klären. Zumindest kann diese Fähigkeit als ein ursprünglich bei den Vertebraten vorkommendes Merkmal angesehen werden (Abb. 3.26) und sie wurde nicht erst innerhalb dieser Gruppe entwickelt.

4.2.2 Ergebnisse aus der Histochemie

Die Ascorbinsäuresynthese der Cnidaria *M. senile* und *A. digitatum* konnte auch durch einen histochemischen Test nachgewiesen werden. Dadurch wurden die Ergebnisse der biochemischen Untersuchung abgesichert. Auch in der Histochemie zeigte das L-Galactonolacton keine Wirkung und es konnte damit kein Enzym angefärbt werden. Dagegen führte die Inkubation mit L-Gulonolacton zu einer deutlichen Farbreaktion. Durch die Anfärbung dieses letzten Enzyms in der Ascorbinsäuresynthese (Abb. 1.1) wurde gezeigt, dass sich das Enzym in den Zellen des Gastroderms befindet (Abb. 3.19, 3.20, 3.21).

Die Eingrenzung der Ascorbinsäuresynthese auf ein bestimmtes Gewebe wie das Gastroderm der Cnidaria konnte auch bei den Wirbeltieren mit der Lokalisierung in der Niere, der Leber oder in beiden Organen gleichzeitig beschrieben werden (CHATTERJEE 1973, BIRNEY et al. 1979, 1980). Im Gegensatz dazu fanden WALLACE et al. (1985) bei *L. polyphemus* die Synthese der Ascorbinsäure in unterschiedlichen Organen³ des Pfeilschwanzes. Bei anderen Tieren wurde der Ort der Synthese nicht eingegrenzt, z. B. untersuchten RDINS et al. (1985) nur die Hepatopankreas von *H. americanus*.

Unabhängig voneinander hat in der Evolution der Vögel und der Säugetiere eine Verlagerung des Syntheseorts von den Nieren in die Leber stattgefunden. Ursprüngliche Craniota wiesen stets eine Enzymaktivität in den Nieren auf (FRACALOSSIE et al. 2001, NAM et al. 2002). Beispielsweise fanden MOREAU & DABROWSKI (1998) beim Neunauge *Petromyzon marinus*, einem basalen Vertreter der Craniota die GLO-Aktivität in den Nieren aber nicht in der Leber. Bei den Acrania sind die Nieren nicht als paarige Organe zentralisiert, sondern es liegt ein so genanntes Nephridialorgan vor. Um die Evolution des Syntheseortes näher eingrenzen zu können, wäre es sehr interessant zu wissen, an welcher Stelle das Enzym bei den Acrania, wie *B. lanceolatum* lokalisiert ist, oder ob sich die Ascorbinsäuresynthese wie bei *L. polyphemus* auf mehrere Organen verteilt.

4.2.3 Ausschluss der Endosymbionten

Wie bereits unter 4.1.3 beschrieben, konnten endosymbiontische Organismen als Fehlerquelle bei der Untersuchung der Ascorbinsäuresynthese wirbelloser Tiere auftreten. Um das Gewebe von *A. digitatum* auf mögliche Symbionten zu überprüfen, wurde es elektronenmikroskopisch untersucht. SMIRNOFF (2003) zeigte, dass die Enzymreaktion vom L-Gulonolacton zur L-Ascorbinsäure nur von Tieren ausgeführt werden kann (Abb. 4.1). Die vorliegende Arbeit konnte diese Reaktion bei *A. digitatum* und *M. senile* nachweisen. Jedoch konnte die neu gebildete Ascorbinsäure nicht mit absoluter Sicherheit als L- oder D-Form identifiziert werden. Damit wäre noch nicht ausgeschlossen, dass durch das Enzym endosymbiontischer Pilzen aus dem L-Gulonolacton die D-Isoascorbinsäure gebildet wurde (Abb. 4.1). Um die Reaktion von L-Gulonolacton auf Hefen zu überprüfen wurde diese Substanz zu der Bäckerhefe *S. cerevisiae* gegeben. Daraus resultierte weder ein Anstieg der Konzentration von D-Isoascorbinsäure noch von L-Ascorbinsäure (3.4.1), sondern einer der Ascorbinsäure ähnlichen Substanz. Die Ergebnisse der Untersuchungen von Endosymbionten oder deren Syntheseleistungen werden im Folgenden diskutiert.

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen konnten zeigen, dass keine Zooxanthellen oder andere endosymbiontische Organismen im Gewebe von *A. digitatum* vorkom-

³ Eine Produktion der Ascorbinsäure konnte in den Muskeln mit 0,12-0,65, im Verdauungstrakt mit 0,32-0,47, im zentralen Nervensystem mit 0,40-0,56, in der Hepatopankreas mit 0,13-0,25 und im Herzen mit 0,29-1,10 jeweils in ($\mu\text{mol/g/h}$) gefunden werden.

men. Es wurden keine typisch kugeligen Zellen bakteriellen Typs gefunden, noch ließen sich Zellen mit Doppelmembranen nachweisen, die auf Algen hinweisen würden. Da *A. digitatum* auch in Zonen mit wenig Lichteinfall in bis zu 100 m Tiefe vorkommen kann (CAMPBELL 1987), war die Anwesenheit von symbiotische Algen nicht zu erwarten.

Die aktuelle Literatur besagt, dass nur Pflanzen, Protozoa und Tiere in der Lage sind, L-Ascorbinsäure zu produzieren (ARRIGONI & DETUILLO 2002, SMIRNOFF 2003, Abb. 4.1). Die isofunktionellen Enzyme der Pflanzen, Protozoen und Tiere unterscheiden sich in der Verwertung des Substrats, das als Vorstufe für die L-Ascorbinsäure dient.

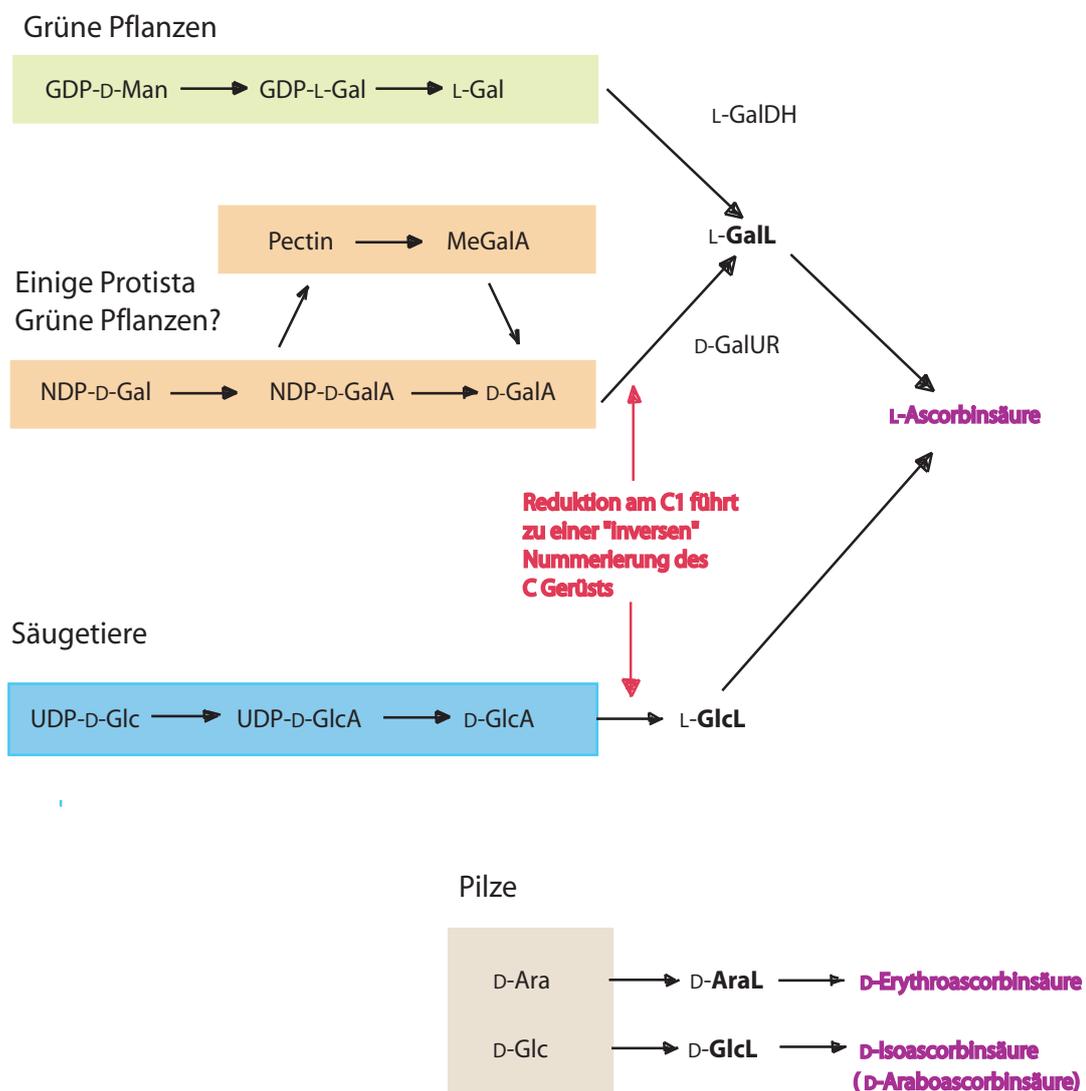


Abb. 4.1: Die Vielfalt der Biosynthesewege der Ascorbinsäure und ihr analoger Substanzen. Die verschiedenen Organismengruppen produzieren Ascorbinsäure über unterschiedliche Synthesewege. Durch die Oxidation der C2-Position von Aldonolacton (Aldosezucker mit einem Carboxylsäurerest in C1-Position in ihrer Aldonolactonform, in fettgedruckten Lettern) wird Ascorbinsäure synthetisiert (verändert nach SMIRNOFF 2003).

Da in der vorliegenden Untersuchung *A. digitatum* und *M. senile* nur L-Gulonolacton zur Ascorbinsäure umsetzten und mit L-Galactonolacton keine Reaktion auftrat, konnte eine Synthese durch Algen ausgeschlossen werden. Diese Zooxanthellen setzen wie alle Pflanzen ausschließlich L-Galactonolacton um (ÔBA et al. 1994, 1994a, OSTERGAARD et al. 1997). So wurde für verschiedene Mikroalgen die Produktion der L-Ascorbinsäure über L-Galactonolacton beschrieben (HELSPER et al. 1982, GRÜN & LOEWUS 1984, RUNNING et al. 2003). Auch für einige Protisten konnte ein Syntheseweg aufgezeigt werden, der über L-Galactonolacton zur L-Ascorbinsäure verläuft (SMIRNOFF 2003, Abb. 4.1). Andere besitzen keine Synthese (KIDDER 1953). Dadurch wurden auch Protisten als Fehlerquelle der biochemischen *in vitro*-Untersuchungen von *A. digitatum* und *M. senile* ausgeschlossen. Die Situation bei den Pilzen ist komplizierter. Frühere Untersuchungen der Ascorbinsäureproduktion der Pilze setzten Messmethoden ein, die nicht in der Lage waren, L-Ascorbinsäure von ähnlichen Substanzen zu unterscheiden (BOURNE & ALLEN 1935, HEIK et al. 1972). SMIRNOFF (2003) fasste zusammen, dass das Enzym Arabinolacton-Oxidase der Pilze das Substrat D-Arabinolacton zur D-Erythroascorbinsäure und das Substrat L-Gulonolacton zur D-Isoascorbinsäure umsetzt. In der vorliegenden Untersuchung konnte für die Bäckerhefe keine Produktion von D-Isoascorbinsäure nach der Zugabe von L-Gulonolacton, beobachtet werden. Stattdessen produzierte *S. cerevisiae* aus L-Gulonolacton eine Substanz, die mit der HPLC-Messmethode eine Rt von 5,2 min aufwies (siehe 3.4). Die D-Isoascorbinsäure und L-Ascorbinsäure zeigten eine Rt von 5,4 min. Es wurde deshalb angenommen, dass es sich bei dieser Substanz um D-Erythroascorbinsäure, einem C5-Äquivalent der L-Ascorbinsäure, handelt. Auch nach der Zugabe von L-Galactonolacton bildete sich D-Erythroascorbinsäure. In der Literatur wurden keine Angaben zur Synthese der Ascorbinsäure oder ähnlicher Substanzen von marinen Pilzen gefunden werden. Die Spezifität von *A. digitatum* und *M. senile* für das Substrat L-Gulonolacton schließt nicht alle Pilze als Störfaktoren aus, weil von OKAMURA (2001) diese Substratverwertung bei den terrestrischen Basidiomyceten *Grifola frondosa* und *Lentinula edodes* beschrieben wurde. Diese beiden Pilze seien jedoch eine Ausnahme zu sein, weil der selbe Autor bei einer Anzahl weiterer Pilze keine Produktion der L-Ascorbinsäure finden konnte, sondern nur die Synthese ascorbinsäureähnlicher Substanzen⁴ (OKAMURA 1998, 2001). Die in der Abbildung 4.1 beschriebene Umsetzung der Vorstufe D-Arabinolacton zur D-Erythroascorbinsäure und von L-Gulonolacton zur D-Isoascorbinsäure könnte dafür sprechen, dass es sich um zwei verschiedene Enzyme handelt. SPICKET et al. (2000) nehmen an, dass hier nicht zwei Enzymen aktiv sind, sondern nur ein Enzym, das eine geringe Substratspezifität aufweist.

⁴6-Desoxyascorbinsäure, D-Erythroascorbinsäure, die Glycoside der L-Ascorbinsäure 6-Desoxy-5-O-(alpha-D-xylopyranosyl)-Ascorbinsäure, 5-O-(alpha-D-xylopyranosyl)-Ascorbinsäure und 5-O-(alpha-D-glycopyranosyl)-Erythroascorbinsäure

Bei den meisten bisher untersuchten Bakterien wurde keine L-Ascorbinsäure und auch nicht deren Produktion gefunden (ARRIGONI & DETUILLO 2002). Auch hier gibt es jedoch eine Ausnahme: *Gluconobacter oxydans* ist der in der Lage, L-Gulonolacton zur L-Ascorbinsäure umzusetzen (SUGISAWA et al. 1995). Dieses Ergebnis wurde mit verschiedenen Methoden abgesichert, die in der Lage waren, die Struktur der L-Ascorbinsäure zu erfassen und damit von anderen Substanzen zu unterscheiden. Auf diese differenzierten Techniken konnten viele der früheren Untersuchungen noch nicht zurückgreifen. Ob es sich bei der von PIERRE (1962) beschriebenen Ascorbinsäureproduktion von den endosymbiotischen Bakterien der Schabe *Leucophaea maderae* wirklich um L-Ascorbinsäure handelt, müsste überprüft werden. Auf jeden Fall fanden SHAO et al. (1993) bei dem Tabakschwärmer *Manduca sexta* ein normales Wachstum, sobald D-Erythroascorbinsäure der Nahrung beigelegt wurde. Jedoch konnten sich mit dieser Substanz nur wenige Larven zur Puppe entwickeln. Sollte sich dieses Ergebnis auf Schaben als hemimetabole Insekten übertragen lassen, so könnten sie mit D-Erythroascorbinsäure aus bakterieller Produktion überleben. Nur holometabole Insekten bräuchten dann eine Quelle für L-Ascorbinsäure, um den vollen Entwicklungszyklus von der Larve über die Puppe zum Imago zu durchlaufen.

Bei dem in dieser Arbeit untersuchten Nierenschwamm konnte eine deutliche Zunahme der Ascorbinsäurekonzentration nach Zugabe von L-Gulonolacton beobachtet werden. Aber auch mit L-Galactonolacton war eine Reaktion zu sehen. Damit können endosymbiotische Algen nicht wie bei *A. digitatum* und *M. senile* ausgeschlossen werden. Jedoch konnte das Enzym Gulonolacton-Oxidase der Wirbeltiere ebenfalls L-Galactonolacton zur L-Ascorbinsäure umsetzen, allerdings mit nur 87 % der Reaktionsgeschwindigkeit V_{\max} im Verhältnis zum Umsatz von L-Gulonolacton. Der Substratumsatz von Wirbellosen wurde oft nicht weiter ausgetestet, z. B. wurde der Pfeilschwanz *L. polyphemus* nur auf das Substrat L-Gulonolacton überprüft (WALLACE et al. 1985).

Für *A. digitatum* und *M. senile* konnte ausgeschlossen werden, dass Symbionten als Quelle der Ascorbinsäure auftraten. Die Untersuchung des Nierenschwamm konnte die endosymbiotischen Organismen nicht vollständig ausschließen. Eine Untersuchung der von NICKEL & BRÜMMER (2003) entwickelten Zellkulturen ohne Symbionten könnten dieses Problem abschließend klären.

4.2.4 Molekulare Ergebnisse

Zur Betrachtung der Evolution der Ascorbinsäuresynthese wurden in der Vergangenheit verschiedene Parameter herangezogen, wie die Enzymaktivität der Gulonolacton-Oxi-

dase (CHATTERJEE 1973). Molekulare Daten wurden bisher nur von OHTA & NISHIKIMI (1999) für eine Analyse am Rhesusaffen, Orang-Utan, Schimpansen und dem Menschen durchgeführt (Abb. 1.3). Diese Arten gehören zu den Altweltaffen (Catarrhini), die genau wie ihre Schwestergruppe, die Neuweltaffen, keine Ascorbinsäure synthetisieren können (STONE 1972). Die von OHTA & NISHIKIMI (1999) für ihre Verwandtschaftsanalyse gewählte Sequenz entsprach dem Exon 10 des GLO-Gens der Ratte. Weil dieses Gen bei den Catarrhini keine Funktion mehr ausübt, wird es sich durch Mutationen schneller verändern als für Proteine kodierende Bereiche. Da der Zeitpunkt des Funktionsverlusts der GLO bei einem Vorfahren der Neu- und Altweltaffen nicht so weit zurückliegt (STONE 1972) und mit dem Exon 10 ein nur 164 Basen langer Abschnitt gewählt wurde, der nicht so viele Mutationen aufwies, war es möglich, damit eine Verwandtschaftsanalyse durch zu führen.

Die unter 4.1.4 beschriebene Sequenz ci0100132519 diente als Grundlage für die experimentellen Untersuchungen. Die darauf basierenden Primer wurden bei 19 Arten der Tunicata, Echinodermata, Bryozoa und einem Acrania angewendet. Mit diesen Primern konnte aus dem Erbgut von *C. intestinalis* (von der Insel Helgoland) zwei Abschnitte amplifiziert und sequenziert werden. Diese Sequenzstücke weisen eine Länge von 923 Basenpaare (bp) und 902 bp auf. Die Übereinstimmung zu ci0100132519 liegen bei 62,1% (Tab. 3.3, Abb. 7.2) und 48,9% (Tab. 3.3, Abb. 7.3). Das bedeutet eine Abweichung von ca. 38% bzw. 51% zwischen diesen Sequenzabschnitten von *C. intestinalis*, wobei die untersuchten Individuen zwar der gleichen Art angehörten, jedoch aus geographischen weit entfernten Populationen (Kalifornien und Helgoland) entstammten. Die Übereinstimmung der Sequenzen beider *C. intestinalis*-Proben ist in dem Bereich des Exon 8 mit 86,5 % deutlich höher, aber für zwei Individuen der selben Art immer noch gering.

Der große Unterschied zwischen Individuen einer Art könnte auch erklären, warum von den 18 weiteren untersuchten Deuterostomiern nur von der Tunicate *Clavelina lepardiformis* ein Abschnitt sequenziert werden konnte. Die Primer greifen nicht, wenn die Übereinstimmungen zu gering sind. Der von *C. lepardiformis* sequenzierte Abschnitt ist 360 bp lang und stimmt zu 45,6% mit ci0100132519 überein (Tab. 3.3, Abb. 7.4). Die mit diesen drei Abschnitten gewonnenen Daten reichten für eine Analyse nicht aus. Eine Veränderung der Primer könnte helfen, um weitere Sequenzen zu finden. Doch ist die Anwendung dieser Methode durch die hohe Variabilität dieses Gens erschwert.

Wie unter 4.2.1.3 beschrieben wurde bei der von der Insel Helgoland stammenden *C. intestinalis*-Probe mit dem biochemischen Test keine Ascorbinsäuresynthese gefunden (3.3.6, Abb.3.11). Durch den hohen Unterschied der *C. intestinalis*-Probe aus der helgo-

länder Populationen gegenüber der ci0100132519 könnte ausmachen, dass bei ersterer keine cDNA vorliegt. So konnten Mutationen des GLO-Gens bei Säugetieren die Funktion dieses Enzyms ausschalten. Bei der ods-Ratte (KAWAI et al. 1992) und einen od/od-Hausschwein (HASAN et al. 2004) wurde dieser Effekt beobachtet. Beides sind Säugetierarten, die ursprünglich in der Lage waren, Ascorbinsäure zu synthetisieren. Weitere Untersuchungen an *C. intestinalis* können zeigen, ob die vom JGI untersuchte Population eine GLO-Aktivität aufweist. Zusätzlich können weitere Sequenzen von Deuterostomieren Einblicke in die evolutive Entwicklung der GLO erbringen.

Die Sequenz ci0100132519 von *C. intestinalis* diente als Referenz für eine BLAST-Suche in der *Ciona savignyi*-Database des Broad Instituts. Es wurde eine Sequenz gefunden, die mit den Exon-Bereichen 2-10 von *C. intestinalis* korrespondiert. Ähnlich wie bei den experimentell gewonnenen Daten wurde hier eine Übereinstimmung der beiden Nukleotidsequenzen von 69,1% in den Exon-Bereichen gefunden. Im Gegensatz zu den experimentellen Daten handelt es sich zwar nicht um Individuen derselben Art, jedoch ist die Übereinstimmung für zwei Schwesterarten, die morphologisch nur schwer zu unterscheiden sind, relativ gering. Dagegen stimmte die Struktur des Gens mit der Anzahl der Exon-Bereiche und deren Länge gut überein (Abb. 3.24). Das Fehlen des ersten Exons in der Sequenz von *C. savignyi* könnte damit erklärt werden, dass im dafür in Frage kommenden Bereich etwa 100 Basen noch nicht sequenziert wurden. Ob diese Sequenz von *C. savignyi* für ein Gulonolacton-oxidierendes Enzym kodiert, können nur weitere Untersuchungen zeigen. Generell zeichnet sich jedoch ab, dass die untersuchte Sequenz bei *C. intestinalis*, *C. savignyi* und *C. leopardiformis* sehr variabel ist. Dadurch wird die Untersuchung der Ascorbinsäuresynthese bei den Tunicata erschwert.

Die oben beschriebene BLAST-Suche wurde in verschiedenen Gen-Datenbanken durchgeführt. Für wirbellose Tiere gab es jedoch kein Ergebnis. Dies galt auch für *C. elegans* und *D. melanogaster*, von denen die komplette Information des Erbguts vorliegt.

4.3 Stammbäume

Die Ergebnisse der biochemischen Untersuchungen dieser Arbeit zeigen, dass die Ascorbinsäuresynthese bei den Metazoa weiter verbreitet ist, als bisher angenommen wurde. In der Abbildung 3.25 wird verdeutlicht, dass die GLO-Aktivität der Wirbeltiere früher entstanden sein muss als bisher angenommen. MOREAU & DABROWSKI (1998, 1998a, 2000) nahmen an, dass diese Enzymaktivität bei einem Vorfahren der modernen Neunaugen und der Gnathostomata entstanden ist. Die Fähigkeit der Ascorbinsäuresynthese des Lanzettfischchens (3.3.6, Abb. 3.13) zeigt, dass die Synthese nicht nur eine ursprüngliche

Eigenschaft der Craniota ist, sondern auch schon bei den Acrania auftritt (Abb. 3.25). Den genauen Zeitpunkt der Entstehung der Ascorbinsäuresynthese der Metazoa können nur weitere Untersuchungen klären.

Aus der Abbildung 2.26 geht hervor, dass die Ascorbinsäuresynthese eine Eigenschaft der Porifera und der Cnidaria ist. Durch die Anwesenheit der Synthesefähigkeit bei diesen basalen Gruppen der Metazoa kann die Ascorbinsäuresynthese als ein ursprüngliches Merkmal der mehrzelligen Tiere angenommen werden. Ob der Ursprung der Synthese auf einen noch früheren Zeitpunkt gelegt werden kann, wie z. B. von NISHIKIMI et al. (1978) angenommen wurde, kann nur durch weitere Untersuchungen geklärt werden. Die Analyse der molekularen Daten zeigt, dass sich die evolutive Entwicklung der GLO mit Hilfe der Sequenzen nachzeichnen lässt (Abb. 3.27). Die bisher bekannten molekularen Daten sind jedoch noch sehr lückenhaft.

Durch den Nachweis der Ascorbinsäuresynthese bei den Acrania und bei ursprünglichen Gruppen der mehrzelligen Tiere wird die Ausgangshypothese unterstützt, dass sich die Synthesefähigkeit der Metazoa auf einen Ursprung zurückführen lässt. Die Abwesenheit der Synthese ließe sich dann auf den Verlust dieser Eigenschaft zurückführen, wie es mehrfach für die Wirbeltiere beschrieben wurde.