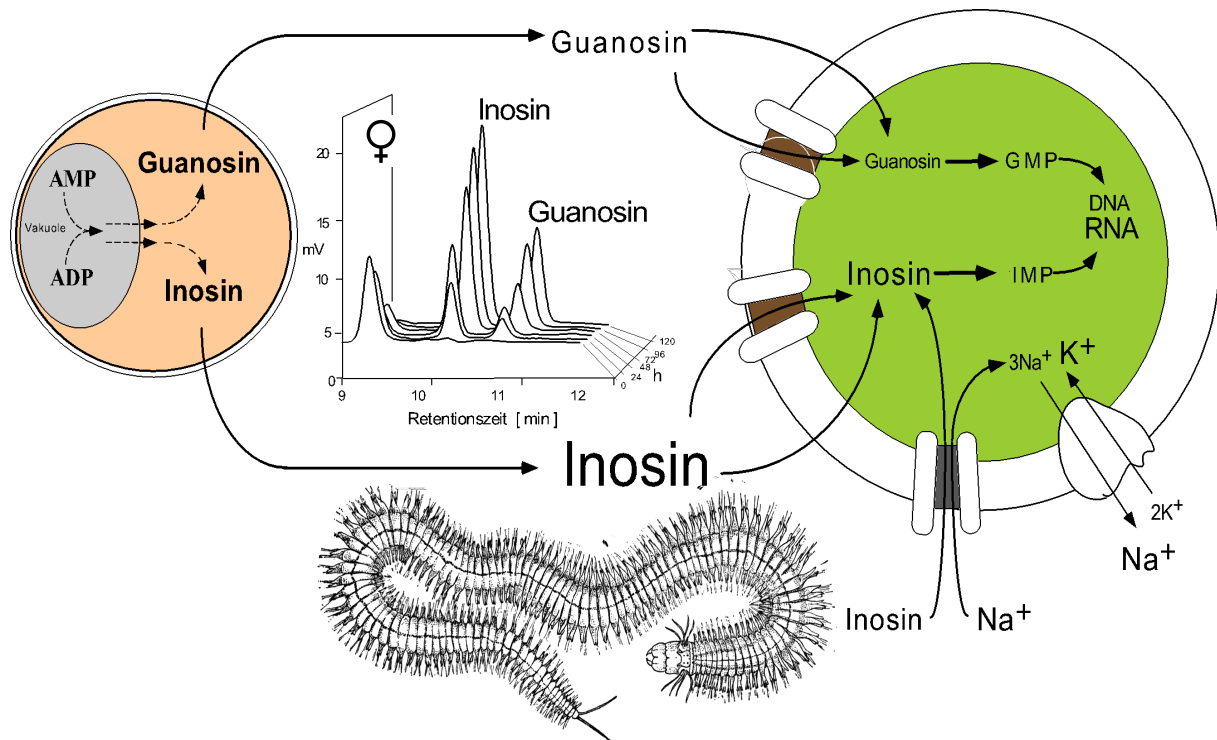


Die Bedeutung der Cölmzellen für den Nukleosid- und Nukleotidstoffwechsel der Keimzellen von *Nereis virens*
(Annelida, Polychaeta)



Dissertation zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“
im Fachbereich Biologie
der
Johannes-Gutenberg-Universität

vorgelegt von
Gunter Franz Geier
geboren in Wiesbaden

Mainz, 1997

Für meine Frau

1	MATERIAL UND METHODEN	8
1.1	LÖSUNGEN UND KULTURMEDIEN	9
1.1.1	CMFSW.....	9
1.1.2	Standardmedium (Cecil's Medium).....	9
1.1.3	Adaptiertes Medium für die Kultur von Keimzellen	9
1.1.4	Na ⁺ -Mangelmedium:	10
1.1.5	Herstellen des Inkubationsmediums.....	11
1.1.6	Sterilisieren und Aufbewahren der Kulturmedien.....	11
1.2	PRÄPARATION UND GEWINNUNG VON CÖLOMZELLEN	12
1.2.1	Herkunft und Hälterung der Versuchstiere.....	12
1.2.2	Bestimmung von Geschlecht und Reifungszustand	12
1.2.3	Betäubung der Tiere	12
1.2.4	Präparation der Tiere.....	12
1.2.5	Isolierung und Reinigung der Elaeozyten für die Zellkultur	13
1.2.6	Bestimmung des gepackten Elaeozyten-Zellvolumens.....	14
1.2.7	Bestimmung der Elaeozytenzahl.....	14
1.2.8	Isolierung von Oozyten für die Zellkultur.....	14
1.2.9	Bestimmung der Oozytenzahl.....	14
1.2.10	Isolierung männlicher Keimzellen für die Zellkultur.....	15
1.3	ZELLKULTUREN	17
1.3.1	Elaeozyten in Kultur.....	17
1.3.2	Einbringen der Elaeozyten in Kultur:.....	17
1.3.3	Entnahme von Medium aus den Elaeozytenkulturen.....	17
1.3.4	Extraktion der Nukleoside und der Nukleotide aus den Elaeozyten.....	18
1.3.5	Keimzellen in Kultur:	18
1.3.6	Inkubation der Keimzellen mit radioaktiv markierten Nukleosiden	18
1.3.7	Vorinkubation der Keimzellen.....	19
1.3.8	Vorbereitung der Kulturplatten für die Inkubation	19
1.3.9	Einbringen der Keimzellen in Kultur	19
1.3.10	Untersuchung des Nukleosid-Metabolismus in den Keimzellen	21
1.3.11	Inhibition der Nukleosidaufnahme durch Transportinhibitoren.....	22
1.3.12	Berechnung der aufgenommenen Nukleosidmenge	23
1.3.13	Berechnung der kinetischen Parameter <i>app. k_m</i> und <i>app. v_{max}</i> für die Aufnahme von Nukleosiden	23
1.3.14	Berechnung des <i>K_r</i> -Wertes	24
1.4	FRAKTIONIERUNG ¹⁴ C-INOSIN BZW. ¹⁴ C-GUANOSIN INKUBIERTER KEIMZELLEN	25
1.4.1	Extraktion der Nereis-Keimzellen.....	25
1.4.2	Metabolitüberstand (= säurelösliche Fraktion)	26
1.4.3	Entfetten des Pellets	26
1.4.4	Alkalische Hydrolyse der RNA.....	27
1.4.5	DNA-Hydrolyse	28
1.4.6	Aktivität in Protein:.....	28
1.5	HPLC (HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY)	29
1.5.1	Allgemeines zur HPLC-Methode	29
1.5.2	HPLC-Messung der säurelöslichen, der RNA- und der DNA-Fraktion von Keimzellen	30
1.5.3	Kalibrierung:.....	30
1.5.4	HPLC-Messung der säurelöslichen Fraktion.....	31
1.5.5	HPLC-Messung des RNA-Hydrolysats.....	32
1.5.6	HPLC-Messung des DNA-Hydrolysats.....	35
1.5.7	Messung der Radioaktivität aufgetrennter Substanzen.....	37
1.6	PHOTOMETRISCHE BESTIMMUNG DES ATP-GEHALTES IN KEIMZELLEN	38
1.7	PHOTOMETRISCHE BESTIMMUNG DES RNA- UND DNA-GEHALTES DER KEIMZELLEN	39
2	ERGEBNISSE.....	40
2.1	SEKRETION VON NUKLEOSIDEN DURCH ELAEOZYTEN VON <i>NEREIS VIRENS</i>	40

2.1.1	<i>Sekretion von Inosin und Guanosin durch Elaeozyten</i>	40
2.1.2	<i>Sekretion von Inosin bzw Guanosin durch Elaeozyten männlicher und weiblicher Tiere im Verlauf der Geschlechtsreifung</i>	41
2.1.3	<i>Zusammenfassung der Ergebnisse zur Sekretion von Nukleosiden durch Elaeozyten</i>	46
2.2	AUFNAHME VON NUKLEOSIDEN DURCH KEIMZELLEN VON <i>NEREIS VIRENS</i>	48
2.2.1	<i>Aufnahmekinetik für Inosin bzw. Guanosin bei mittelgroßen Oozyten</i>	48
2.2.2	<i>Aufnahme von Nukleosiden in Abhängigkeit von der Zeit durch Oozyten</i>	49
2.2.3	<i>Konzentrationsabhängige Aufnahme von Nukleosiden durch Oozyten</i>	51
2.2.4	<i>K_m-Werte für die Aufnahme von Inosin bzw. Guanosin durch Oozyten</i>	52
2.2.5	<i>Aufnahmeraten von Nukleosiden in Abhängigkeit vom Oozytendurchmesser</i>	57
2.2.6	<i>Aufnahmekinetik für Inosin bzw. Guanosin bei Spermatogonien II</i>	59
2.2.7	<i>Nukleosidaufnahme in Abhängigkeit von der Zeit durch männliche Keimzellen</i>	61
2.2.8	<i>Nukleosidaufnahme in Abhängigkeit von der Konzentration durch männliche Keimzellen</i>	63
2.2.9	<i>Aufnahmerate von Inosin bzw. Guanosin bei physiologischem Nukleosidangebot</i>	67
2.3	CHARAKTERISIERUNG DER NUKLEOSIDTRANSPORTSYSTEME BEI KEIMZELLEN VON <i>NEREIS VIRENS</i>	69
2.3.1	<i>Charakterisierung der Inosintransportsysteme mittelgroßer Oozyten</i>	69
2.3.2	<i>Charakterisierung der Guanosintransportsysteme mittelgroßer Oozyten</i>	77
2.3.3	<i>Charakterisierung des Inosin- bzw. Guanosintransports ausgewachsener Oozyten</i>	81
2.3.4	<i>Charakterisierung des Inosintransports männlicher Keimzellen</i>	82
2.3.5	<i>Charakterisierung des Guanosintransports männlicher Keimzellen</i>	89
2.3.6	<i>Charakterisierung des Inosin- bzw. Guanosintransports bei Spermien</i>	91
2.3.7	<i>Zusammenfassung der Ergebnisse (Nukleosidtransportsysteme)</i>	92
2.4	METABOLISMUS VON INOSIN UND GUANOSIN IN KEIMZELLEN VON <i>NEREIS VIRENS</i>	93
2.4.1	<i>Einbau radioaktiv markierter Nukleoside in DNA, RNA, Lipid und Protein der Oozyten</i>	93
2.4.2	<i>Anteil exogener Nukleoside am Nukleosidstoffwechsel der Oozyten</i>	95
2.4.3	<i>Stoffwechselbilanz exogener Nukleoside in heranwachsenden Oozyten</i>	101
2.4.4	<i>Einbau radioaktiv markierter Nukleoside in DNA, RNA und Lipid männlicher Keimzellen</i>	107
2.4.5	<i>Anteil exogener Nukleoside am Nukleosidstoffwechsel männlicher Keimzellen</i>	109
2.4.6	<i>Stoffwechselbilanz exogener Nukleoside in männlichen Keimzellen</i>	116
3	DISKUSSION	121
3.1	SEKRETION VON NUKLEOSIDEN DURCH ELAEOZYTEN VON <i>NEREIS VIRENS</i>	121
3.2	AUFNAHME VON NUKLEOSIDEN DURCH KEIMZELLEN VON <i>NEREIS VIRENS</i>	124
3.3	NUKLEOSIDTRANSPORTSYSTEME BEI KEIMZELLEN VON <i>NEREIS VIRENS</i>	132
3.3.1	<i>Aufnahme von Nukleosiden durch Keimzellen von Nereis virens</i>	134
3.3.2	<i>Aufnahme von Nukleosiden durch Oozyten nach ATP-Verarmung</i>	135
3.3.3	<i>Aufnahme von Nukleosiden durch männliche Keimzellen nach ATP-Verarmung</i>	137
3.3.4	<i>Zusammenfassung der Befunde zur ATP-Verarmung der Keimzellen</i>	138
3.3.5	<i>Nachweis der erleichterten Diffusion</i>	139
3.3.6	<i>Verfügen Nereis-Keimzellen über aktive Nukleosidtransportsysteme?</i>	140
3.3.7	<i>Können aufgenommene Nukleoside die Keimzellen wieder verlassen?</i>	141
3.3.8	<i>Zwei verschiedene Nukleoside, ein Transportsystem?</i>	142
3.3.9	<i>Aufnahme von Nukleosiden durch ausgewachsene Keimzellen von Nereis virens</i>	142
3.3.10	<i>K_m-Werte der Nukleosidaufnahme bei verschiedenen Zellen</i>	143
3.3.11	<i>Schlußfolgerungen (Nukleosidtransportsysteme)</i>	145
3.3.12	<i>Modell der Nukleosidaufnahme bei Keimzellen von Nereis virens</i>	147
3.4	PURIN-METABOLISMUS IN KEIMZELLEN VON <i>NEREIS VIRENS</i>	148
3.4.1	<i>Einbau exogener Nukleoside in Oozyten</i>	149
3.4.2	<i>Einbau exogener Nukleoside in männliche Keimzellen</i>	152
3.4.3	<i>Anteil aufgenommener Nukleoside am Nukleosidstoffwechsel der Keimzellen</i>	155
3.4.4	<i>Stoffwechselwege exogener Nukleoside in Keimzellen von Nereis virens</i>	157
4	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	168
5	ZUSAMMENFASSUNG DER DISSERTATION VON GUNTER GEIER	169
6	LITERATURVERZEICHNIS	171
	ERKLÄRUNG	184
	LISTE DER VERÖFFENTLICHUNGEN	185

The biologist wants to understand life, but life, as such, does not exist: nobody has ever seen it. What we call „life“ is a certain quality, the sum of certain reactions of systems of matter, as the smile is a quality or reaction of lips. (...) Similarly, we cannot separate life from matter and what we can only study is matter and its reactions. But if we study this matter and its reactions, we study life itself.

A. Szent-Györgyi
(1948)

*„Alle Organismen sind ständig, Tag und Nacht, mit dem Lösen von Problemen beschäftigt“
(Karl Popper).*

Ob das Lösen von Problemen oder besser gesagt das Lösen von Aufgaben auch bei niederen Tieren auf der Bewusstseinssebene geschieht ist bis heute Gegenstand kontroverser Diskussionen. Sicher ist dagegen, dass es durch Mutation und natürliche Auswahl im Laufe der Evolution zu einzigartigen Adaptationen gekommen ist, die den Organismen nicht nur das Überleben, sondern auch die Fortpflanzung sichern. Nicht so augenfällig, aber weit wichtiger als phänotypische Anpassungen einer Art an ihre Umwelt sind nach Ernst Mayr verschiedene physiologische Regulationsmechanismen, von denen uns im Folgenden die stoffwechselphysiologischen Regelmechanismen besonders beschäftigen sollen.

An dieser Stelle ist es angebracht Ernst Florey zu zitieren: „Organismen sind unfassbar komplexe Systeme aus sich gegenseitig beeinflussenden Katalysatoren - das Ziel ihrer Gesamtwirkung ist das Erreichen eines Fließgleichgewichts“. Jedwede Veränderung des Status quo wie auch dessen Erhaltung im Fließgleichgewicht ist ohne permanente Regulationsvorgänge undenkbar. So muß die Stoffwechselleistung, die zur Aufrechterhaltung des Lebenszustandes nötig ist, im präzisen regulierten Abgleich mit den Aufwendungen stehen, die für die Fortpflanzung benötigt werden.

Die Erforschung der verschiedenen Strategien mit denen Tiere das Problem der Fortpflanzung auf physiologischer Ebene lösen stellt somit ein ebenso spannendes wie komplexes Untersuchungsgebiet dar. Unsere Arbeitsgruppe hat sich zum Ziel gesetzt die physiologischen Aspekte der Fortpflanzung eines marinen Anneliden, speziell des Polychaeten *Nereis virens* genauer zu untersuchen.

Nereis virens lebt den Großteil seines Lebens eingegraben in einer U-förmigen Röhre im Wattboden des Meeres wo er sich im Jahresverlauf drastischen Schwankungen der Wassertemperatur ebenso ausgesetzt sieht wie zeitweisem Sauerstoffmangel. Trotz der teilweise sehr schwierigen Lebensbedingungen gelingt es den Tieren sich sehr effektiv fortzupflanzen. Nach einer, in der Regel, zweijährigen Phase somatischen Wachstums beginnen die Tiere beiderlei Geschlechts in ihrem dritten Lebensjahr mit der Ausbildung von Keimzellen in der Cöloflüssigkeit. Nach dem Erreichen der Geschlechtsreife wird eine große Zahl von Keimzellen durch Aufplatzen des bis dahin teilweise abgebauten Hautmuskelschlauches in das umgebende Meerwasser abgegeben.

Die Geschlechtsreifung sowie die Abgabe der Gameten in einer Population geschieht relativ synchron und wird durch eine Vielzahl von äußeren Faktoren, wie Wassertemperatur, Tageslänge und Mondphasen gesteuert. Bei dieser als Monotelie bezeichneten Art der Fortpflanzung dient die letzte Lebensphase ausschließlich dem Wachstum und der Ernährung der Keimzellen unter Investition eines Großteils der Körperressourcen und endet nach dem Abblanchen mit dem Tod der Tiere. Die Tiere haben also nur einmal in ihrem Leben die Chance

sich fortzupflanzen. Demnach muß, unter anderem, der Stofftransport vom Soma zu den Keimzellen einer sehr präzisen Regulation unterliegen. In unserer Arbeitsgruppe wird deshalb nach Metaboliten in der Cölomflüssigkeit der Tiere gesucht, die für die Entwicklung der Keimzellen nötig sein könnten. Die Keimzellen von *Nereis virens* sind nicht von einem Ovar- bzw Testisgewebe umgeben, sondern flottieren frei in der Cölomflüssigkeit. Die Keimzellen müssen also über die Cölomflüssigkeit ausreichend mit Nährstoffen versorgt werden, was besonders angesichts der großen Zahl an Gameten von herausragender quantitativer Bedeutung im Gesamtstoffwechsel ist. Die Analyse der Metabolite in der Cölomflüssigkeit liefert deshalb einen zuverlässigen Einblick in die Versorgungssituation der Keimzellen.

Neben den Keimzellen findet man in der Cölomflüssigkeit heranreifender Weibchen von *Nereis virens* auch die Elaeozyten, deren herausragende Aufgabe es ist, während der Geschlechtsreifung die Vorstufe eines Dotterproteins, das Vitellogenin, zu synthetisieren. Die Elaeozyten geben dieses Protein in die Cölomflüssigkeit ab (Heil, 1988); die Oozyten nehmen es auf (Fischer *et al*, 1991) und speichern es als Vitellin, einem Spaltprodukt des Vitellogenins, in die Dottergranula ein. Durch ihre Fähigkeit, Vitellogenin zu sezernieren, nehmen die Elaeozyten also eine Schlüsselrolle für die Entwicklung zumindest der weiblichen Keimzellen ein; in Kultur genommene Oozyten gehen ohne Bereitstellung von Dotterprotein im Medium rasch zugrunde (Heacox *et al*, 1983). Trotz dieser Schlüsselrolle der Vitellogenin-Zufuhr wird das Wachstum der Oozyten erkennbar nicht vom Angebot an Vitellogenin in der Cölomflüssigkeit gesteuert (Heil, unpubl.; Fischer & Hoeger 1992); der Vitellogeningehalt in der Cölomflüssigkeit ist nämlich bei allen Weibchen höher als zur Befriedigung der maximalen Aufnahmekapazität der Oozyten für Vitellogenin notwendig wäre (Fischer & Rabien 1991). Es stellte sich daher die Aufgabe weitere, von den Elaeozyten abgegebene Verbindungen zu suchen, die für die Entwicklung der Keimzellen und vielleicht sogar für die Steuerung des Keimzell-Wachstums von Bedeutung sein könnten.

Elaeozyten kommen übrigens auch bei männlichen Tieren vor und sind wahrscheinlich mit einer ähnlichen Funktion bei der Versorgung der männlichen Keimzellen betraut, doch war hierüber bislang weniger bekannt als bei den Weibchen. Die Elaeozyten flottieren, wie die Keimzellen, frei in der Cölomflüssigkeit und sind ebenso leicht zu isolieren und zu kultivieren. Sie stellen somit ein ideales Objekt zur Untersuchung der oben angeführten Fragestellungen in Zellkultur dar.

In unserem Labor wurde deshalb mittels HPLC in der Cölomflüssigkeit nach weiteren Nährstoffen gesucht, die für das Wachstum der Keimzellen von Bedeutung sein könnten. Im Zuge dessen konnten Kohlenhydrate (Märker, 1992), Aminosäuren (Mahlein, 1996) und D-Laktat (Hoeger und Kunz, 1993) nachgewiesen werden. Weitere Untersuchungen in unserem Labor durch U.Hoeger und A.Heinen hatten außerdem erste Hinweise darauf ergeben, daß die Elaeozyten Nukleoside in die Cölomflüssigkeit sezernieren. In größeren Mengen nachweisbar war vor allem das Nukleosid Inosin, gefolgt von Guanosin und in geringerer Menge deren entsprechenden Desoxynukleosiden.

In der vorliegenden Arbeit werden die Untersuchungen zur Nukleosidsekretion durch Elaeozyten, die ich bereits im Rahmen meiner Diplomarbeit durchgeführt habe (siehe Geier, 1992), wieder aufgegriffen. Schon damals hat sich gezeigt, daß die Elaeozyten Nukleoside in Kultur und wahrscheinlich auch in der Cölomflüssigkeit, geschlechts- und reifestadienspezifisch zu sezernieren vermögen. Interessant ist in diesem Zusammenhang, daß von vielen phagozytotisch aktiven Zellen, zu denen auch die Elaeozyten gehören, bekannt ist, daß sie verstärkt Nukleoside sezernieren (Berlin *et al*, 1975; Plagemann *et al*, 1988).

Nachdem diese Eigenschaft der Elaeozyten bekannt war hat sich die Frage gestellt, ob Keimzellen von *Nereis virens* diese Nukleoside aufnehmen. Um dies zu untersuchen habe ich *Nereis*-Keimzellen, beiderlei Geschlechts und verschiedener Reifungsstadien mit radioaktiv markierten Nukleosiden inkubiert. Ich habe mich dabei auf die Nukleoside Inosin und Guanosin beschränkt, da diese die höchsten Konzentrationen in der Cöloflüssigkeit aufweisen. Nach Bestimmung der Aufnahmekinetiken für Nukleoside habe ich mich der Charakterisierung der für die Aufnahme verantwortlichen Transportsysteme zugewandt. Hierzu inkubierte ich die Keimzellen mit spezifischen Transport- bzw. Stoffwechsellinhibitoren. Die Frage nach dem zugrundeliegenden Transportsystem war schon deshalb sehr interessant, weil es bei Invertebraten vergleichsweise wenig Untersuchungen über die Natur der Nukleosidtransportsysteme gibt.

Abschließend habe ich untersucht, welchen Anteil die exogenen Nukleoside Inosin und Guanosin an dem intrazellulären Purinpool der Keimzellen haben und wie die aufgenommenen Nukleoside metabolisiert werden. Zwar gibt es zahlreiche autoradiographische Untersuchungen über den Verbleib aufgenommener Nukleoside in Oozyten verschiedener Polychaetenarten, so z.B. bei *Pectinaria* (Tweedell, 1966), *Nereis grubei* (Gould und Schroeder, 1969) sowie bei *Nereis diversicolor* und *Nereis pelagica* (Dhainaut, 1984). Dabei handelt es sich aber vornehmlich um Inkubationen mit den radioaktiv markierten Pyrimidinen Uridin und Thymidin deren Stoffwechsel sich in den Oozyten von *Nereis virens* nach Rebscher (pers. Mitteilung) drastisch von demjenigen der Purine unterscheidet. Qualitative, biochemische Untersuchungen zur Aufnahme von Purinnukleosiden und vor allem zum Metabolismus physiologisch relevanter Nukleoside sind somit meines Wissens an Keimzellen von Polychaeten noch nie angestellt worden.

Die Befunde werden zeigen, daß die Keimzellen von *Nereis virens* Purinnukleoside auf denselben Stoffwechselwegen verwerten, wie man sie z.B. auch bei vielen Insekten- und Säugerzellen findet.

1 Material und Methoden

Some methods are trouble just waiting to happen.

John W. Dolan (1997)

Der Inhalt einer Wissenschaft wird nicht nur durch ihre Methoden oder ihre Probleme, sondern vielleicht in erster Linie durch ihre Geschichte bestimmt.

H.J. Jordan (1929)

VERWENDETE GERÄTE	
Zentrifugen :	Hettich Rotanta RP Sorvall RC-5B Superspeed (Du Pont Instruments) Biofuge A (Heraeus Sepatech)
Videosystem :	Super-VHS Videorekorder AG-6720 TL (Panasonic); SW-Videokamera WV- BL 600 (Panasonic) Digitales Bildverarbeitungssystem (Firma SIS)
Mikroskope :	Inversmikroskop IM 35 (Zeiss) Axioplan-Mikroskop (Zeiss)
HPLC :	Niederdruck Gradientensystem (GF 450) mit Detektor 430 in Verbindung mit einem Kontron Datensystem MT 450 Kontron-Sampler MSI 660
Radioaktivitäts- Zähler (Counter) :	Hewlett Packard 2200 CA (Liquid Szintillation Analyzer) Radioaktivitäts-Monitor (Berthold LB 507 A)
Photometer :	Kontron Uvikon 860
Sonstiges :	Mikro-Osmometer 3 MO (Advanced Instruments) Sterilflow 8581 (Köttermann) Brutschrank BKE 50 (Mettler) Fraktionssammler (LKB) Kühlaggregat (Lauda RM 6) Heizblock (Techne DB 2P) Potter (Micro-Bohrgerät Microline MTR 100) Schüttler (Bühler)

1.1 Lösungen und Kulturmedien

1.1.1 CMFSW

Für die Präparation der Tiere wurde ein Calcium-Magnesium freies Seewasser (nach Tyler, 1953) verwendet.

CMFSW		
NaCl	27,0	g/l
KCl	0,8	g/l
NaHCO ₃	1,0	g/l
Na ₂ SO ₄	0,18	g/l

Dazu wurden die nebenstehenden Salze in 1 Liter Aqua dest. unter Rühren gelöst. Der pH-Wert der Lösung wurde auf **pH 7,6** und die Osmolarität auf **920 mOsmol** eingestellt. Maximal 500 ml des CMFSW wurden in Glasflaschen abgefüllt und 15-20 min bei 120 °C autoklaviert.

1.1.2 Standardmedium (Cecil's Medium)

Grundlage für das Standardmedium und das adaptierte Medium war NBSS (Natural balanced salt solution). Zum Ansetzen von NBSS wurden folgende Salze in 1 l natürlichem Seewasser gelöst :

NBSS		
NaCl	8,65	g/l
CaCl ₂	0,23	g/l
KCl	0,46	g/l
NaHCO ₃	1,35	g/l

Nach dem Ansetzen wurde die Osmolarität gemessen und gegebenenfalls mit Aqua dest. auf **920 mOsm** eingestellt; der pH-Wert der Lösung sollte **7,6-7,8** betragen. Das NBSS wurde erst nach Zugabe der unten aufgeführten, Bestandteile sterilfiltriert :

Standardmedium :		
Galaktose	0,5	mg/l
Glukose	1,0	mg/l
Fucose (D)	0,25	mg/l
Fucose (L)	0,25	mg/l
MEM essential (50 x)	40	ml/l
MEM non-essential (100 x)	18	ml/l
MEM Vitaminlsg.(nach Eagle)	3,3	ml/l
Glutamin (stets frisch zugeben)	0,2	g/l
Polyvinylpyrolidon	1	g/l
Gentamycinsulfat	0,25	g/l
Penicillin	0,0625	g/l

Nachdem alle Komponenten in NBSS gelöst waren, wurde der pH-Wert des Standardmediums nochmals überprüft und gegebenenfalls mit 1 N NaOH auf den etwas höheren Wert von **pH 7.8 bis 8.2** eingestellt, da sich der pH-Wert beim anschließenden Sterilfiltrieren erniedrigte. Die Osmolarität des Mediums sollte im Bereich von **920 mOsmol** liegen.

1.1.3 Adaptiertes Medium für die Kultur von Keimzellen

Um die Aufnahme von Nukleosiden durch Keimzellen beiderlei Geschlechts von *Nereis virens* zu untersuchen wurden die Keimzellen in einem adaptierten Medium inkubiert. Aufgrund von Messungen der Zucker- bzw. Aminosäuregehalte in der Cöloflüssigkeit von *Nereis virens* beiderlei Geschlechts (Mahlein, 1997; Märker, 1992) konnten in unserem Labor verschiedene

Medien für die Kultur von Cölomzellen entwickelt werden (Geier, 1992). Im vorliegenden Fall wurde für die Kultur der Keimzellen ein Medium verwendet, das in seinem Zucker- und Aminosäuregehalten der Cölomflüssigkeit mittelreifer weiblicher Tiere entspricht. Grundlage für dieses adaptierte Medium war ebenfalls NBSS (siehe oben). Zu 1 Liter NBSS wurden anstelle der oben angegebenen Bestandteile des Standardmediums folgende Substanzen gegeben:

Aminosäure	g /l	Aminosäure	g /l	Zucker	g/l
Asn	0,0041	Leu	0,0078	Galactose	0,0011
Gln	0,011	Trp	0,0031	Maltose	0,09
Ser	0,0029	Phe	0,0028	Glukose	0,4
Thr	0,0068	Orn	0,0018	Mannose	0,0015
Gly	0,0051	Lys	0,0093	Rhamnose	0,003
Ala	0,02	His	0,0055		
Tau	0,0174	Tyr	0,0012		
Pro	0,0112			Vitamine und Antibiotika	
Val	0,0055			MEM Vitaminlsg.	3,3 ml/l
Met	0,0036			PVP	1 g/l
Ile	0,0036			Gentamycinsulfat	0,25 g/l
				Penicillin	0,0625 g/l

Nachdem alle Komponenten in NBSS gelöst waren, wurde der pH-Wert des adaptierten Mediums nochmals überprüft und gegebenenfalls mit einer geringen Menge 10 N NaOH auf den etwas höheren Wert von **pH 7.8 bis 8.2** eingestellt, da sich der pH-Wert beim anschließenden Sterilfiltrieren erniedrigte. Die Osmolarität des Mediums sollte im Bereich von **920 mOsmol** liegen.

1.1.4 Na⁺-Mangelmedium:

Grundlage für die Herstellung eines Na⁺-Mangelmediums war nicht NBSS sondern ein Na⁺-freies Seewasser das Cholinchlorid statt NaCl enthielt. Folgende Substanzen wurden nach einem Rezept von Preston (1987) in **Reinstwasser** angesetzt:

Na ⁺ -Mangelmedium	Konz.
Cholinchlorid	440 mM
KCL	9 mM
CaCl ₂	9,3 mM
MgCl ₂	23 mM
MgSO ₄	26 mM
KHCO ₃	2,2 mM
NaHCO ₃ (für Kontrolle)	2,2 mM

Der pH Wert wurde auf 7.8 und die Omolarität auf etwa 920 mOsmol eingestellt. Um den Eintrag von Natrium so gering wie möglich zu halten wurde das Mangelmedium nur in mit Reinstwasser gründlich vorgespülten Plastikgefäßen angesetzt und aufbewahrt. Dann wurden dem Medium, bis auf PVP, diesselben Substanzen wie zur Herstellung des adaptierten Mediums zugegeben (siehe oben).

Das fertige Medium wurde mittels Flammprobe auf Natrium überprüft. Der Kontrollansatz wurde auf dieselbe Weise angesetzt, enthielt aber NaHCO₃ statt KHCO₃.

1.1.5 Herstellen des Inkubationsmediums

Um die Aufnahme von Inosin bzw. Guanosin durch Keimzellen von *Nereis virens in vitro* zu untersuchen wurden auf der Basis des **adaptierten Mediums** zwei verschiedene **Stammmedien**, ein Medium ohne Inosin bzw.. ein Medium ohne Guanosin angesetzt:

Nukleosid	Medium ohne Inosin	Medium ohne Guanosin
Inosin	-	0,0029 g/l (10 µmol/l)
Guanosin	0,0013 g/l (5 µmol/l)	-
Desoxyinosin	0,0013 g/l (5 µmol/l)	0,0013 g/l (5 µmol/l)
Desoxyguanosin	0,00029 g/l (1 µmol/l)	0,00029 g/l (1 µmol/l)

Man sieht, dass das Inosin-Stammmedium immer auch 5 µM Guanosin und das Guanosin-Stammmedium immer auch 10 µM Inosin enthielt. Außerdem wurden allen Ansätzen die entsprechenden Desoxynukleotide zugegeben. Die Konzentrationsverhältnisse wurden dadurch näherungsweise an die Bedingungen *in vivo* angeglichen. Von den Stammmedien ohne Inosin bzw.. ohne Guanosin wurden jeweils 300 µl zum Ansetzen von 1 mmolärer Inosin- bzw. Guanosinstammlösungen verwendet. Durch Mischen der Stammmedien mit der 1 mmolären Inosin- bzw. Guanosin-Stammlösung wurden Inosin bzw.. Guanosin-Inkubationsmedien mit Verdünnungen von 1 - 1000 µM hergestellt. Pro Verdünnung wurden, zum späteren Befüllen einer Kulturplatte, je 2 x 10 ml Inkubationsmedium frisch (!) angesetzt. Die einen 10 ml des Mediums enthielten keine radioaktiv markierten Nukleoside und dienten zum Einbringen der Keimzellen in die Kulturen. Zu den anderen 10 ml wurden zusätzlich 0.1 - 0.2 µCi ¹⁴C-Inosin oder ¹⁴C-Guanosin zugegeben; mit diesem Ansatz wurde die eigentliche Inkubation gestartet (siehe **Kapitel 1.3.6**). Das 8-¹⁴C-Inosin wurde bezogen bei SIGMA (spez. Aktivität: 51 mCi/mmol) und das 8-¹⁴C-Guanosin stammte von ICN Biomedicals (spez. Aktivität: 58 mCi/mmol). Die verschiedenen Inosin- bzw. Guanosinverdünnungen auf der Grundlage des Na⁺-Mangelmediums wurden auf gleiche Weise angesetzt, allerdings konnte kein Na⁺-Mangelmedium mit Guanosin hergestellt werden, da das verwendete Guanosin (der Firma FLUKA), im Gegensatz zum Inosin desselben Herstellers, stark Na⁺-haltig war.

1.1.6 Sterilisieren und Aufbewahren der Kulturmedien

Um die fertigen Medien zu sterilisieren wurden sie mit Unterdruck durch einen 0,2 µm Cellulose-Nitratfilter (Sartorius) gefiltert. Der trockene Filter wurde vor Gebrauch, zusammen mit dem Filterapparat, 20' lang bei 120° autoklaviert. Da es durch das Sterilfiltrieren **immer** zu einer pH-Wert Erniedrigung im Medium kam, war es unbedingt notwendig den pH-Wert zu überprüfen und wenn notwendig mit HCL oder NaOH auf den für Elaeozyten physiologischen Wert von pH 7.6-7.8 einzustellen. Das sterile Medium wurde anschließend auf der, mit 70% Ethanol gründlich gereinigten, Sterilbank in sterilen 50 ml Glasflaschen zur Aufbewahrung abgefüllt. Tiefgefrorenes Kulturmedium bleibt laut Angaben in der Literatur (John , 1980) für etwa 6 Monate verwendbar.

1.2 Präparation und Gewinnung von Cölomzellen

1.2.1 Herkunft und Hälterung der Versuchstiere

Nereis virens, wurde in der Oosterschelde, bei Yerseke (Holland) von einem Wurmstecher gefangen. Der Transport der Tiere nach Mainz erfolgte unter Kühlung und in feuchter Torferde. Sofort nach der Ankunft in Mainz wurden die Tiere für 24 Stunden in ein Antibiotikabad (Streptomycin, Gentamycin jeweils 0,02 %) verbracht um eventuell vorhandene Infektionen abzuheilen. Die weitere Hälterung der Tiere erfolgte in mit künstlichem Seewasser (1040 mOsmol) befüllten Kunststoffbecken mit ausreichender Belüftung und bei Temperaturen zwischen 8 °C (Winter) und 12 °C (Sommer). Die Hälterungsbecken waren mit Glasröhren (0,5-1,5 cm Ø) ausgestattet, welche den Tieren als Ersatz für die Wohnröhren dienten.

1.2.2 Bestimmung von Geschlecht und Reifungszustand

Vor dem Betäuben der Tiere wurde das Geschlecht und der Reifungszustand bestimmt. Hierzu wurde den Tieren, mit Hilfe einer angespitzten Glaskanüle, etwas Cölomflüssigkeit entnommen; die Probe wurde unter dem Mikroskop begutachtet und der Durchmesser der Oozyten beziehungsweise der Reifzustand der männlichen Keimzellen notiert.

1.2.3 Betäubung der Tiere

Zur Betäubung diente anfänglich eine 10 % Stammlösung von Trichlorbutanol in Ethanol; da ein negativer Einfluss des TCB auf die Cölomzellen aber nicht auszuschließen war, wurden die Tiere stattdessen in einer mit Seewasser befüllten Plastikschaale für ca. 25 min bei -20 °C in der Kühltruhe gehalten. Innerhalb dieses Zeitraumes bilden sich erste Eiskristalle, das Seewasser friert aber noch nicht vollständig ein. Durch die Kälte waren die Tiere immobilisiert, dh sie zeigten auf Berührungsreize keine Reaktion mehr.

1.2.4 Präparation der Tiere

Alle für die Präparation verwendeten Gerätschaften, wie Bechergläser, Zentrifugenröhrchen und Präparierbestecke wurden nach Möglichkeit autoklaviert oder wenn dies nicht möglich war mit 70 % Ethanol gründlich gereinigt. Das betäubte und trocken getupfte Tier wurde in eine gekühlte Plastikschaale gelegt, in der sich etwas steriles CMFSW (nach Tyler, 1953) befand. Der Hautmuskelschlauch des Tieres wurde beidseitig, dorsolateral, das heißt knapp über den Parapodien, mit einer scharfen Knickschere von vorne nach hinten aufgeschnitten. Dabei war unbedingt darauf zu achten, dass der Darm des Tieres nicht verletzt wurde. Im Tier verbliebene Cölomzellen wurden mit CMFSW herausgespült; die gesammelte Zellsuspension wurde dann sofort in zwei vorgekühlte PC-Zentrifugenröhrchen gegeben.

1.2.5 Isolierung und Reinigung der Elaeozyten für die Zellkultur

Es sollte untersucht werden, ob Elaeozyten *in vitro* Nukleoside in das Kulturmedium abgeben können. Dazu war es nötig eine ausreichende Menge von Elaeozyten zu gewinnen, die möglichst frei von anderen Cölomzellen waren. Alle dazu nötigen Arbeitsschritte, mit Ausnahme der Zentrifugationen, wurden auf der Sterilbank durchgeführt. Sämtliche Gefäße wie Bechergläser und PC-Zentrifugenröhrchen waren steril und wurden kurz vor ihrer Verwendung auf Eis vorgekühlt. Der für die Reinigung verwendeten NBSS-Waschlösung wurden außerdem folgende Antibiotika zugegeben: 0,00006 g/ml Penicilin; 0,0001 g/ml Gentamycin; 0,000129 g/ml Streptomycin.

Isolierung von Elaeozyten weiblicher Tiere	
Vorreinigung :	gesammelte Zellsuspension zweimal je 3 min mit 2000 g (Sorvall) zentrifugieren; Überstand jeweils absaugen und Pellet mit 30 - 40 ml steriler (!) Waschlsg. resuspendieren
↓	
Hauptreinigung :	Suspension nacheinander auf ein 150, 80 und bei sehr kleinen Oozyten auch auf ein 30 µm Nylonnetz geben, um Oozyten abzufangen die Elaeozytensuspensionen in einem Becherglas sammeln.
↓	
Nachreinigung :	Elaeozytensuspension etwa 5 x bei 40 g zentrifugieren, um die Elaeozyten von allen Verunreinigungen zu befreien; Überstand jeweils absaugen.
Isolierung von Elaeozyten männlicher Tiere	
Vorreinigung :	gesammelte Zellsuspension zweimal je 3 min mit 2000 g zentrifugieren; Überstand jeweils absaugen und Pellet mit 30 - 40 ml steriler (!) Waschlsg. resuspendieren Zellsuspension reifer Männchen 2 x 3 min bei 4000 g zentrifugieren; Überstand verwerfen - Pellet (mit grünen Elaeozyten) resuspendieren.
↓	
Hauptreinigung :	Elaeozytensuspensionen auf einen 150 µm Filter geben und in einem Becherglas sammeln. Anschließend noch 2 x 5 min bei 100 g zentrifugieren: Überstand verwerfen und Elaeozytenpellet sammeln. Elaeozyten aus Spermien durch 3 x zentrifugieren 1 min bei 40 g von restlichen Spermien trennen: Spermienüberstand jeweils abnehmen und Elaeozytenpellet jeweils gut mit NBSS resuspendieren
↓	

Nachreinigung : Elaeozytensuspension etwa **5 x bei 40 g** zentrifugieren, um die Elaeozyten von allen Verunreinigungen zu befreien; Überstand jeweils absaugen. Mit dem Pellet verfahren wie nachfolgend angegeben.

1.2.6 Bestimmung des gepackten Elaeozyten-Zellvolumens

Das Gewicht des Elaeozytenpellets wurde bestimmt und dann im Verhältnis 1:3 mit sterilem Standardmedium vorsichtig resuspendiert. Aus dieser Suspension wurde ein Aliquot (50 - 75 μ l) entnommen und in zwei Hämatokritröhrchen überführt. Das markierte Ende der Röhrchen wurde mit Knetmasse verschlossen und die Röhrchen wurden dann für **3' bei 5000 g** in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Anhand einer Hämatokrit-Tabelle konnte das gepackte Zellvolumen direkt abgelesen werden.

1.2.7 Bestimmung der Elaeozytenzahl

Für das Auszählen der Elaeozyten in der Zählkammer war es von Vorteil die 1:5 verdünnte Suspension nochmals zu verdünnen (Endverdünnung 1:10). Die Ränder der Zählkammer wurden mit etwas Wasser befeuchtet, ein Deckglas wurde auf die Kammer aufgelegt und leicht angedrückt bis Newtonsche Ringe zu sehen waren. Ein Tropfen der möglichst homogenen 1:10 Zellsuspension wurde am Rand der Zählkammer aufgebracht, damit er sich zwischen Deckglas und Träger saugen konnte. Die **Neubauer-Zählkammer** ist in vier Zählfelder unterteilt, die wiederum aus sechzehn kleineren Feldern bestehen. Jedes der vier Zählfelder hat eine Kantenlänge von 1 mm * 1 mm und eine Tiefe von 0,1mm und somit ein Volumen von $0,1 * 1 * 1 = 0,1 \text{ mm}^3 = 0,1 \mu\text{l}$. Die Elaeozyten- und Sarkolytenzahl wurde in allen vier Zählfeldern bestimmt und die Ergebnisse gemittelt; so erhielt man die Zellzahl in 0,1 μ l Zellsuspension.

1.2.8 Isolierung von Oozyten für die Zellkultur

Es sollte untersucht werden, ob die Oozyten von *Nereis virens* im Kulturmedium angebotene Nukleoside aufzunehmen können dazu mussten ausreichende Mengen von Oozyten isoliert werden die weitgehend frei von anderen Cölomzellen waren. Bei der Gewinnung von Elaeozyten (siehe oben) kann man gleichzeitig auch die Oozyten gewinnen. Die Oozyten bleiben bei der Hauptreinigung der Elaeozyten in den verwendeten Nylonnetzen zurück und können dort unter Zugabe von etwas NBSS leicht ab pipettiert werden. Anschließend wurden die Oozyten in einer geringen Menge NBSS aufgenommen und gezählt.

1.2.9 Bestimmung der Oozytenzahl

Auch für die Oozyten wurde das gepackte Zellvolumen in allen Kulturansätzen bestimmten. Dies geschah auf dieselbe Weise wie bei den Elaeozyten (siehe **Kapitel 1.2.6**). Außerdem wurde die Zahl der Oozyten bestimmt, nachdem sie in Kultur eingebracht worden waren. Dazu wurden die Oozyten in den Kavitäten der Kulturplatte mit Hilfe eines Video-Makroskops gefilmt. Dies setzt voraus, dass die Oozyten den Boden der Kultur in einer

zusammenhängenden Zelllage bedecken. Durch vorsichtiges Einbringen der Oozyten in Kultur konnte dies in den meisten Fällen erreicht werden. Die Oozyten einer Kavität wurden anschließend am Bildschirm ausgezählt und ihre Anzahl wurde mittels eines Bildverarbeitungssystems zur ihrer Gesamtfläche in Beziehung gesetzt. In allen weiteren Kavitäten dieser Kultur war somit eine Bestimmung der Oozytenzahl über die Bestimmung der Oozytenflächen in guter Näherung möglich. Da diese Methode immer noch sehr zeitaufwendig war, wurde die Oozytenzahl, bei bekanntem gepackten Zellvolumen, auch über den Oozytendurchmesser berechnet. Die **Abb. 1** zeigt, dass die berechnete Oozytenzahl in recht guter Näherung mit der durch Auszählen ermittelten Zellzahl übereinstimmt. Man sieht, dass die durch Auszählen ermittelten Werte vor allem bei kleinen Oozyten stark von den errechneten Werten abweichen. Dies liegt daran, dass „kleine“ Oozyten (unter 100 μm Durchmesser) mit der verwendeten Bestimmungsmethode im Makroskop kaum noch voneinander zu unterscheiden und damit nur schwer zu zählen sind. Hinzu kommt, dass sehr kleine Oozyten oft in mehreren Lagen übereinander in der Kultur zu liegen kommen.

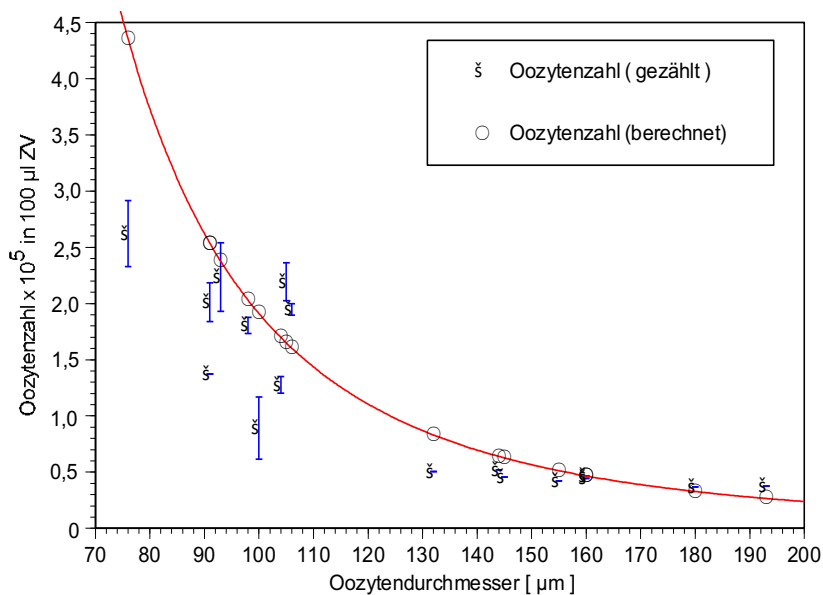


Abb. 1: Vergleich der errechneten Oozytenzahl (Berechnung über den Oozytendurchmesser) mit der durch Auszählung ermittelten Oozytenzahl (jeweils in 100 μl gepackten Zellen).

1.2.10 Isolierung männlicher Keimzellen für die Zellkultur

Auch männliche Keimzellen sollten hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Aufnahme von Nukleosiden untersucht werden. Das Verfahren zur Isolierung männlicher Keimzellen musste je nach Reifungsstadium variiert werden und geschah wie nachfolgend beschrieben. Sämtliche Gefäße wie Bechergläser und Zentrifugenröhrchen waren steril und wurden kurz vor ihrer Verwendung auf Eis vorgekühlt. Das Ficoll wurde in CMFSW angesetzt.

Reifungsstadium	Durchmesser [μm]	Isolierung und Reinigung männlicher Keimzellen
Spg I	10 - 15	Zellsuspension mit ca. 20 ml CMFSW verdünnen und auf 150 μm Nylonfilter geben; gefilterte Suspension in Spitzbodenzentrifugenröhrchen je 2 min bei 12, 10, 8, 7 und 5 g zentrifugieren: Überstand jeweils abnehmen und sammeln, Pellet jeweils resuspendieren. Gesammelten Überstand auf 15 μm Filter

		<p>geben, um restliche Elaeozyten abzufangen - gefilterte Suspension 1 x bei 380 - 670 g zentrifugieren: Überstand verwerfen, Pellet = schwach hellgrüne Spg I (die Ausbeute betrug maximal 15-30 µl gepacktes Zellvolumen)</p>
<p>Spg II (vom Sept-Okt.)</p>	<p>- 45</p>	<p>Zellsuspension mit ca. 70 ml CMFSW gut resuspendieren und auf 150 µm Nylonfilter geben - gefilterte Suspension auf eine Schichtung von je 1 ml 10, 15 und 20 % Ficoll in einem Spitzbodenzentrifugenröhrchen geben - anschließend 30-45 min bei 2000 g zentrifugieren: Überstand mit den grünen Elaeozyten abnehmen - die hellgelben Spg II sind durch das Ficoll gewandert und befinden sich im Ficoll oder am Boden des Röhrchens - Ficoll zusammen mit den Spg II abnehmen mit ca. 20 ml CMFSW versetzen und 2 x 3 min bei 670 g zentrifugieren, um das Ficoll zu entfernen.</p>
<p>Spg II und Spermato- gonienballen</p>	<p>45 - 95</p>	<p>Zellsuspension mit ca. 70 ml CMFSW gut resuspendieren und auf 150 µm Nylonfilter geben - gefilterte Suspension auf eine Schichtung von je 1ml 15 und 20 % Ficoll in einem Spitzbodenzentrifugenröhrchen geben - anschließend 5 min bei 670 g zentrifugieren: Überstand mit den grünen Elaeozyten abnehmen und erneut auf Ficoll geben, Zentrifugation wiederholen - die hellgelben Spg II sind durch das Ficoll gewandert und haben sich am Boden des Röhrchens abgesetzt - Ficoll zusammen mit den Spg II sammeln und mit ca. 20 ml CMFSW versetzen und 2 x 3 min bei 670 g zentrifugieren, um das Ficoll und restliche Elaeozyten zu entfernen: Überstand mit den Elaeozyten abpipettieren.</p>
<p>Spermatozyten (Spz) Tetraden</p>		<p>Zellsuspension direkt 5 - 10 min bei 2700 g zentrifugieren: Überstand verwerfen; Pellet aus Spz und Elaeozyten auf einen 150 µm Nylonfilter geben - gefilterte Suspension in Spitzbodenröhrchen überführen und 2 min bei 1500 g zentrifugieren: Überstand mit Spz vorsichtig abpipettieren ohne Elaeozyten mitzureißen; Eventuell Zentrifugation auf gleiche Weise mit dem resuspendierten Pellet wiederholen.</p>
<p>Spermien</p>		<p>Zellsuspension 5 min bei 2000 g zentrifugieren: Überstand verwerfen und Spermien suspension auf 150 µm Filter geben; gefilterte Suspension in Spitzbodenröhrchen überführen und 2 min bei 1500 g zentrifugieren: Überstand mit Spermien abpipettieren.</p>

1.3 Zellkulturen

1.3.1 Elaeozyten in Kultur

Es sollte untersucht werden, ob Elaeozyten von *Nereis virens* Nukleoside abgeben können; dazu wurde eine definierte Zahl von Elaeozyten in Kultur genommen. Alle Arbeiten wurden auf der Sterilbank und unter ständiger Kühlung der Zellen durchgeführt.

Benötigte Materialien :

- ⇒ Elaeozytensuspension (in Standardmedium !) mit bekanntem Zellvolumen und bekannter Zellzahl
- ⇒ Mit **Standardmedium** befüllte Kulturplatte mit 6 Kavitäten (steril !!)
- ⇒ Aluminiumblock auf Eis
- ⇒ Millipore HV-Filter (0.45 µm) und 1ml Einmalspritze
- ⇒ Tischzentrifuge (Biofuge)
- ⇒ Brutschrank (12 °C)
- ⇒ pH-Meßstreifen

1.3.2 Einbringen der Elaeozyten in Kultur:

Zum Ansetzen von **Elaeozyten-Kulturen** wurden Kultur-Platten mit je sechs Kavitäten verwendet. Die Kulturplatten standen auf einem eisgekühlten Alublock. Jede Kavität wurde mit 5 oder 8 ml Standardmedium beschickt und anschließend sofort verwendet. Je zwei Kavitäten (Doppelbestimmung !) der gekühlten 6er Kulturplatte wurden mit ca. 2×10^6 Elaeozyten eines Tieres beschickt. Zur Bestimmung des Nukleosid- bzw. Nukleotidgehaltes in den Elaeozyten wurden jeweils ca. 500 µl der restlichen Zellsuspension 3 min bei 2100 g zentrifugiert und das Pellet in N₂ eingefroren. Die mit Elaeozyten beschickten Kulturplatten wurden bei 12 °C im Brutschrank auf einen Schüttler gestellt. Während der ersten 15 min wurden die Kulturen **nicht** geschüttelt, um den Zellen ein Anheften am Boden der Kulturplatte zu ermöglichen, danach wurde der Schüttler auf 100 rpm eingestellt. Elaeozyten reifer Tiere durften während der gesamten Kulturdauer auf keinen Fall geschüttelt werden, da die Zellen sich sonst nicht anheften konnten und nach wenigen Stunden oder Tagen zugrunde gingen.

1.3.3 Entnahme von Medium aus den Elaeozytenkulturen

0 Stunde : Nach ca. 10-15 min im Brutschrank wurden je 200 µl Medium aus jeder Kavität entnommen und im Eppendorf Gefäß 1 min bei 200 g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Spritzennadel (1ml Einmalspritze) abgenommen **ohne** ein eventuell vorhandenes Elaeozyten-Pellet mitzureißen. Anschließend wurde dieser Überstand durch einen Millipore HV-Filter in ein anderes Eppendorf-Gefäß überführt und dann bei -20°C eingefroren.

24, 48, 72 Stunde : Es wurde analog zur 0 Stunde verfahren. Nach 24 h mussten die Kulturplatten unter dem Inversmikroskop auf Kontaminationen (Pilze, Bakterien) kontrolliert werden.

96 Stunde : Analog zur 0-72 Stunde, zusätzlich wurden pro Kavität je 100 µl Medium entnommen, um den pH-Wert (pH-Meßstreifen) zu testen.

Die jeweils entnommenen Medium-Proben wurden sofort bei -20 °C eingefroren. Nach dem Auftauen konnten die Proben direkt für die Messung des Nucleosidgehaltes mittels HPLC verwendet werden. Auf die Durchführung dieser HPLC-Messungen wird nicht weiter eingegangen, da sie bereits früher von mir beschrieben wurde (siehe Geier, 1992).

Der Zustand der Elaeozyten im Verlauf der Kultur wurde durch Bestimmung der Malat-Dehydrogenase Aktivität (MDH) im Medium überprüft (Geier, 1992). Die MDH-Aktivität im Medium kultivierter Zellen war ein guter Indikator für Zelltod und Zelllyse. Die Analyse des MDH-Gehaltes im Medium kultivierter Elaeozyten hatte gezeigt, dass nach 4 Tagen weniger als 5 % der Zellpopulation lysiert waren. Dies bedeutet, dass der Anteil der durch Zelllyse in das Medium gelangten Nucleoside vernachlässigbar gering war.

1.3.4 Extraktion der Nucleoside und der Nucleotide aus den Elaeozyten

Der Gehalt an Nucleosiden in den Elaeozyten wurde zum Anfang der Kultur bestimmt und nachher mit den im Kulturmedium gefundenen Nucleosidmengen verglichen, um Aussagen über die Sekretionsleistung der Elaeozyten machen zu können. Um die Elaeozyten vollständig aufzuschließen und die Enzyme zu inaktivieren, wurden 50 oder 100 µl der gepackten Zellen aus dem Stickstoff genommen und mit einem 5-fachen Volumen eisgekühlter 0.4 N PCA 3 x für je 5 sec. im Eisbad mit Ultraschall bei 150 W aufgeschlossen. Die Suspension wurde dann 3 min bei 14500 g zentrifugiert und der Unterstand vorsichtig abgezogen, ohne das gelbe Lipidkissen zu zerstören. Der so gewonnene Extrakt wurde in einem Zentrifugenröhrchen im Verhältnis 1:2 mit einem Chloroform/Trioctylamin-Gemisch (1 Teil 0.5 M Tri-n-Octylamin und 3.55 Teile Chloroform) versetzt, um das PCA wieder zu entfernen. Der Extrakt musste wenigstens dreimal stark aufgeschüttelt werden, um das PCA in die Chloroform-Phase zu überführen. Die Nucleoside und auch die Nucleotide verblieben dabei vollständig in der wässrigen Phase. Das Zentrifugenröhrchen wurde zur vollständigen Phasentrennung 2 min bei 400 g zentrifugiert. Die obere, wässrige, meist hellgelbe Phase konnte anschließend direkt abgenommen und für die Metabolitbestimmung verwendet werden. Der pH-Wert dieses Extraktes sollte im Bereich von pH 6 liegen.

1.3.5 Keimzellen in Kultur:

1.3.6 Inkubation der Keimzellen mit radioaktiv markierten Nucleosiden

Es sollte untersucht werden, ob Keimzellen von *Nereis virens* im Kulturmedium angebotene Nucleoside aufzunehmen können. Durch die Inkubation mit radioaktiv markierten Nucleosiden sollte außerdem der Metabolismus aufgenommener Nucleoside in den Keimzellen bestimmt werden.

Benötigte Materialien :

- ⇒ Gereinigte Keimzellsuspension
- ⇒ Inkubationsmedium (verschiedene Inosin- bzw. Guanosin-Verdünnungen) mit und ohne rad. markiertes Inosin bzw. Guanosin

- ⇒ Kulturflaschen (25 ml) NUNC
- ⇒ Waschlösungen: CMFSW (für männliche Keimzellen) oder NBSS (für Oozyten)
- ⇒ Kulturplatten mit 24-Kavitäten GREINER
- ⇒ Glasvial mit flachem Boden (silikonbeschichtet !)
- ⇒ Schüttler mit kühlbarem Alublock
- ⇒ Tritonlösung 1 %
- ⇒ Minivials (5 ml) ZINSSER
- ⇒ Szintillator ROTISZINT ECOPLUS

1.3.7 Vorinkubation der Keimzellen

Die gereinigte Keimzellen-Suspension wurden auf zwei bis drei Nunc-Kulturflaschen verteilt die jeweils 10-15 ml **adaptiertes Inkubationsmedium** mit 5 μM Guanosin und 10 μM Inosin enthielten. Radioaktiv markierte Nukleoside wurden dem Medium zu diesem Zeitpunkt noch **nicht** hinzugegeben. Die Zellen wurden in diesem Medium über Nacht vorinkubiert, um eine Äquilibration der Keimzellen zu erreichen; der Schüttler wurde auf 100 rpm eingestellt; die Temperatur im Brutschrank betrug 12 °C.

1.3.8 Vorbereitung der Kulturplatten für die Inkubation

Die 24 Kavitäten einer Kulturplatte wurden unter auf der Sterilbank mit je 1 ml adaptiertem Inkubationsmedium beschickt, das verschiedene Konzentrationen **nicht-radioaktiv** markiertes Inosin bzw. Guanosin enthielt. Die Keimzellen wurden mit verschiedenen Nukleosidkonzentration (Konzentrationen von 10 - 300 oder 200 - 1000 μM ; Inkubationsdauer meist 3 h) oder bei einer festen Nukleosidkonzentration (100 μM Inosin bzw. Guanosin) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit (2 - 8 h in Abständen von 2 h; 24 - 96 h in Abständen von 24 h) inkubiert.

1.3.9 Einbringen der Keimzellen in Kultur

Die über Nacht vorinkubierten Keimzellen wurden 2-3 x mit NBSS (bei Oozyten) oder CMFSW (bei männl. Keimzellen) gewaschen. Das Waschen erfolgte jeweils 3 min lang bei 380 g Zentrifugationsgeschwindigkeit. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet gewogen. Keimzellen die in Na^+ -Mangelmedium inkubiert werden sollten, mussten mehrmals in Na^+ -armen Medium gewaschen werden bis in der Flammprobe kein Natrium mehr zu erkennen war. Anschließend wurde das Pellet ca. 1:3 mit NBSS bzw. CMFSW resuspendiert. Zellsuspensionen männlicher Keimzellen konnten, nachdem der Hämatokrit bestimmt war, direkt in die Kavitäten pipettiert werden. Die Oozytensuspension wurde hingegen erst in ein mit Silikon beschichtetes Glasvial pipetiert. Aus diesem Vial konnte, unter beständigem, leichtem Schütteln, eine annähernd homogene Menge an Oozyten, zur Bestimmung des Hämatokrit und zum Beschicken der Kulturplatte entnommen werden. In jede Kavität wurden vorsichtig ca. 10-50 μl der Zellsuspension pipettiert; dies entsprach, abhängig von der Zellausbeute, einem gepackten Zellvolumen von 5-100 μl . Oozytenkulturen wurden zur

späteren Zellzählung mit Hilfe des Video-Makroskops aufgenommen. Mit dieser Methode konnten allerdings nur Oozyten von mehr als 120 μm gezählt werden.

Start der Inkubation:

Die radioaktive Inkubation wurde durch Zugabe von zusätzlich je 1 ml des entsprechend konzentrierten Inkubationsmediums gestartet, das außerdem **0,01 - 0,02 μCi /ml radioaktiv markiertes Inosin bzw. Guanosin** enthielt. Die Kulturen wurden auf einer Kühlplatte bei ca. 10 °C mit 100 rpm geschüttelt. Direkt nach dem Zugeben des markierten Mediums wurden aus jeder Kavität 200 μl Kulturmedium entnommen und zur Bestimmung der Anfangsaktivität in ein Szintillationsgefäß mit 3 ml Szintillator gegeben und im Zähler gemessen.

Stop der Inkubation:

Vor dem Beenden der Inkubation wurden zur Bestimmung der Restaktivität jeder Kavität jeweils wieder 200 μl Medium entnommen und in ein Vial mit 3 ml Szintillator gegeben und gemessen. Anschließend wurde jeder Kavität 1 ml möglichst zellfreies Medium entnommen und verworfen. Die restliche, zellhaltige Inkubationslösung wurde aus den Kavitäten entnommen und in Eppendorf-Gefäße überführt. Die Eppendorf-Gefäße wurden in einen vorgekühlten Alublock gestellt. Jede Kavität wurde mit 400 μl NBSS bzw. CMFSW gut ausgespült. Die NBSS oder CMFSW-Waschlösungen enthielten 1 mmol Inosin oder Guanosin. Die Spülflüssigkeit wurde mit der zellhaltigen Inkubationslösung vereinigt. Bei der Inkubation von Spermatozyten, Tetraden und Spermien setzten sich oft nicht alle Zellen auf dem Boden des Kulturgefäßes ab; in diesem Fall wurde ebenfalls je 1 ml Medium entnommen, aber nicht verworfen, sondern erst 3 min bei 1300 g zentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet mit den Zellen aus der Kavität vereinigt. Die Zellen wurden anschließend zentrifugiert. Hierbei haben sich je nach Reifestadium folgende Geschwindigkeiten als günstig erwiesen :

Spermatogenesestadium	g	Reifungsstadium	g
Spermatogonien	1300	Oozyten < 80 μm	2150
Spermatozyten(-ballen)	1300	Oozyten 80-120	1740
Tetraden (Spermatiden)	1300	Oozyten 130-200	780
Spermien	2150		

Vom Waschüberstand wurden anschließend stellvertretend aus **einem** Eppendorf-Gefäß der Versuchsreihe 200 μl entnommen und im Zähler auf anhaftende Restaktivität untersucht. Aus allen anderen Eppendorf-Gefäßen wurde der Überstand komplett abgenommen und verworfen. Das in den Eppendorf-Gefäßen verbliebene Zellpellet wurde mit je 1 ml NBSS oder CMFSW aufgenommen, gut resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde noch zweimal wiederholt. Erfahrungsgemäß war nach dreimaligem Waschen keine Aktivität in der Waschlösung mehr nachweisbar, andernfalls musste der Waschvorgang wiederholt werden. Zur Bestimmung der inkorporierten Radioaktivität wurde das Keimzellpellet jeweils mit 1 % TRITON versetzt und ca $\frac{1}{2}$ h bei Raumtemperatur lysiert. Das Zell-Lysat wurde dann direkt in die Minivials pipettiert, mit je 3ml Szintillator versetzt und ebenfalls im Zähler gemessen. Die leeren Eppendorf-Gefäße wurden nochmals mit 100-200 μl Aqua dest. gespült und die Spülflüssigkeit mit dem Zell-Lysat vereinigt.

1.3.10 Untersuchung des Nukleosid-Metabolismus in den Keimzellen

Um auch den Metabolismus **aufgenommener Nukleoside** in Keimzellen zu untersuchen wurde ein größeres Volumen (50 - 150 µl ZV) von Keimzellen in adaptiertem Medium inkubiert. Zu diesem Zweck wurden Kulturplatten mit sechs großen Kavitäten verwendet; jede Kavität wurde mit 5 ml adaptiertem Medium beschickt. Das Einbringen der Zellen geschah wie oben beschrieben. Um die Inkubation zu starten wurde ¹⁴C-markiertes Inosin bzw. Guanosin (0,1 - 0,2 µCi) direkt in die einzelnen Kavitäten der Kulturplatte pipettiert. Die Aufnahme wurde bei einer festen Nukleosidkonzentration (60 µM Inosin bzw. Guanosin) bei verschiedenen Inkubationszeiten (24 - 96 h in Abständen von 24 h) gemessen. Um die Inkubation abzustoppen wurden zuerst aus jeder Kavität 4 ml Medium entnommen, möglichst ohne dabei Keimzellen abzuziehen, und verworfen. Die Entnahme des restlichen Mediums mit den Zellen und das Waschen der Zellen geschah wie bereits oben beschrieben. Das gewaschene Zellpellet wurde **nicht** mit Triton lysiert, sondern sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Zur weiteren Behandlung der so inkubierten Keimzellen siehe **Kapitel 1.4**.

1.3.11 Inhibition der Nukleosidaufnahme durch Transportinhibitoren

Zur Charakterisierung der Nukleosidtransportsysteme wurden die Keimzellen in Nunc-Kulturflaschen mit adaptiertem Medium vorinkubiert, das verschiedene Transport- bzw. Stoffwechsellinhibitoren enthielt (siehe Tabelle). Die Inkubation mit Inhibitor wurde nach definierten Zeiten durch dreimaliges, gründliches Waschen mit NBSS oder CMFSW gestoppt. Danach wurde die Aufnahme von ^{14}C -Inosin bzw. Guanosin bei so behandelten Keimzellen mit unbehandelten Kontrollzellen verglichen. Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die verwendeten Inhibitoren und über Inkubationsdauer und Inhibitorkonzentrationen:

Inhibitor		Konzentration	Inkubationsdauer [min]
Sulphydrylreagenzien :	Jodacetat (JAC)	5 mM	45 -60
	Jodacetamid (JAA)	0,5 - 5 mM	30-120
	Perchloromercuribenzoat (PCMB)	1 - 5 mM	120-180
Nukleosidanalogue Substanzen:	Nitrobenzylthioinosin (NBTI)	1 -20 μM	120-180
	Dipyridamol (DIP) = Persantin	100 μM	120
Hemmstoffe der ATPasen:	Ouabain	3 mM	180
	Quercetin	3 mM	180
Stoffwechsellinhibitor :	KCN	5 mmol /l	45

Jodacetat (JAC), Jodacetamid (JAA) und p-Chloro-mercuribenzoat (PCMB) gehören zur Gruppe der Sulphydrylreagenzien; sie alkylieren SH-Gruppen von Proteinen und inaktivieren dadurch die Funktion von Enzymen oder auch von membranständigen Transportcarriern. JAC und JAA hemmen ein Schlüsselenzym der Glykolyse was die ATP-Entleerung der Zelle zur Folge hat (Rawn, 1989). Dies kann sinnvoll sein, wenn man z.B. wissen will, ob die Aufnahme von Substanzen energieabhängig ist. Die organische Quecksilberverbindung PCMB alkyliert im wesentlichen Sulphydrylgruppen von Membranproteinen und soll dadurch die erleichterte Diffusion von Nukleosiden hemmen (Plagemann et al, 1974; Plagemann et al, 1988). Cyanide wie zB KCN blockieren die Atmungskette der Zelle und können so zu einer ATP-Entleerung der Zellen führen. Nukleosidanalogue Substanzen wie zB das Nitrobenzylthioinosin (NBTI), das zu den S6-thiopurinen zu zählen ist, wirkt als irreversibler, spezifischer Inhibitor der erleichterten Diffusion (Berlin et al., 1975; Williams et al, 1991). Dipyridamol, dass auch unter dem Namen Persantin kursiert, bindet ebenfalls an bestimmte, bisher nicht näher bekannte Strukturen auf der Membran von Zellen und kann dadurch ebenfalls die Nukleosidaufnahme durch erleichterte Diffusion unterbinden. Allerdings ist der Wirkungsgrad von DIP sehr stark spezies- und zelltypabhängig (Plagemann et al., 1988; Hammond, 1992). Eine an Na^+ -gekoppelte, aktive Aufnahme von Nukleosiden kann durch Zugabe von Ouabain gehemmt werden. Ouabain hemmt die Na^+/K^+ -ATPase und führt dadurch zu einem Zusammenbruch des Na^+ -Konzentrationsgradienten über der Zellmembran. Den gleichen Effekt kann man auch im Na^+ -armen Medium erreichen. Quercetin hemmt dagegen gezielt eine entsprechende Ca^+/K^+ -ATPase und damit möglicherweise vorhandene aktive, Ca^+ -abhängige Nukleosidtransportsysteme. Neben diesen Inhibitoren wird in der Literatur noch eine fast unüberschaubare Vielzahl von Hemmstoffen der Nukleosidaufnahme beschrieben. Deshalb soll an dieser Stelle nur auf weiterführende Literatur verwiesen werden. Ausführlich Auskunft

über die verschiedenen, mehr oder weniger spezifischen, Inhibitoren geben u.a. Plagemann and Richey (1974), Plagemann et al. (1988), und Berlin et al. (1975). Viele dieser Inhibitoren sind im Zusammenhang mit der Bekämpfung von Krebs oder viralen Erkrankungen wie zB auch AIDS neuerdings wieder interessant geworden. So ist man in diesen Fällen oft nicht nur daran interessiert die *de novo* Synthese von Nukleotiden zB mit Hilfe von AZT (Azidothymidin), sondern auch die Verwertung exogener Nukleoside auf dem sogenannten Salvage-Weg restlos zu unterdrücken (Viswanaadhan et al, 1990).

1.3.12 Berechnung der aufgenommenen Nukleosidmenge

Anhand der von den Keimzellen inkorporierten Radioaktivität war es, bei bekannter spezifischer Aktivität (dpm/nmol) des im Medium angebotenen Inosins bzw. Guanosins, möglich die Konzentration der aufgenommenen Purinnukleoside zu berechnen:

$$\frac{(A_1 \text{ [dpm]} - \text{BG[dpm]})}{10 \times (A_0 \text{ [dpm]} - \text{BG [dpm]})} \times \text{nmol} / 2\text{ml KF} = \text{Nukleosid nmol} / \mu\text{l ZV}$$

A_1 : Aktivität in den Zellen [dpm]

A_0 : Anfangsaktivität im Medium [dpm]

BG : Background [dpm]

ZV : gepacktes Zellvolumen in μl

nmol / 2ml KF : eingesetzte Nukleosidkonzentration in 2 ml Kulturflüssigkeit

1.3.13 Berechnung der kinetischen Parameter $\text{app. } k_m$ und $\text{app. } V_{\max}$ für die Aufnahme von Nukleosiden

Wenn man die Aufnahme von Nukleosiden durch Keimzellen von *Nereis virens* gegen die Angebotskonzentration aufträgt erhält man in den meisten Fällen eine hyperbole Kurve (siehe **Kapitel 2.2.1 und 2.2.6**). Ein solcher Kurvenverlauf deutet immer auf eine carriervermittelte Aufnahme hin. Die Bindung eines Liganden, in diesem Fall eines Nukleosids, an einen Transportcarrier und seine Ablösung gleicht den Vorgängen die zur Bindung und zur Ablösung eines Substrats von einem Enzym führen und kann deshalb ebenfalls durch die Michaelis-Menten-Gleichung charakterisiert werden (Berlin und Oliver, 1975). Die apparenten Parameter K_m und V_{\max} einer Michaelis-Menten-Kinetik wurden auf verschiedene Art und Weise berechnet: Entweder durch nicht-lineare Anpassung der Michaelis-Menten-Gleichung nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate oder durch Umformung der Michaelis-Menten-Gleichung in eine Geradengleichung (zB nach Lineweaver-Burk oder nach Hanes). In der vorliegenden Arbeit wurden oft das nicht-lineare und das lineare Verfahren auf die Meßwerte angewendet. Die Linearisierungsverfahren haben den Vorteil, dass man K_m und V_{\max} direkt aus den Graphiken ablesen kann. Außerdem lassen sich Abweichungen der Meßwerte von der Michaelis-Menten-Gleichung besser erkennen. Die bekannteste Form der linearisierten Michaelis-Menten-Kinetik ist die doppelt reziproke Darstellung der Werte im Lineweaver-Burk-Diagramm. Das Lineweaver-Burk-Diagramm hat, laut Biswanger (1994), den Nachteil, dass die Meßpunkte über den Konzentrationsbereich ungleich verteilt werden; nach einer linearen Regression werden deshalb die Meßwerte und damit K_m und V_{\max} falsch

gewichtet. Eine Ungleichverteilung der Daten kann dagegen im Hanes-Diagramm, bei dem $[S] / v$ gegen $[S]$ aufgetragen werden, weitgehend umgangen werden (Bisswanger, 1994). Ausführliche Informationen zu dieser Thematik geben Bisswanger (1994); Wong (1977) und Fersht (1977).

1.3.14 Berechnung des K_i -Wertes

Die konzentrationsabhängige Aufnahme von ^{14}C -Inosin durch Oozyten wurde in Gegenwart von nichtmarkiertem Guanosin kompetitiv gehemmt (siehe dazu **Kapitel 2.3.1**). Für die Bindung des Guanosins an den Nukleosidtransporter kann man eine Dissoziationskonstante K berechnen. Diese Konstante gibt Auskunft darüber, wie schwach oder stark das Guanosin von dem Transporter gebunden wird. Da die Aufnahme von Inosin durch Guanosin kompetitiv gehemmt wurde kann man die Dissoziationskonstante des Guanosins auch als kompetitive Hemmkonstante K_i bezeichnen (Bisswanger, 1994). Man kann den K_i -Wert z.B. mit Hilfe der Hanes-Gleichung wie folgt berechnen:

Hanes-Gleichung:

$$\frac{S}{V_o} = \frac{S}{V_{max}} + \frac{K_m}{V_{max}}$$

Gleichung (1.)

Wobei: S = Substratkonzentration
 V_{max} = maximale Aufnahmegeschwindigkeit
 K_m = Substratkonzentration bei der die halbmaximale Aufnahmegeschwindigkeit der ungehemmten Aufnahme erreicht ist.

Eine typische, kompetitive Hemmung beeinflusst nur die apparente Michaeliskonstante, deshalb ändern sich nur die Parameter der Gleichung (1.) in denen der K_m -Wert enthalten ist (Bisswanger, 1994). Außerdem muss die Inhibitorkonzentration I und die Dissoziationskonstante des Inhibitors K_i in die Formel einfließen:

$$\frac{S}{V_o} = \frac{S}{V_{max}} + \frac{K_m (1 + \frac{[I]}{K_i})}{V_{max}}$$

Gleichung (2.)

Wobei: I = Inhibitorkonzentration; K_i = Dissoziationskonstante des Inhibitors

Der Schnittpunkt der Gerade (der inhibierten Aufnahme) mit der Abszisse wird wie folgt definiert:

$$K_{mi} = K_m (1 + [I] / K_i) \quad \text{Gleichung (3.)}$$

wobei $S = K_{mi} = K_m$ -Wert der inhibierten Aufnahme

daraus erhält man durch umstellen den K_i -Wert: $K_i = K_m (1 + I / K_{mi})$ oder

$$K_i = [I] / (K_{mi} / K_m - 1) \quad \text{Gleichung (4.)}$$

1.4 Fraktionierung ^{14}C -Inosin bzw. ^{14}C -Guanosin inkubierter Keimzellen

Da zu vermuten war, dass aufgenommene Nukleoside von den Keimzellen für die RNA- und DNA-Synthese verwendet werden, wurden die Zellen in die RNA, und DNA aber auch in die säurelösliche, die Lipid- und die Proteinfraction aufgetrennt. Der Trennungsgang orientiert sich an einem Verfahren von Schmidt & Thannhauser (1945); das Verfahren wurde für die Keimzellen von *Nereis virens* entsprechend modifiziert werden. Alle Trennungsschritte wurden mit Ausnahme der DNA-Hydrolyse auf Eis durchgeführt.

Benötigte Lösungen und Materialien:

- ⇒ **Extraktionslösung :**
 - 0.4 N PCA in 70 % Methanol (bei männlichen Keimzellen **ohne** Methanol)
 - 10 mM EDTA
 - 5 mM EGTA
 - 20 mM β -Glycerolphosphat (unter Rühren, portionsweise zugeben !!)
- ⇒ **Neutralisationspuffer:** 0.75 M K_2CO_3 + 2 mM Hepes
- ⇒ Ethanol (abs.)
- ⇒ Ethanol-Ether (1:3)
- ⇒ Methylguanosen (1 mM Vorratslg.)
- ⇒ 0.3 M KOH
- ⇒ 0.4 N PCA
- ⇒ Isopropanol
- ⇒ Szintillator (Rotiszint Ecoplus)
- ⇒ Potter für 1,5 ml Eppendorf-Gefäße (Bosch)
- ⇒ 1,5 ml oder 2 ml Eppendorf-Gefäße mit Schraubverschluß
- ⇒ Vortex
- ⇒ Heizblock
- ⇒ Plastikspatel

1.4.1 Extraktion der *Nereis*-Keimzellen

Die nach Inkubation mit ^{14}C -Inosin bzw. Guanosen in N_2 eingefrorenen Keimzellen wurden sofort nach ihrer Entnahme aus dem Stickstoff auf Eis gestellt; das gepackte Zellvolumen wurde 1:7 mit eiskalter Extraktionslösung (siehe oben) versetzt und **sofort** mit einem Plastikspatel durchmischt, damit alle Keimzellen mit der Extraktionslösung in Berührung kommen konnten. Zu jeder Probe wurden sodann 100 nM Methylguanosen als interner Standard zugegeben, um später die Wiederfundrate in der säurelöslichen Fraction bestimmen zu können. Die Wiederfundraten für Methylguanosen lagen i.d.R. bei 80 % oder darüber. Die Probe wurde in Eis stehend mit einem Potter bei 13500 rpm für insgesamt 3-5 min homogenisiert (Tetraden und Spermien wurden insgesamt für 10 min gepottert); alle 30 sec. wurde für etwa 10 sec. eine Pause eingelegt, um eine zu starke Erwärmung zu verhindern. Die Keimzellen wurden gepottert, da eine Homogenisierung durch Ultraschall nachweislich die Nukleinsäuren zerstört. Nach Beendigung der Extraktion wurde der Potterkopf in einem Eppendorf-Gefäß mit 200 μl Extraktionslösung für ca. 1 min mit 14500 g gewaschen, um

anhängende Zelltrümmer etc zu entfernen. Um die Zelltrümmer zu pelletieren wurde das Eppendorf-Gefäß anschließend 2 min mit 14500 g zentrifugiert.

1.4.2 Metabolitüberstand (= säurelösliche Fraktion)

Der Zellextrakt wurde anschließend 4 min mit 14500 g in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Metabolitüberstand, dh die säurelösliche Fraktion wurde abgenommen und in einem Eppendorf-Gefäß mit dem Waschüberstand des Potterkopfes (siehe oben) vereinigt. Um noch im Zellpellet verbliebene Metabolite auszuwaschen wurde das Zellpellet 2 x mit je 200 µl Extraktionslösung bei 14500 g zentrifugiert; der Überstand wurde ebenfalls mit dem Metabolitüberstand vereinigt. 400 µl des Metabolitüberstandes wurden entnommen, in ein Mini-Vial mit 3 ml Szintillator überführt und zur Bestimmung der Gesamtaktivität der säurelöslichen Fraktion direkt im Zähler gemessen. Um den Metabolitüberstand später mittels HPLC untersuchen zu können war es nötig, dass bei der Extraktion der Oozyten verwendete Methanol wieder zu entfernen. Im Metabolitüberstand verbliebenes Methanol führt zu einer starken Verbreiterung der einzelnen Peaks im Chromatogramm und damit zu einer schlechten Trennung. Hierzu wurde der restliche Überstand mit dem **0,3 fachen** Volumen eines Gemisches aus **0.75 M K₂CO₃** und **2 mM HEPES** neutralisiert. 300 µl des neutralisierten Metabolitüberstandes wurden unter dem Abzug mit N₂ über einen Zeitraum von ca. 60 min vollständig verdampft und anschließend wieder mit 300 µl Aqua dest. aufgenommen. Dieser so behandelten Metabolitüberstand wurde später mittels HPLC analysiert (siehe **Kapitel 1.5.4**).

1.4.3 Entfetten des Pellets

Das nach Gewinnung des Metabolitüberstandes verbliebene, säureunlösliche Pellet enthielt, vor allem bei größeren Oozyten, große Mengen Lipid, die vor der Weiterbehandlung der Proben erst entfernt werden mussten. Dazu wurde das Pellet mit 400 µl Ethanol (abs.) versetzt; mit einem Plastikspatel vermischt und 4 min mit 14500 g zentrifugiert. Der trüb-gelbe, lipidhaltige Überstand wurde abpipettiert und in einem Eppendorf-Gefäß gesammelt. Danach wurde das Pellet von Oozyten mindestens zweimal mit je 400 µl eines Ethanol-Ether (1:3) Gemisches versetzt, gut resuspendiert (Plastikspatel) und jeweils 4 min mit 14500 g zentrifugiert, um das restliche Lipid zu entfernen. Der Vorgang war so oft zu wiederholen bis der Überstand völlig klar, also lipidfrei war. Die lipidhaltigen Überstände wurden jeweils vorsichtig abpipettiert ohne das dünne, weiße Pellet zwischen den beiden Phasen zu zerstören und miteinander vereinigt. Bei einem Pellet männlicher Keimzellen war einmaliges „waschen“ mit Ethanol-Ether meist ausreichend. Der gesammelte Lipidüberstand wurde komplett in ein Szintillationsgefäß verbracht und die Radioaktivität im Zähler bestimmt. Das Pellet wurde ca. 5 min bei 37 °C auf dem Heizblock getrocknet bevor es für die Hydrolyse der RNA verwendet werden konnte. Vorversuche haben gezeigt, dass das Entfetten keinen nachweisbaren Verlust von DNA und RNA zur Folge hat.

1.4.4 Alkalische Hydrolyse der RNA

Das entfettete Pellet wurde mit 400 µl einer 0.3 M KOH Lösung versetzt gut durchmischt (Vortex) und 1 h und 30 min bei 37 °C im Heizblock belassen. Zur annähernd vollständigen Auflösung des Pellets wurden die Proben etwa alle 20 min kurz aus dem Heizblock entnommen und auf dem Vortex geschüttelt. Nach Olds (1973) und nach eigenen Voruntersuchungen reicht eine Hydrolysedauer von 1 h und 30 min aus um die RNA vollständig zu hydrolysieren. Voruntersuchungen mit RNA-Standards haben gezeigt, dass der RNA-Wiederfund nach Hydrolyse in jedem Fall mindestens 95 % beträgt. Nach Abschluß der Hydrolyse wurde die Probe für ca. 5 min auf Eis gestellt; danach mit je 800 µl 0.4 N PCA wieder stark angesäuert und für 1 h auf dem Eis belassen. In dieser Zeit konnten die durch die Hydrolyse der RNA entstandenen Nukleotide im Säuren in Lösung gehen, während die DNA als weißes, flockiges Pulver ausfiel. Die Probe wurden zwischendurch immer wieder auf dem Vortex geschüttelt. Anschließend wurde die Probe je 5 min mit 14500 g zentrifugiert, der Überstand (= RNA-Hydrolysat) wurde abpipettiert und in ein anderes Eppendorf-Gefäß überführt. Das Pellet wurde mit 400 µl 0.4 N PCA versetzt, resuspendiert und erneut 5 min mit 14500 g zentrifugiert. Das Pellet, das im wesentlichen nur noch DNA und Protein enthielt, wurde sodann für die nachfolgende DNA-Hydrolyse aufbewahrt (siehe unten). Die beiden Überstände wurden vereinigt und mit etwa dem 0,2-fachen Volumen eines Gemisches aus 0.75 M K₂CO₃ und 2 mM HEPES neutralisiert (pH 7). Der durch die Neutralisation entstandene weiße Niederschlag wurde sedimentiert (1 min mit 14500 g) und der Überstand folgendermaßen aliquotiert: 800 µl für die sofortige Bestimmung der Gesamtaktivität im Radioaktivitäts-Zähler; 20 µl für Bestimmung des RNA-Gehaltes im Photometer und 400 µl für die HPLC; die beiden letzten Aliquots wurden vorerst in N₂ eingefroren. Nur bei Oozyten mit einem Durchmesser über 120 - 140 µm entstand nach RNA-Hydrolyse und nach dem Ansäuern des Hydrolysats eine stark gequollene Substanz, bei der es sich möglicherweise um DNA handelte. Diese Substanz ließ sich nicht mehr abzentrifugieren; eine quantitative Gewinnung des RNA-Hydrolysat war dadurch nicht möglich. Diese Quellung konnte in den meisten Fällen durch die nachträgliche Zugabe von **Isopropanol** im Verhältnis (2:1) zu dem Hydrolysat wieder aufgehoben werden. Nach Durchmischung mit einem Plastikspatel wurde der Ansatz mindestens 5 min mit 14500 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und das Pellet mit 400 µl Ethanol (abs.) versetzt, mit dem Spatel kräftig durchmischt und erneut 5 min mit 14500 g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit dem vorherigen vereinigt. 800 µl des so erhaltenen RNA-Hydrolysats wurden direkt in ein Reaktionsgefäß mit Szintillator pipettiert und im Radioaktivitäts-Zähler gemessen. 50-300 µl des Ethanolhaltigen RNA-Hydrolysats wurden mit N₂ eindampft, um das Ethanol zu entfernen. Nach dem Eindampfen wurde das Pellet in der entsprechenden Menge Aqua dest. aufgenommen und anschließend mit ca. dem 0,2-fachen eines Gemisches aus 0,75 M K₂CO₃ + 2 mM HEPES neutralisiert. Nach dem Neutralisieren wurde das RNA-Hydrolysat für die HPLC-Messungen (siehe **Kapitel 1.5.5**) und für die Bestimmung des RNA-Gehaltes wie in **Kapitel 1.7** beschrieben aliquotiert und in N₂ eingefroren.

1.4.5 DNA-Hydrolyse

Das nach RNA-Hydrolyse verbliebene Pellet wurde mit 600 µl 0.4 N PCA versetzt und 1 h lang bei 95 °C im Heizblock inkubiert. Bei ausgewachsenen Oozyten und bei Spermien sollte die Hydrolyse laut Angaben in der Literatur dagegen mindestens zwei Stunden betragen (siehe Hauschka, 1973). Danach kam die Probe zum Abkühlen für 5 min auf Eis. Es wurden 400 µl 0.4 N PCA zugegeben und das Ganze 3 min mit 13500 g zentrifugiert. Der Überstand (= DNA-Hydrolysat) bestand nun aus den Purin- bzw. Pyrimidinbasen der DNA. Das Pellet (Protein) wurde aufbewahrt und später auf eingebaute Radioaktivität untersucht (siehe weiter unten). Zur späteren Untersuchung der Probe mittels HPLC und zur Bestimmung des DNA-Gehalts wurde das DNA-Hydrolysat mit dem 0,27-fachen Volumen 0,75M K₂CO₃ neutralisiert; anschließend noch einmal 1 min mit 14500 g zentrifugiert. Der Überstand wurde folgendermaßen aliquotiert: **400 µl** für die sofortige Bestimmung der Gesamtaktivität im Radioaktivitäts-Zähler; **20 µl** für Bestimmung des DNA-Gehaltes im Photometer (siehe **Kapitel 1.7**) und **400 µl** für die HPLC (siehe **Kapitel 1.5.6**) die beiden letzten Aliquots wurden vorerst in N₂ eingefroren. Die in Vorversuchen ermittelte Wiederfundrate für DNA belief sich nach diesem Trennungsgang immer auf 80 % oder mehr.

1.4.6 Aktivität in Protein:

Das nach DNA-Hydrolyse verbliebene Protein-Pellet wurde mit 200 µl 0.4 N PCA versetzt, gut resuspendiert und zur Bestimmung der Radioaktivität direkt in ein Reaktionsgefäß mit Szintillator gegeben.

1.5 HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

What you put in a column doesn't always come out the way you expect

John W. Dolan (1996)

1.5.1 Allgemeines zur HPLC-Methode

Mit dem HPLC-Verfahren kann man einzelne Substanzen eines Substanzgemisches voneinander trennen und quantitativ sowie qualitativ bestimmen. Die HPLC-Methode beruht, wie alle Chromatographieverfahren, auf der Verteilung der zu trennenden Substanz zwischen zwei Phasen: Die ruhende Phase wird als stationäre Phase bezeichnet und wird durch das Material in der Trennsäule repräsentiert. Die andere Phase bewegt sich unter Druck durch die Trennsäule und wird deshalb als mobile Phase bezeichnet. Im Folgenden wird der Aufbau der von mir verwendeten HPLC-Anlage beschrieben (siehe **Abb. 2**).

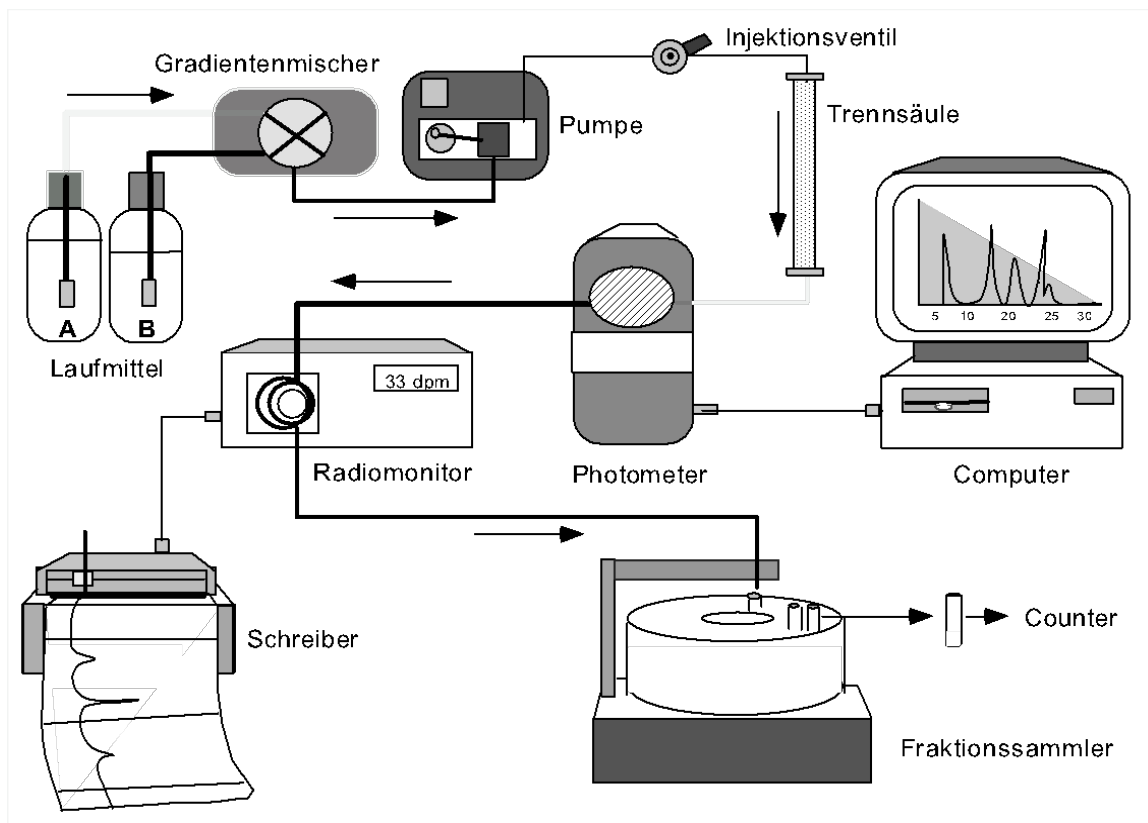


Abb. 2 : Aufbau der verwendeten HPLC-Anlage. Der Anlage wurde außerdem ein Radioaktivitätsmonitor mit Schreiber und ein Fraktionssammler nachgeschaltet.

Die verwendete HPLC-Anlage bestand aus einem Gradientenmischer, in dem die Laufmittel A und B, der mobilen Phase, im gewünschten Verhältnis miteinander gemischt werden. Eine Pumpe erzeugt einen hohen Druck auf der Trennsäule. Zwischen Pumpe und Trennsäule befindet sich ein Injektionsventil zum Einbringen der Probe in das System. Auf der Trennsäule, die auch als stationäre Phase bezeichnet wird, werden die Substanzen eines

Substanzgemisches in Abhängigkeit von der Polarität der Substanz und den Eigenschaften der Trennsäule getrennt. Die von der Trennsäule unterschiedlich lang zurückgehaltenen Substanzen gelangen dann in ein Photometer. Dort wird die Absorption der Substanz bei zwei oder mehr unterschiedlichen Wellenlängen gemessen. Ein nachgeschaltetes Rechnersystem stellt diese Absorption als Peak dar. Das Ausmaß der Absorption ermöglicht es die Menge einer bestimmten Substanz genau zu ermitteln. Bildet man aus den Absorptionen einer Substanz bei zwei verschiedenen Wellenlängen den Quotienten so erhält man ein, für diese Substanz, charakteristisches Kanalverhältnis. Das Kanalverhältnis und die aus Standardläufen (Läufe mit bekannter Substanz und bekannter Konzentration) gewonnene Information ermöglicht die reproduzierbare Identifizierung einer Substanz. Weiterführende Literatur zum Thema HPLC siehe Meyer (1996); Meyer (1988) und zu speziellen Problemen die Zeitschriftenreihe LCGC International.

1.5.2 HPLC-Messung der säurelöslichen, der RNA- und der DNA-Fraktion von Keimzellen

Die säurelösliche-, die DNA- und die RNA-Fraktion der *Nereis*-Keimzellen wurden nach Inkubation mit ^{14}C -Inosin bzw. ^{14}C -Guanosin mittels HPLC untersucht. Die Radioaktivitäten der aufgetrennten Substanzen wurden anschließend im Durchfluß-Radioaktivitätsmonitor und zusätzlich im Radioaktivitätszähler gemessen. Dadurch konnte man den Metabolismus aufgenommener Nukleoside in den Keimzellen bestimmen. Die untersuchten Substanzen wurden mit einem Gradientensystem getrennt, d.h. es wurden zwei verschiedene Laufmittel verwendet. **Laufmittel A:** (Dikaliumhydrogenphosphat); der gewünschte pH-Wert des K_2HPO_4 wurde nach dem Ansetzen in Reinstwasser mit H_3PO_4 konz. eingestellt. **Laufmittel B:** (Methanol): Zum Herstellen von 1 Liter wurden 500 ml Methanol (HPLC-Grade) in einem Meßkolben vorgelegt und der Kolben anschließend mit Reinstwasser auf 1 Liter aufgefüllt. Danach wurden die Laufmittel mittels Unterdrucks durch ein $0,2\ \mu\text{m}$ Cellulosefilter gefiltert und danach unter starkem Rühren durch Anlegen von Unterdruck (etwa 10-15 min lang) entgast. Die Trennung der Substanzen wurde mit einer C_{18} -Umkehrphasensäule durchgeführt. Das Säulenmaterial besteht aus unpolaren C_{18} -Alkylketten (Octadecylsilan). Die auf die Säule aufgetragenen Substanzen binden je nach ihrer Polarität mehr oder weniger stark an das Säulenmaterial. Das polare Laufmittel (Methanol) verdrängt, in dem Maß, in dem es auf die C_{18} -Säule geschickt wird, die an die stationäre Phase gebundenen Substanzen. Stärker gebundene, dh sehr unpolare Substanzen werden demnach erst sehr spät von der Säule eluiert.

1.5.3 Kalibrierung:

Dazu wurde eine definierte Menge einer Substanz bekannter Konzentration auf die Säule gegeben (zB 5 nmol) und bei einem isokratischen Gradienten (zB mit 15 % Laufmittel B) getrennt (Mehrfachbestimmung). Man erhält Peaks, deren Flächenwerte [Fläche/min] mehr oder weniger stark divergieren. Der Quotient aus gemittelten Flächenwerten [Fläche/min] und aus applizierter Substanzkonzentration [nmol] ergibt einen Flächenwert der 1 nmol der applizierten Substanz entspricht [Fläche/1 nmol]. Als Kalibrierungsfaktor wird im Allgemeinen der Reziprok-Wert, dh $1 / [\text{Fläche}/1\text{nmol}]$ verwendet. Die Konzentration einer im Chromatogramm identifizierten Substanz kann somit über ihren Kalibrierungsfaktor berechnet werden: Peakfläche [Fläche /min] * Kalibrierungsfaktor [nmol/Fläche] = Substratkonzentration pro eingesetztem Probenvolumen. Will man dieselbe Substanz auf

einer Säule mit einem anderen Durchmesser trennen oder will man die Flußrate ändern, so sind die Kalibrierungsfaktoren jeweils neu zu bestimmen.

1.5.4 HPLC-Messung der säurelöslichen Fraktion

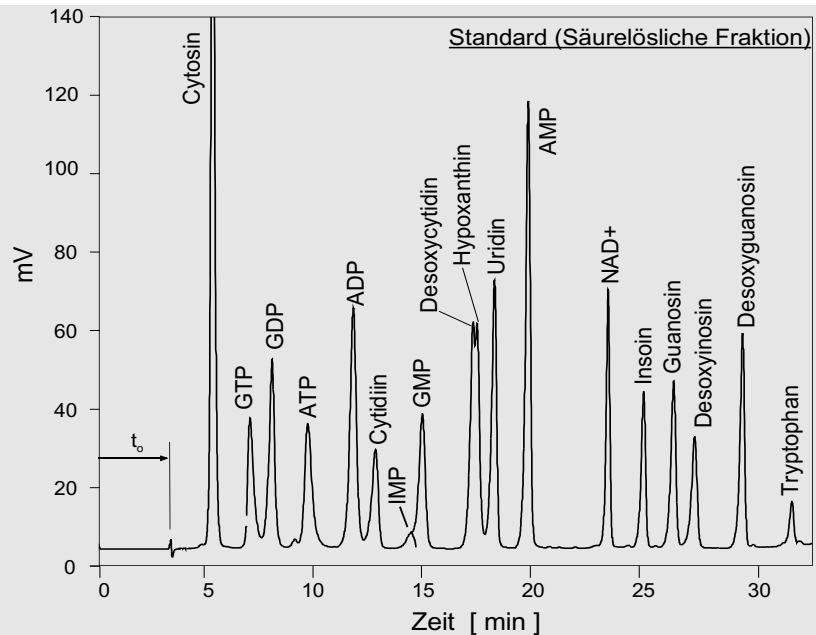
Die säurelösliche Fraktion der Keimzellen wurde mittels HPLC auf das Vorhandensein 34 verschiedener Substanzen untersucht, von denen zu vermuten war, dass sie in der säurelöslichen Fraktion vorkommen. Alle untersuchten Substanzen sind in annähernd der Reihenfolge (von oben nach unten) aufgelistet mit der sie von der Säule eluiert werden (siehe **Tabelle 1**).

Substanz	Kanalverhältnis 254 / 280		nmol / Fläche Flußrate 1 ml / min pH 3,8	nmol / Fläche Flußrate 0,5 ml / min pH 3,8
	pH 3,8	pH 4,1		
CTP	2,6	2,6	0,419	0,207058
Cytosin *	0,5		0,383779	
GTP ?	1,8	1,9	0,180669	0,08679
CMP			0,419	0,207058
XTP	3,0		0,244280	0,12018
UDP-Gluc. *	2,3		0,235833	0,111807
GDP ?	1,8		0,180669	0,08679
XDP	3,7		0,244280	0,12018
GDP-Man. ?	2		0,180669	0,08679
ATP *	5	4,4	0,1571	0,080932
ADP *	4	6,7 ?	0,1571	0,080932
Cytidin *	0,48-0,5	0,5	0,419	0,207058
Guanin	1,8		0,2252	0,346981
IMP?	6	6,1	0,222571	0,110053
Guanin		1		
Tyrosin ?	0,33		6,508	3,057608
GMP ?	1,7-1,8	1,9	0,180669	0,08679
UA *	0,3		0,216702	0,211412
Deocyt. *	0,57	0,87	0,376	
Hypoxanth. *	12		0,188	
Uridin *	2,5-2,8	2,8	0,235833	0,111807
XMP	3,77		0,244280	0,12018
Xanthin?	1,4		0,332787	0,152233
AMP *	5	5,6	0,1571	0,080932
NAD+ *	5	4,9	0,13112	
Phe	6,6		14,9136	6,014676
Inosin *	5-5,5	5,8	0,222571	0,110053
Guanosin *	1,7-1,8	1,77	0,180669	0,08679
Deoinosin *	5,6	6,33	0,222571	0,110053
Deoguanosin ?	1,8	1,8	0,180669	0,08679
Adenosin	4,7		0,1571	0,080932
Tryptophan *	0,5-0,6	0,56	0,743523	0,360300

Tabelle 1 : HPLC-Untersuchung der säurelöslichen Fraktion von *Nereis*-Keimzellen auf das Vorhandensein von 34 verschiedenen Substanzen: Nur eindeutig nachgewiesene Substanzen sind mit einem * gekennzeichnet. War der Nachweis nicht eindeutig, so ist die Substanz mit einem „?“ versehen. Die nicht gekennzeichneten Substanzen konnten in keinem Fall nachgewiesen werden. Das Kanalverhältnis der Substanzen bei 254/280 nm wurde bei zwei verschiedenen pH-Werten (3.8 und 4.1) und der Kalibrierungsfaktors [nmol/Peakfläche] bei zwei verschiedenen Flußraten (1 ml und 0.5 ml) ermittelt.

Die **Abb. 3** zeigt die chromatographische Auftrennung eines **Standardgemisches** aus Substanzen, die in der säurelöslichen Fraktion von *Nereis*-Keimzellen nachweisbar waren. Solche sogenannten Standardläufe dienten zur Optimierung der Trennmethode. Mit Hilfe der hierbei verwendeten 300 mm langen C¹⁸-Säule war eine gleichzeitige Trennung von Nucleosiden und Nucleotiden möglich.

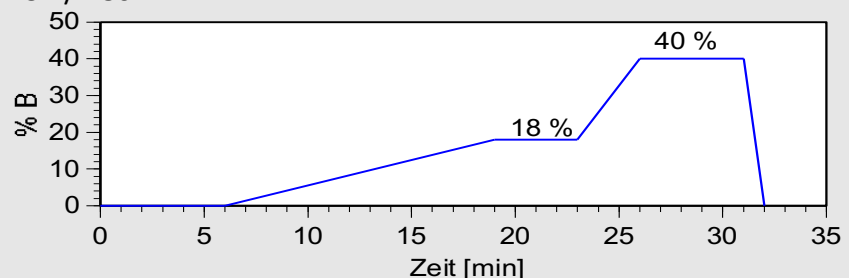
Abb. 3: HPLC-Standardlauf: Chromatographische Auftrennung von Substanzen die man in der säurelöslichen Fraktion der Keimzellen finden kann. Abszisse: Retentionszeit der Substanzen; Ordinate: Konzentrationsabhängiges Meßsignal des Photometers in mV. t_0 = Totzeit oder Nettoretentionszeit der Anlage = erste Basislinienschwankung.



Trennbedingungen

Laufmittel A: 45 mM Dikaliumhydrogenphosphat pH 3,8 - 4,0
 Laufmittel B: 50 % Methanol
 Trennsäule : C₁₈-Umkehrphasensäule , 300 x 4,6 mm, Nucleosil 100 , 5 µm
 Flußrate : 1 ml / min bei Raumtemperatur
 Wellenlänge : 254 / 280 nm

Gradient Laufmittel B:



1.5.5 HPLC-Messung des RNA-Hydrolysats

In den RNA-Hydrolysaten wurde die Trennung und Charakterisierung der Nukleotide dadurch erschwert, dass viele der RNA-Nukleotide methyliert sind. Außerdem entstehen, laut Rottlan et al (1986), durch die alkalische Hydrolyse der RNA neben den „normalen“ Nukleotiden auch 2' und 3' Isomere der RNA-Nukleotide. Da diese Nukleotide mittels HPLC nicht ohne größeren Aufwand voneinander getrennt werden können, wurden 200 µl des Hydrolysats 20 min bei 37°C mit 200 µl 50 mM Glycinpuffer (pH 9.6) inkubiert, der etwa 0,5 U alkalische Phosphatase (EC 3.1.3.1) enthielt. Die alkalische Phosphatase baut Nukleotide zu den entsprechenden Nukleosiden ab. Das RNA-Hydrolysat der Keimzellen wurde anschließend mittels HPLC auf das Vorhandensein von 17 verschiedenen Substanzen untersucht, von denen zu vermuten war, dass sie im RNA-Hydrolysat vorkommen. Alle untersuchten Substanzen sind in annähernd der

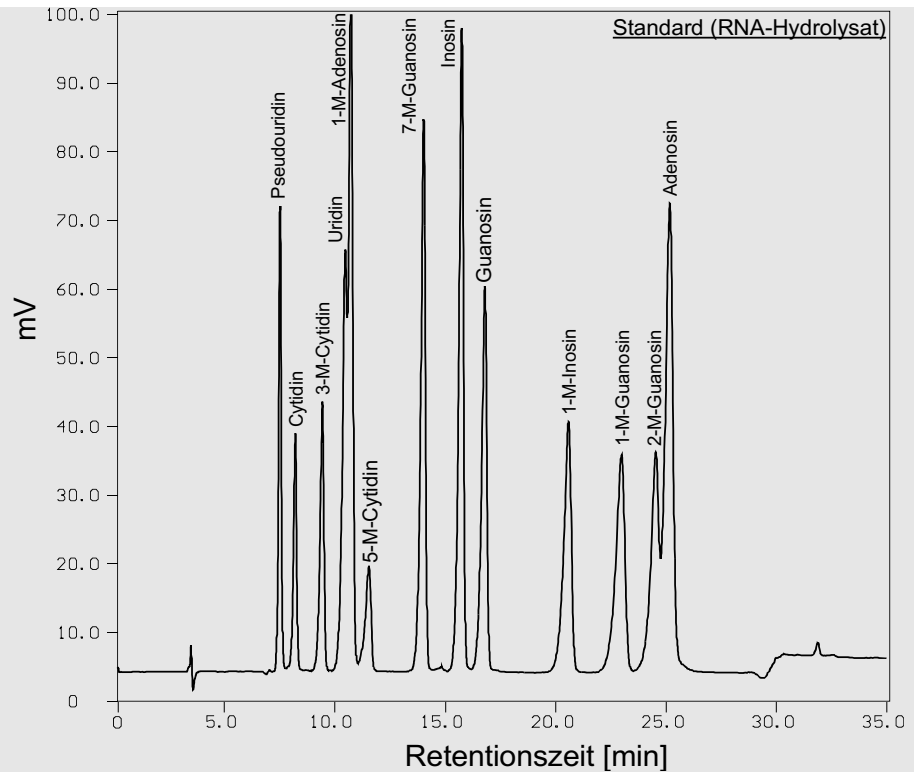
Reihenfolge (von oben nach unten) aufgelistet mit der sie von der Säule eluiert werden (siehe nachfolgende **Tabelle 2**).

Substanz	Kanalverhältnis		254 / 280	nmol / Fläche 1ml /min Flußrate	nmol / Fläche 0,5 ml/min Flußrate
	pH 3,8	pH4,2	pH 5,1	pH 3,8	pH 3,8
Cytosin ?	0,5	0,5		0,383779	0,153032
Pseudouridin (ψ) *	2,3		2,17	0,318137	
Cytidin (C) *	0,48 - 05		0,92 - 1,08	0,419207	0,207058
3-Methyl-Cytidin			0,37		
Uridin (U) *	2,5 - 2,8		2,55 - 2,78	0,235833	0,111807
1-Methyl-Adenosin?	4,76	4,6	4,33	0,209135	
Adenin ?	3,5			0,1808	
5-Methyl-Cytidin ?	0,31		0,51		
2-Methyl-Cytidin	ca. 0,27				
7-Methyl-Guanosin	1,44	1,44	1,36	0,253807	
Inosin (I) *	5 - 5,5		4,17 - 5,89	0,222571	0,110053
5-Methyl-Uridin ?			1,08		
Guanosin (G) *	1,7 - 1,8		1,49 - 1,6	0,180669	0,08679
1-Methyl-Inosin ?	3,36		3,66	0,342935	
1-Methyl-Guanosin *	1,2		1,84	0,208	
2-Methyl-Guanosin *	1,8		1,8		
Adenosin (A) *	4,7		4,71 - 6,67	0,1571	0,080932

Tabelle 2: HPLC-Untersuchung des RNA-Hydrolysats von *Nereis*-Keimzellen auf das Vorhandensein von 17 verschiedenen Substanzen: Die eindeutig nachgewiesenen Substanzen sind mit einem * markiert. War der Nachweis nicht eindeutig so ist die Substanz mit einem ? versehen. Das Kanalverhältnis der Substanzen bei 254/280 nm wurde bei zwei verschiedenen pH-Werten (3.8 und 4.2) ermittelt. Das Kanalverhältnis bei pH 5.1 stammt aus der Veröffentlichung von Gehrke et al. (1980). Der Kalibrierungsfaktors [nmol/Peakfläche] wurde bei zwei verschiedenen Flußraten (1ml und 0.5 ml) ermittelt.

Zum Optimieren der Trennbedingungen wurde ein Hydrolysat aus Hefe-RNA verwendet; das Ergebnis einer solchen Trennung ist in **Abb. 4** zu sehen.

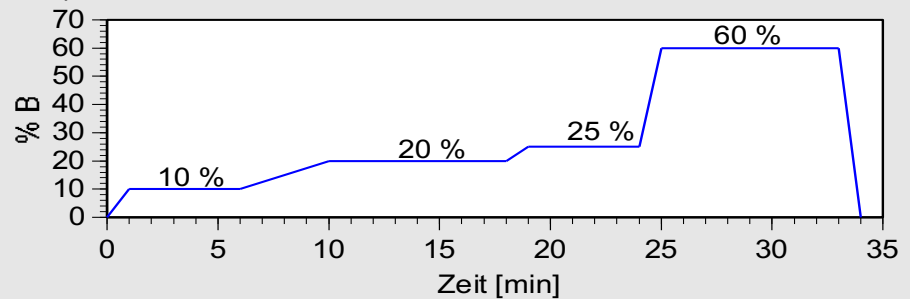
Abb. 4: Chromatographische Auftrennung eines RNA-Hydrolysats. (RNA von Hefe). Abszisse: Retentionszeit der Nucleoside und Nucleotide; Ordinate: Konzentrationsabhängiges Meßsignal des Photometers in mV.



Trennbedingungen

Laufmittel A: 45 mM Dikaliumhydrogenphosphat **pH 3,8 - 4,0**
 Laufmittel B: 50 % Methanol
 Trennsäule: C 18 Umkehrphasensäule, 300 x 4,6 mm, Nucleosil 100, 5 µm
 Flußrate: 1ml / min bei Raumtemperatur
 Wellenlänge: 254 / 280 nm

Gradient Laufmittel B:



1.5.6 HPLC-Messung des DNA-Hydrolysats

Da die Fraktion mittelgroßer bis großer Oozyten auch nach dem Ausschütteln mit Isopropanol (siehe **Kapitel 1.4**) eine Substanz enthielt die im Chromatogramm zur Verbreiterung der Peaks führte, mussten jeweils 300 µl der Probe zusätzlich mit 100 µl Chloroform ausgeschüttelt werden. Anschließend wurden die Proben 3 min mit 14500 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in der HPLC gemessen. Die in dem DNA-Hydrolysat der Keimzellen beiderlei Geschlechts nachgewiesenen Basen sind in der **Tabelle 3** aufgelistet:

Substanz	Kanalverhältnis 254 / 280		nmol / Fläche Flußrate 1ml / min		nmol / Fläche Flußrate 0,5 ml / min
	pH 3,8	pH 5,2	pH 3,8	pH 5,2	pH 3,8
Cytosin	0,5	1	0,383779	0,317662	0,153032
Thymin	1,72	1,77	0,31948	0,3003	
Guanin	1,27	1,28	0,2252	0,346981	
Adenin	3,2 - 3,5	6,76	0,1808	0,16595	

Tabelle 3: Im DNA-Hydrolysat von Keimzellen nachgewiesene Basen. Das Kanalverhältnis der Basen bei 254/280 nm wurde bei zwei verschiedenen pH-Werten (3.8 und 5.2) und der Kalibrierungsfaktors [nmol/Peakfläche] bei zwei verschiedenen Flußraten (1 ml und 0.5 ml) ermittelt.

Die Trennung der, durch Hydrolyse freigesetzten Basen konnte durch Veränderung des pH-Wertes im Laufmittel A (K_2HPO_4 -Puffer) verbessert werden. Bei pH 5.2 war eine optimale Trennung aller vier Basen möglich (siehe **Abb. 5 a+b.**).

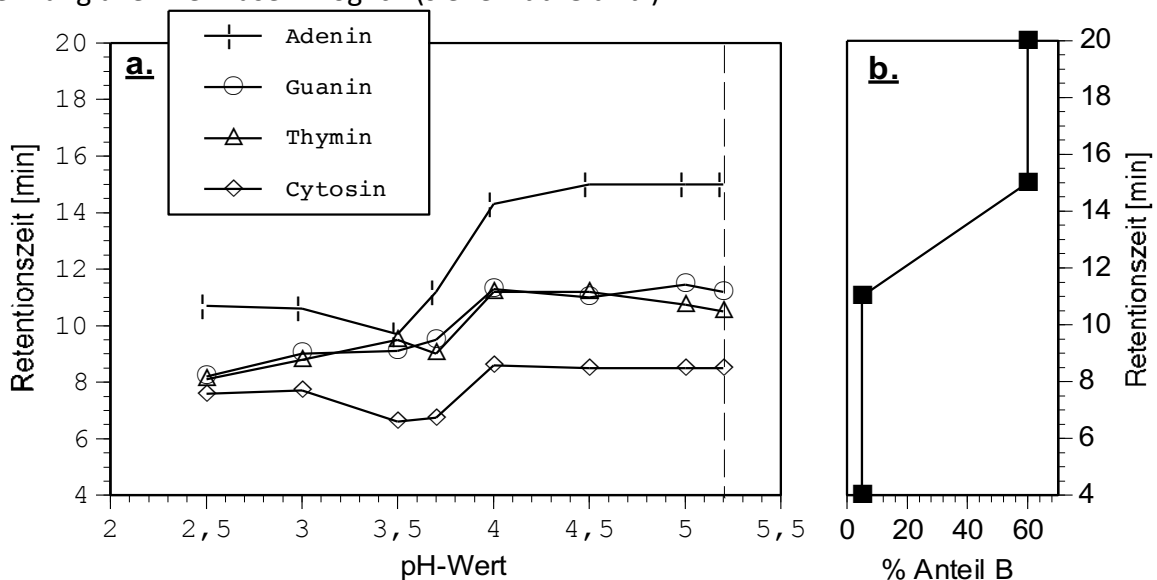
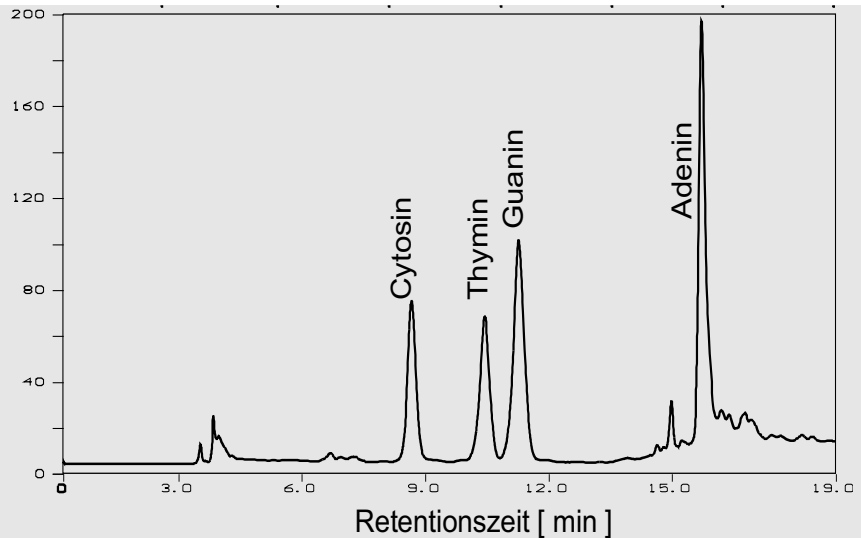


Abb. 5(a.+b.): Optimierung der Trennmethode: (a.) Retentionszeiten der Basen Adenin, Guanin, Thymin und Cytosin eines DNA-Hydrolysats bei verschiedenen pH-Werten des Laufmittels A. Die gestrichelte Linie kennzeichnet den pH-Wert (5,2) bei dem eine optimale Trennung aller vier Basen zu erreichen war. (b.) Methanol-Gradient: % Anteil des Laufmittels B an der mobilen Phase während des HPLC-Laufes.

Das Chromatogramm in **Abb. 6** zeigt die Auftrennung der Basen eines Hydrolysats aus Hering-DNA bei pH 5,2.

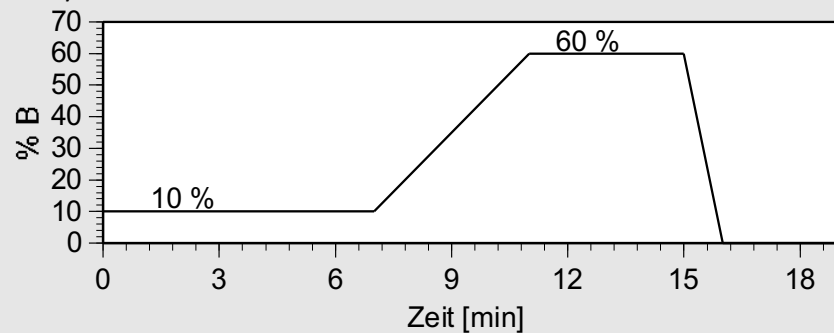
Abb. 6: Chromatographische Auftrennung der Basen eines DNA-Hydrolysats. (DNA von Hering-Spermien).
Abszisse: Retentionszeit der Basen; Ordinate: Konzentrationsabhängiges Meßsignal des Photometers in mV.



Trennbedingungen

Laufmittel A: 45 mM Dikaliumhydrogenphosphat **pH 5.2**
Laufmittel B: 50 % Methanol
Trennsäule: C 18 Umkehrphasensäule, 300 x 4,6 mm, Nucleosil 100, 5 µm
Flußrate: 1 ml / min bei Raumtemperatur
Wellenlänge: 254 / 280 nm

Gradient Laufmittel B:



1.5.7 Messung der Radioaktivität aufgetrennter Substanzen

Die mit HPLC aufgetrennten Substanzen gelangten, nachdem sie das Photometer verlassen hatten, in die Meßzelle eines Radioaktivitätsmonitors mit Feststoffszintillator; dadurch war noch während der HPLC-Trennung im Durchfluß zu erkennen, welche Substanzen durch die Inkubation mit ^{14}C -Inosin bzw. Guanosin radioaktiv markiert worden waren (siehe **Abb. 7 a+b**). Da die Empfindlichkeit des Radioaktivitätsmonitors zur quantitativen Bestimmung der Radioaktivitäten nicht in allen Fällen ausreichend war, obwohl die Ausbeute der verwendeten Meßzelle für ^{14}C wird vom Hersteller mit maximal 85 % angegeben ist, wurde das gesamte Eluat eines HPLC-Laufes, nach Passieren des Photometers und des Durchfluß-Radioaktivitätsmonitors mit Hilfe eines Fraktionssammlers in Szintillatorgefäßen (5 ml Reaktionsgefäße) aufgefangen (siehe hierzu auch **Abb. 2**). Die Sammeldauer betrug pro Szintillatorgefäß 40 sec. Die Gefäße wurden mit je 3 ml Szintillator befüllt und im Radioaktivitäts-Zähler gemessen

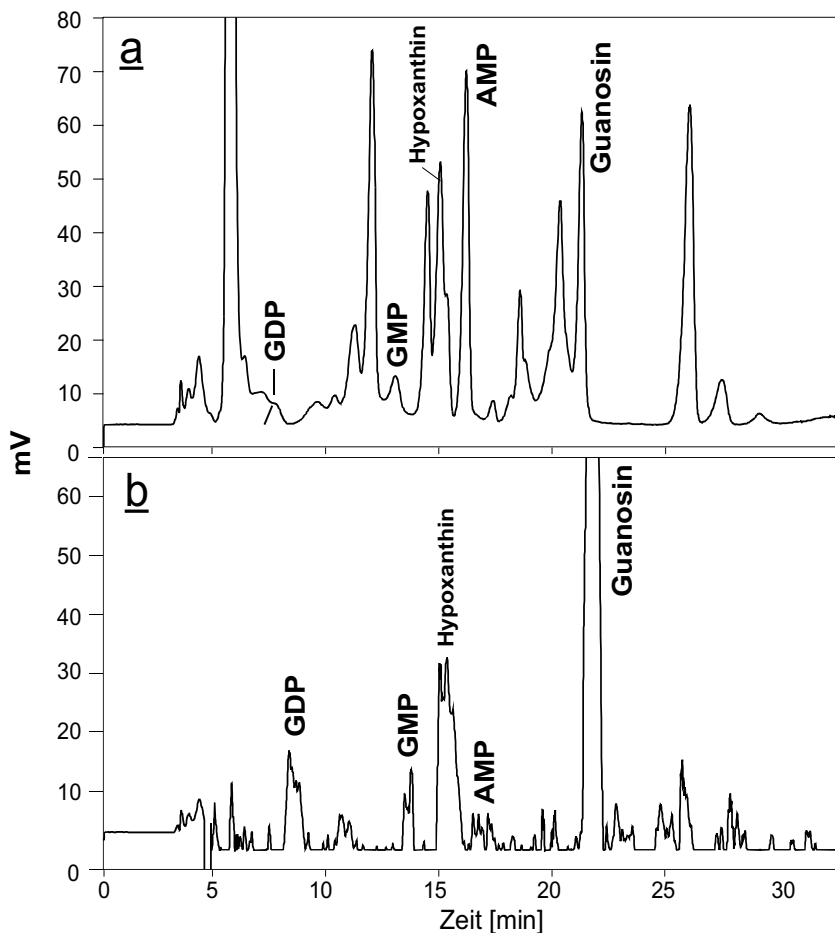


Abb. 7(a+b): Nachweis radioaktiv markierter Substanzen mittels HPLC in Verbindung mit einem Durchfluß-Radioaktivitätsmonitor: (a) HPLC-Chromatogramm der Substanzen in der säurelöslichen Fraktion von Oozyten; (b) Meßsignale der radioaktiv markierten Substanzen im Durchfluß-Radioaktivitätsmonitor. Abzisse: Retentionszeit der Nukleoside; Ordinate: Konzentrationsabhängiges Meßsignal des Photo-meters bzw. des Radio-Monitors für die einzelnen Substanzen (mV).

1.6 Photometrische Bestimmung des ATP-Gehaltes in Keimzellen

In Stickstoff eingefrorene Keimzellen wurden sofort nach ihrer Entnahme auf Eis gestellt; das gepackte Zellvolumen wurde 1:7 mit eiskalter 0,4 N PCA versetzt und sofort mit einem Plastikspatel durchmischt damit alle Keimzellen mit der Extraktionslösung in Berührung kommen konnten. Anschließend wurden die Zellen mit Ultraschall bei gleichzeitiger Kühlung homogenisiert. Die homogenisierten Zellen wurden 5 - 10 min mit 20000 g zentrifugiert; der Überstand abgenommen und im Verhältnis (2:1) mit 0.75 M K₂CO₃ neutralisiert. Von dieser Extraktions-Lösung wurde ein Aliquot zur Bestimmung der ATP-Konzentration abgenommen. Der Konzentrationsbestimmung von ATP lag folgender, indirekter optischer Test zugrunde:

$\text{Glucose} \xrightarrow[\text{Hexokinase}]{\text{ATP} \rightarrow \text{ADP}} \text{Glukose-6-P} \xrightarrow[\text{G6PDH}]{\text{NADP}^+ \rightarrow \text{NADPH}} \text{6-Phosphogluconat}$

Testansatz :	Stammfsg.	Ansatz [μl]	Endkonzentration Küvette
MgCl	100 mM	10	1 mM
Glukose	100 mM	10	1 mM
NADP+	8 mM	50	0,4 mM
G6PDH (EC 1.1.1.49)		20	0.5 U/cuv
Probe		200	
Tris-Puffer (25 mM; pH 8,1)		690	
Hexokinase - Start d. Messung (EC 2.7.1.1)		20	1 U / cuv

Die Messung wurde im Photometer bei einer Wellenlänge von 340 nm und bei einer Temperatur von 30 °C durchgeführt. Die Berechnung des ATP-Gehaltes geschah mit folgender Formel:

$$\text{ATP } [\mu\text{mol} / \mu\text{l ZV}] = \frac{(E_p - E_L) \times V_t \times Ex}{\varepsilon \times d \times V_p}$$

E_p = Extinktion (Probe); E_L = Extinktion (Leerwert); V_t = Küvettenvolumen (1ml); V_p = Probenvolumen; Ex = Extraktionsvolumen (Probenverdünnung); ε = Extinktionskoeffizient von NADPH (6,22 cm²/μmol); d = Schichtdicke der Küvette

1.7 Photometrische Bestimmung des RNA- und DNA-Gehaltes der Keimzellen

Die RNA- und DNA-Gehalte von *Nereis*-Keimzellen unterschiedlicher Entwicklungsstadien und beiderlei Geschlechts wurden ebenfalls bestimmt. Hierzu wurde jeweils ein Aliquot des RNA- und des DNA-Hydrolysats im Photometer der HPLC gemessen; die Hydrolysate liefen dazu nicht über eine Trennsäule, da der Gesamtgehalt an Nukleotiden bzw. Basen bestimmt werden sollte. Je 20 µl eines Hydrolysates wurden mit Aqua dest. verdünnt und anschließend im Photometer gemessen (Dreifachbestimmung). Es war davon auszugehen, dass sowohl das RNA- als auch das DNA-Hydrolysat der Keimzellen mehr oder weniger große Mengen Protein enthalten. Da die aromatischen Aminosäuren der Proteine die Messung des Nukleinsäuregehaltes beeinflussen war es notwendig den Proteinanteil nachträglich herauszurechnen. Dies geschah nach der Methode von Warburg und Christian (1941).

Meßbedingungen :

Laufmittel :	Aqua bidest
Flußrate :	0.2 ml / min
Wellenlänge :	260 und 280 nm
Probenverdünnung :	1:50
Probenvolumen :	50 µl

Erstellen von Eichgeraden :

Zum Erstellen von Eichgeraden wurden jeweils 1 mg RNA (aus Hefe) bzw. 1 mg DNA (aus Heringssperma) mit Hilfe der oben beschriebenen Hydrolyse-Methoden aufbereitet. Zur Erstellung der Eichgeraden wurden 0,00125 bis 0,0125 mg hydrolysierte RNA und 0,00025 bis 0,001 mg hydrolysierte DNA verwendet (siehe **Abb. 8**). In diesen Konzentrationsbereichen war die Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm linear. Die Extinktion der für die Hydrolyse verwendeten PCA wurde ebenfalls bestimmt und von der Extinktion der RNA- bzw. DNA-Hydrolysate abgezogen. Die RNA- bzw. DNA-Hydrolysate wurde vor der Messung nicht mit K_2CO_3 neutralisiert, da dies aufgrund des Ausfallens von Salzen und aufgrund von pH-Wert Änderungen zu stark schwankenden Messwerten geführt hat.

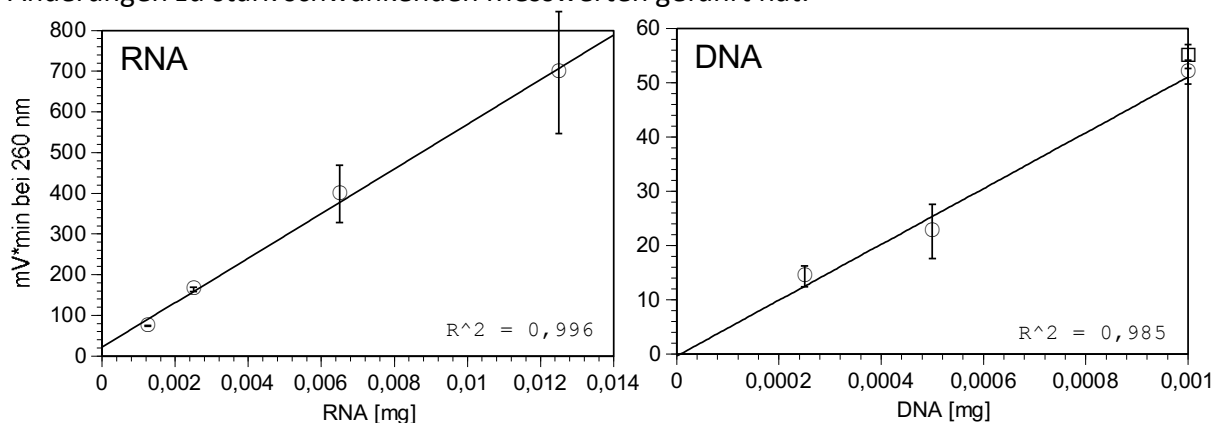


Abb. 8: RNA- und DNA-Eichgeraden zur Bestimmung des RNA- und DNA-Gehaltes in Keimzellen von *Nereis virens*; Abszisse: mg RNA bzw. DNA; Ordinate: Extinktion in mV*min bei 260 nm (Dreifach- bzw. Fünffachbestimmung).

2 Ergebnisse

2.1 Sekretion von Nucleosiden durch Elaeozyten von *Nereis virens*

Die Cölomflüssigkeit von *N. virens* enthält bei reifenden Tieren neben Keimzellen auch die **Elaeozyten**, deren Aufgabe es unter anderem ist, während der Geschlechtsreifung der weiblichen Tiere die Vorstufe eines Dotterproteins, das **Vitellogenin**, zu synthetisieren, welches von den Oozyten aufgenommen wird (Fischer et al, 1996). Eleaocyten kommen auch bei männlichen Tieren vor; eine Funktion bei der Versorgung männlicher Keimzellen war bislang jedoch nicht bekannt. In unserem Labor wurde in der Cölomflüssigkeit nach weiteren Nährstoffen gesucht, die für das Wachstum der Keimzellen von Bedeutung sein könnten. Im Zuge dessen konnten Kohlenhydrate (Märker, 1992), Aminosäuren (Mahlein, 1996) und D-Laktat (Hoeger und Kunz, 1993) nachgewiesen werden. In weiteren, mittels HPLC durchgeführten Untersuchungen in unserem Labor wurden auch die Nucleoside Inosin, Guanosin sowie deren entsprechende Desoxynucleoside in der Cölomflüssigkeit nachgewiesen: Bei männlichen Tieren nehmen die durchschnittlichen Konzentrationen von Inosin und Guanosin in der Cölomflüssigkeit vom Beginn bis zum Ende der Geschlechtsreifung um weit mehr als das Zehnfache zu (Inosin: von 10 bis >1000 $\mu\text{mol/l CF}$; Guanosin: von 0,6 bis >10 $\mu\text{mol/l CF}$), während sie bei den Weibchen sogar leicht abnehmen (Inosin: von 10 auf 5 $\mu\text{mol/l CF}$; Guanosin: von 5 auf 1 $\mu\text{mol/l CF}$) (siehe Hoeger, et al, 1996; Geier und Hoeger, 1997). Aufgrund der besonderen Funktion der Elaeozyten war es naheliegend zu untersuchen, ob sie für das Vorhandensein dieser Nucleoside in die Cölomflüssigkeit verantwortlich sind. Dazu wurden Elaeozyten ausgewachsener Tiere beiderlei Geschlechts über einen Zeitraum von 0 - 5 Tagen in Kultur gehalten. Zu Beginn der Kultur und jeweils nach 24 h wurde dem Kulturmedium ein Aliquot entnommen, und mittels HPLC wurde der Titer an Inosin bzw Guanosin bestimmt.

2.1.1 Sekretion von Inosin und Guanosin durch Eleaocyten

Die **Abb. 9** zeigt exemplarisch die Ausschnitte aus je sechs HPLC-Chromatogrammen in denen die gemessene Menge an Inosin bzw Guanosin im Elaeocyten-Kulturmedium in Form von Peaks dargestellt ist. Die Peaks der einzelnen Meßpunkte sind zur Verdeutlichung leicht hintereinander versetzt angeordnet.

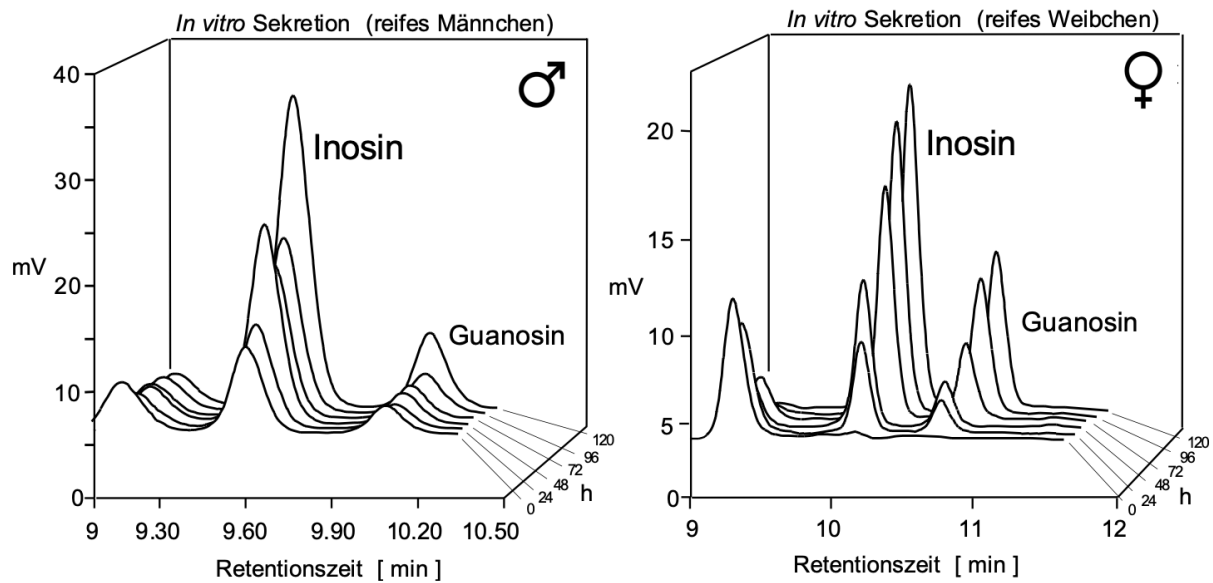


Abb. 9: Ausschnitt aus zwölf HPLC-Chromatogrammen: Abgabe von Inosin bzw Guanosin in das Kulturmedium durch Elaeozyten ausgewachsener männlicher und weiblicher Tiere von *Nereis virens* über einen Zeitraum von 0 - 120 h (siehe z-Achse). Nachweis der sezernierten Nucleoside im Medium durch HPLC-Messung. Abzisse: Retentionszeit der Nucleoside; Ordinate: Konzentrationsabhängiges Meßsignal des Photometers für Nucleoside (mV).

Man sieht, daß die Konzentration an Inosin bzw Guanosin im Kulturmedium mit Elaeozyten ausgewachsener Tiere beiderlei Geschlechts über den gesamten Kulturzeitraum deutlich zunimmt. In dieser Abbildung wird nicht gezeigt, daß die Elaeozyten in geringerer Menge auch Desoxyinosin bzw Desoxyguanosin in das Medium abgegeben haben. Im folgenden Abschnitt wird zu sehen sein, daß die Elaeozyten aller Reifestadien von Tieren beiderlei Geschlechts in der Lage waren Inosin bzw Guanosin und deren Desoxynucleoside in das Medium abzugeben.

2.1.2 Sekretion von Inosin bzw Guanosin durch Elaeozyten männlicher und weiblicher Tiere im Verlauf der Geschlechtsreifung

Um zu ermitteln, ob Elaeozyten männlicher und weiblicher *Nereis virens* während der gesamten Periode der Geschlechtsreifung Nucleoside in das Kulturmedium abgeben wurden jeweils 2×10^6 Zellen in Kultur genommen; über einen Zeitraum von teilweise bis zu 12 Tagen wurde alle 24 h ein Aliquot Kulturflüssigkeit entnommen und mittels HPLC auf Nucleoside getestet.

Die **Abb. 10** zeigt die Abgabe von Nucleosiden durch Elaeozyten weiblicher *Nereis virens* verschiedener Reifestadien in das Kulturmedium über einen Zeitraum von 0 - 12 Tagen. Es wurde die Sekretionsleistung von Elaeozyten aus I-Tieren (Tiere ohne Keimzellen), und aus Tieren mit den Oozytendurchmessern 35-70, 90-150 und 170-190 μm miteinander verglichen. Alle nachfolgenden Konzentrationsangaben beziehen sich auf die Menge an Nucleosiden die 2×10^6 Elaeozyten nach drei Tagen in Kultur abgegeben hatten. Man sieht, daß schon die Elaeozyten der I-Tiere signifikante Mengen an Inosin, Guanosin und deren Desoxynucleoside

in das Medium abgegeben hatten. Nach 3 Tagen in Kultur waren dies immerhin 0,004 - 0,07 μmol Inosin, 0,0026 - 0,02 μmol Guanosin, 0,006 μmol Desoxyinosin und 0,003 μmol Desoxyguanosin. Nach etwa 4 bis 12 Tagen Kulturdauer war keine weitere Anreicherung dieser Nucleoside mehr zu beobachten; dies traf allerdings nicht für Guanosin zu, Guanosin wurde in manchen Fällen auch noch nach 8 bzw 12 Tagen im Medium angereichert. Bei Elaeozyten aus Tieren mit kleinen Oozyten (35-70 μm Durchmesser) lagen die Sekretionsraten für Nucleoside in Einzelfällen noch über denjenigen der I-Tiere; es wurden folgende Konzentrationen gefunden: 0,01 - 0,12 μmol Inosin; 0,008 - 0,04 μmol Guanosin; 0,002 - 0,007 μmol Desoxyinosin; 0,0022 - 0,0024 μmol Desoxyguanosin. Die Sekretion von Inosin und Desoxyinosin durch diese Elaeozyten kam in fast allen Fällen nach etwa 4 - 12 Tagen zum Erliegen, nicht dagegen die Sekretion von Guanosin und Desoxyguanosin.

Elaeozyten aus Tieren mit Oozyten in der schnellen Wachstumsphase (90 - 150 μm Durchmesser) sezernierten *in vitro* bis zu sechsmal weniger Nucleoside. Es wurden nur noch folgende Konzentrationen gefunden: 0,009 - 0,02 μmol Inosin; 0,003 - 0,01 μmol Guanosin; 0,0016 - 0,0017 μmol Desoxyinosin und 0,0008 μmol Desoxyguanosin. Die Sekretion kam in allen Fällen bereits nach 3-4 Tagen zum Stillstand. Diese geringen Sekretionsraten blieben auch bei den Elaeozyten ausgewachsener Tiere (Oozytendurchmesser von 170-190 μm) bestehen; es wurden folgende Konzentrationen gefunden: 0,008 - 0,02 μmol Inosin; 0,002 - 0,006 μmol Guanosin. Desoxyinosin war nur noch in sehr geringen Mengen (0,0025 μmol nach 4 Tagen) und Desoxyguanosin überhaupt nicht mehr nachweisbar.

In **Abb. 11** wird jeweils der Quotient aus der nach 3 Tagen in das Kulturmedium sezernierten Nucleosidmenge und der Nucleosidmenge in den Elaeozyten zu Beginn der Kultur gebildet. Übersteigt die Menge an Nucleosiden nach drei Tagen in Kultur die Menge an Nucleosid in den Elaeozyten zu Beginn der Kultur (Quotient bzw Syntheseleistung in **Abb. 11** größer 1), dann kann man sicherlich schließen, daß die Elaeozyten im Verlauf der Kultur Nucleoside synthetisiert haben. Sind die im Medium angereicherten Nucleosidmengen geringer, als die Anfangskonzentration in den Elaeozyten dann könnte es sein, daß die Zellen zwar Nucleoside synthetisiert haben, ohne diese aber in das Medium abzugeben. Bei der Verwendung des Begriffes Synthese muß es sich in diesem Zusammenhang nicht unbedingt um *de novo*-Synthese handeln; damit kann auch ein Abbau von Nucleotiden zu Nucleosiden gemeint sein. In der **Abb. 11** ist eine Synthese von Inosin und Guanosin durch die Elaeozyten von I-Tieren deutlich nachweisbar; weniger eindeutig kann die Syntheseleistung der Elaeozyten von Tieren mit kleinen Oozyten (35 - 80 μm \varnothing) beurteilt werden, da die in das Medium abgegebene Menge an Nucleosiden nur wenig oder gar nicht über den Anfangskonzentrationen in den Elaeozyten lag. Bei den Elaeozyten aus Tieren mit Oozyten in der schnellen Wachstumsphase (90 -150 μm \varnothing) war die im Medium angereicherte Menge aller untersuchten Nucleoside im Vergleich zur Anfangskonzentration in den Elaeozyten immer viel geringer, so daß kein Rückschluß auf die Syntheseleistung der Elaeozyten möglich war. Elaeozyten aus Tieren mit ausgewachsenen Oozyten (170 - 190 μm \varnothing) synthetisierten erstaunlicherweise wieder geringe Mengen von Inosin und Guanosin; die Syntheseleistung dieser Elaeozyten reichte, soweit man das aus diesen Daten erschließen kann, aber bei weitem nicht mehr an die Syntheseleistung der Elaeozyten aus I-Tieren heran. Eine nachweisbare Synthese von Desoxyinosin konnte nur bei Elaeozyten junger Tiere (35 - 70 μm \varnothing) und eine Synthese von Desoxyguanosin nur bei Elaeozyten von I-Tieren gezeigt werden.

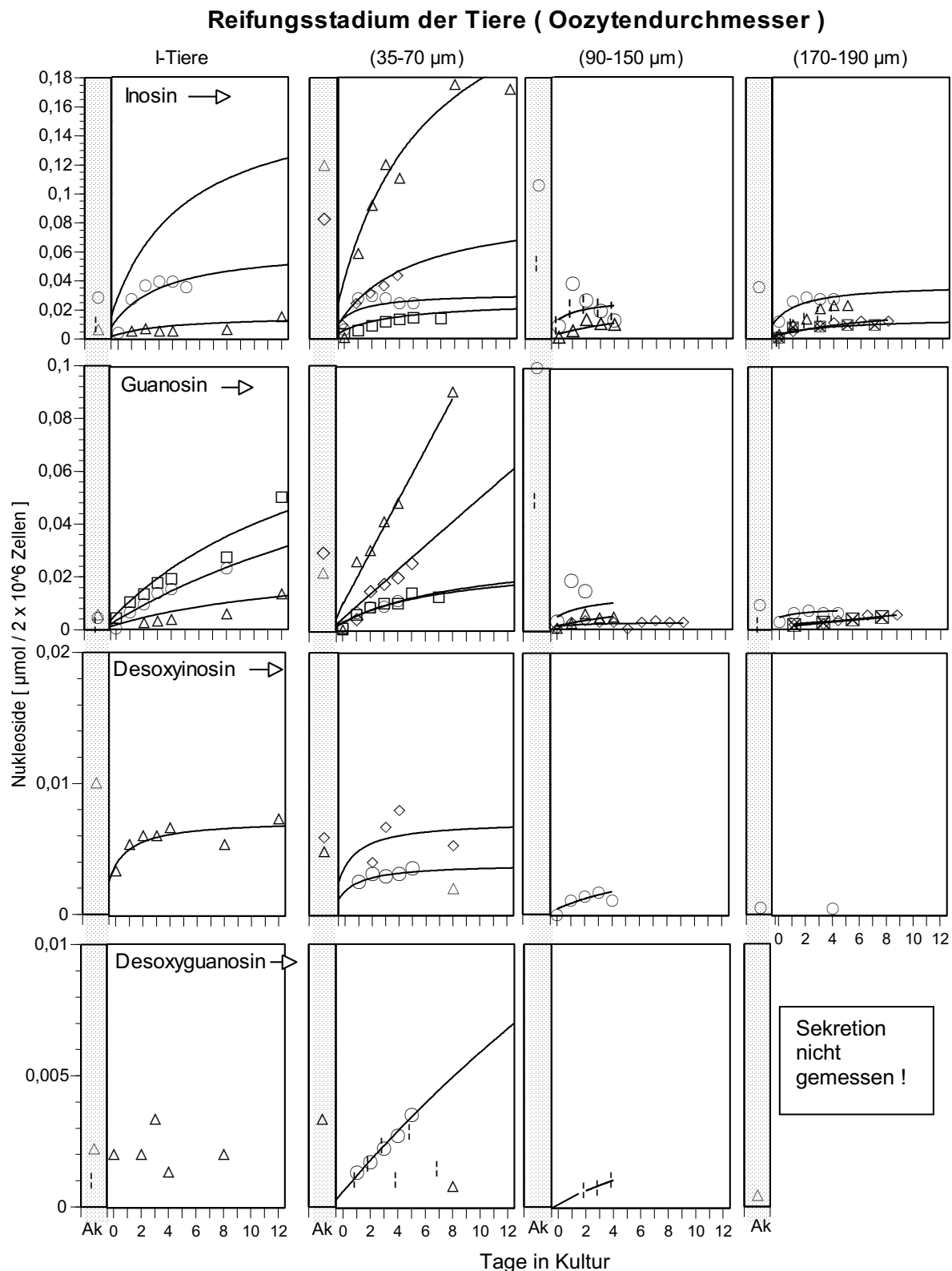


Abb. 10: Anreicherung von Nucleosiden im Kulturmedium von Elaeozyten weiblicher *Nereis virens* verschiedener Reifestadien über einen Zeitraum von 0 - 12 Tagen. Nachweis der sezernierten Nucleoside durch HPLC-Messung (Die Meßdaten wurden auf μmol sezerniertes Nucleosid pro 2×10^6 Zellen normiert). Jeweils die erste Spalte eines Diagrammes gibt die durch HPLC-Messung bestimmte Anfangskonzentration (Ak) des Nucleosids pro 2×10^6 Zellen an. Oberhalb der Diagramme ist der Durchmesser der Oozyten in μm angegeben. Die verschiedenen Symbole repräsentieren jeweils verschiedene Individuen. Ein Teil der gezeigten Ergebnisse wurde bereits in meiner Diplomarbeit veröffentlicht (siehe Geier, 1992).

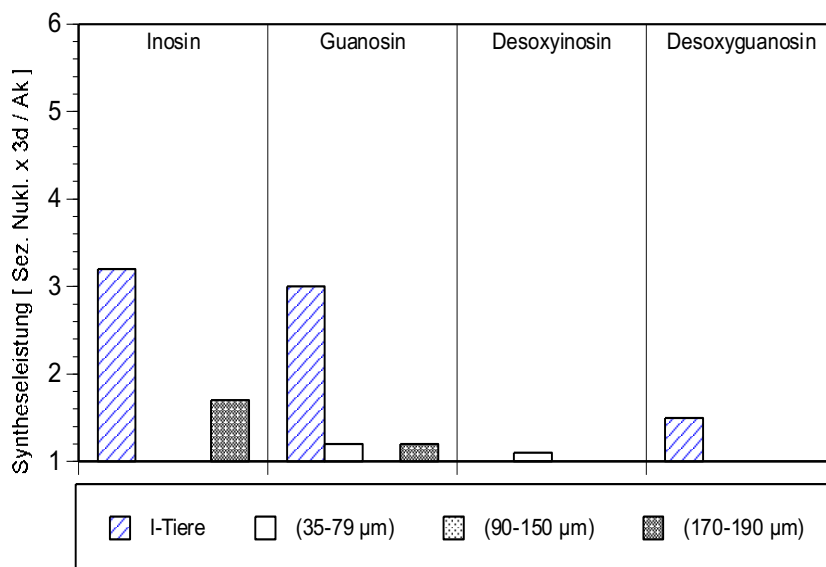


Abb. 11: Synthese- und Sekretionsleistung von Elaeozyten weiblicher Tiere verschiedener Reifungsstadien, berechnet aus dem Quotienten aus der nach 3 Tagen in Kultur abgegebenen Nucleosidmenge [$\mu\text{mol}/2 \times 10^6$ Zellen] und der Anfangskonzentration (AK) an Nucleosiden in den Elaeozyten [$\mu\text{mol}/2 \times 10^6$ Zellen]. Bei Inosin bzw Guanosin jeweils MW von 2 oder 3 Meßpunkten. Bei

Desoxyinosin bzw -guanosin liegt jeweils nur 1 Meßwert vor.

Die **Abb. 12** zeigt die Anreicherung von Nucleosiden durch Elaeozyten männlicher *Nereis virens* verschiedener Reifestadien in das Kulturmedium über einen Zeitraum von 0 - 12 Tagen. Alle nachfolgenden Konzentrationsangaben beziehen sich auf die Menge an Nucleosiden die 2×10^6 Elaeozyten nach drei Tagen in Kultur abgegeben hatten. Bereits in **Abb. 10** war zu sehen, daß schon die Elaeozyten der I-Tiere signifikante Mengen an Inosin, Guanosin und deren Desoxynucleoside in das Medium abgegeben hatten. Nach 3 Tagen in Kultur waren dies immerhin 0,004 - 0,07 μmol Inosin, 0,0026 - 0,02 μmol Guanosin, 0,006 μmol Desoxyinosin und 0,003 μmol Desoxyguanosin. Es ist zu beachten, daß in **Abb. 12** für die Ordinate ein anderer Maßstab verwendet wird als in **Abb. 10**.

Bei Elaeozyten aus Tieren mit Spermatogonien I stieg die in das Medium abgegebene Menge von Inosin mit 0,14 - 0,26 μmol und von Guanosin mit 0,009 - 0,026 μmol im Vergleich zu den Elaeozyten der I-Tiere deutlich an, während sich die Sekretionsraten der beiden Desoxynucleoside mit 0,005 μmol Desoxyinosin und 0,004 μmol nicht wesentlich verändert hatten. Die Sekretion von Inosin endete in allen beobachteten Fällen spätestens nach 10-12 Kulturtagen; während die Sekretion von Guanosin nach 6 bzw 8 Tagen noch nicht zum Stillstand gekommen war. Die Sekretionsraten der Desoxynucleoside lagen um ein Vielfaches unter den Sekretionsraten von Inosin bzw Guanosin. Die Sekretion kam schon nach kurzer Zeit (1-2 Tage) zum Erliegen. Die Fähigkeit der Elaeozyten von Tieren mit Spermatogonien II zur Abgabe von Nucleosiden wurde nicht untersucht.

Elaeozyten von Tieren die bereits Spermien enthielten sezernierten mit 0,007 - 0,78 μmol Inosin und mit 0,013 - 0,02 μmol Guanosin immer noch relativ große Mengen dieser Nucleoside. Die Sekretionsraten von Desoxyinosin und Desoxyguanosin stiegen im Vergleich zu den Spg I-Stadien sogar sehr stark an; 0,0002 - 0,02 μmol Desoxyinosin und 0,0024 - 0,016 μmol Desoxyguanosin. Manche Sekretionsraten für Desoxynucleoside durch Elaeozyten ausgewachsener Tiere erreichten damit beinahe die Sekretionsraten von Inosin und Guanosin; die Sekretion kam in manchen Fällen auch nach 6 Tagen noch nicht zum Erliegen. Generell fiel auf, daß die Sekretionsraten aller Nucleoside bei männlichen Tieren immer um ein Vielfaches über denen der weiblichen Tiere lagen.

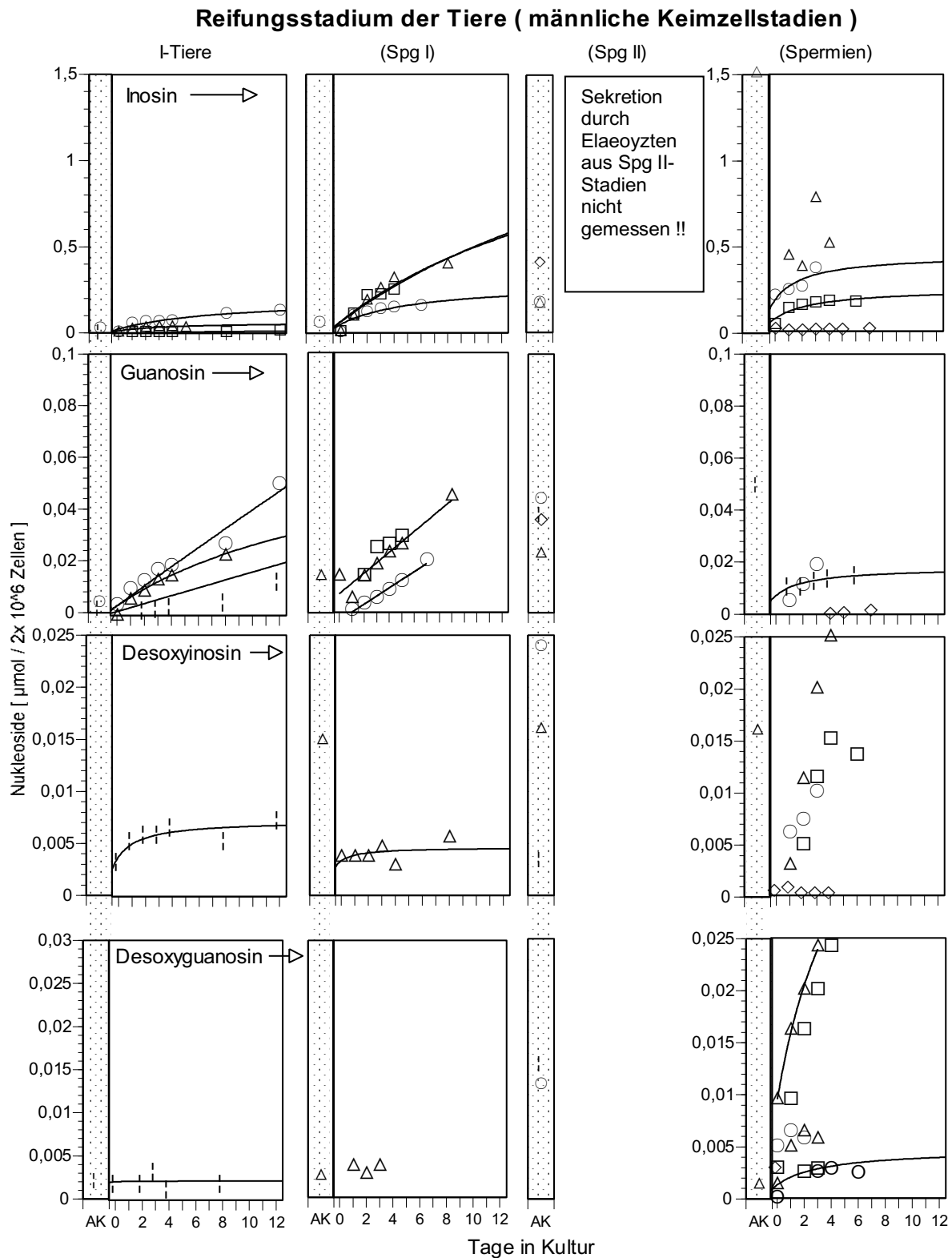


Abb. 12: Anreicherung von Nucleosiden im Kulturmedium von Elaeozyten männlicher *Nereis virens* verschiedener Reifungsstadien (Kulturdauer 0-12 Tage). Nachweis der sezernierten Nucleoside durch HPLC-Messung (Normierung der Meßdaten auf μmol sezerniertes Nucleosid pro 2×10^6 Zellen). Jeweils die erste Spalte eines Diagrammes gibt die durch HPLC bestimmte Anfangskonzentration (Ak) des Nucleosids pro 2×10^6 Zellen an. Für Spg II liegen keine Sekretionsergebnisse vor. Verschiedene Symbole repräsentieren verschiedene Individuen. Ein Teil der Ergebnisse wurde bereits in meiner Diplomarbeit veröffentlicht (Geier, 1992).

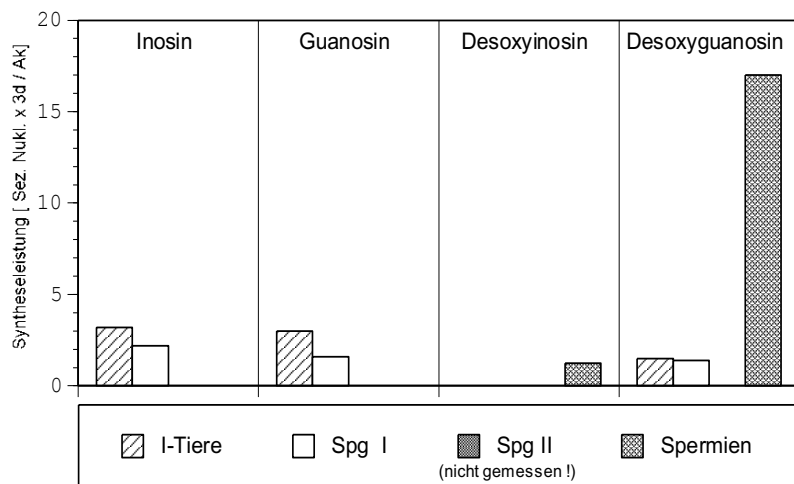


Abb. 13: Sekretions- und Syntheseleistung von Elaeozyten männlicher Tiere verschiedener Reifestadien, angegeben als Quotient aus der nach 3 Tagen in Kultur abgegebenen Nucleosidmenge [$\mu\text{mol}/2 \times 10^6$ Zellen] und dem Anfangskonzentration (AK) an Nucleosiden in den Elaeozyten [$\mu\text{mol}/2 \times 10^6$ Zellen]. Für Spg II liegen keine Ergebnisse vor. Für Inosin bzw Guanosin gilt: MW aus 2 oder 3 Messungen

dar. Bei Desoxyinosin bzw -guanosin liegt jeweils nur 1 Meßwert vor.

In **Abb. 13** wurde jeweils der Quotient aus der nach 3 Tagen in das Kulturmedium sezernierten Nucleosidmenge und der Nucleosidmenge in den Elaeozyten zu Kulturbeginn gebildet. Ansonsten gilt für die Interpretation dieser Abbildung dasselbe wie für **Abb. 11**. Für die Nucleosidsekretion durch Elaeozyten aus I-Tieren wurden diesselben Werte zum Vergleich herangezogen die auch schon in **Abb. 11** zu sehen waren, da man bei I-Tieren noch nicht feststellen kann, ob es sich um ein weibliches oder männliches Tier handelt.

Die **Abb. 13** zeigt deutlich, daß Elaeozyten von I-Tieren und von Tieren mit Spermatogonien 1. Ordnung (Spg I) Inosin und Guanosin synthetisiert haben; die in das Medium abgegebenen Mengen lagen nach 3 Tagen in Kultur etwa das anderthalb- bis dreifache über den Anfangskonzentrationen von Inosin und Guanosin. Elaeozyten fast reifer Tiere (Spermien) ließen dagegen keine Synthese von Inosin und Guanosin mehr erkennen. Bei Elaeozyten von I-Tieren und von Tieren mit Spg I war nur eine Synthese von Desoxyguanosin nachweisbar. Erst bei Elaeozyten ausgewachsener Tiere (Spermien) war sowohl eine Synthese von Desoxyinosin und von Desoxyguanosin zu beobachten; erstaunlicherweise überstieg die im Medium gefundene Konzentration an Desoxyguanosin die Anfangskonzentration in den Zellen um das 16-fache.

2.1.3 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Sekretion von Nucleosiden durch Elaeozyten

Es zeigte sich, dass das Ausmaß der Sekretion von Nucleosiden durch Elaeozyten von *Nereis virens in vitro* vom Geschlecht und vom Reifestadium der Tiere abhängt. Die Sekretionsraten der Elaeozyten männlicher Tiere lagen teilweise um ein Vielfaches über denen der weiblichen Tiere. Elaeozyten junger weiblicher Tiere reicherten bereits zu Beginn der Geschlechtsreifung, dh noch vor dem Eintritt der Oozyten in die schnelle Wachstumsphase, große Mengen an Nucleosiden im Medium an; die Sekretionsraten lagen teilweise sogar etwas über denjenigen der I-Tiere. Die im Medium nach 3 Tagen gefundenen Mengen von Inosin und Guanosin lagen dabei immer deutlich über denen für Desoxyinosin bzw -guanosin. Die Sekretion durch Elaeozyten junger weiblicher Tiere (Oozytendurchmesser 35-70 μm) kam in den meisten Fällen mit Ausnahme der Sekretion von Guanosin nach etwa 4-12 Kulturtagen zum Stillstand.

Während der schnellen Wachstumsphase nahm die Fähigkeit der Elaeozyten größere Mengen an Nukleosiden im Medium anzureichern stark ab, die Sekretion von Nukleosiden kam in diesem Reifestadium bereits nach 3-4 Tagen zum Erliegen. Bei Elaeozyten von ausgewachsenen Weibchen verblieben die im Medium gefundenen Nukleosidmengen auf einem niedrigen Niveau; die Elaeozyten waren nachweislich zur Synthese von Inosin, Guanosin und Desoxyinosin in der Lage.

Bei Elaeozyten von männlichen Tieren mit Spermatogonien I stieg die in das Medium abgegebene Menge von Inosin und Guanosin im Vergleich zu den Elaeozytenkulturen der I-Tiere ebenfalls an, ansonsten blieben die Sekretionsraten dieser Nukleoside bis zum Ende der Geschlechtsreifung etwa auf dem gleichen Niveau. Ein Nachweis der Synthese von Inosin und Guanosin war nur bei frühen Keimzellstadien (Spg I) möglich. Die nach 3 Tagen im Medium gefundenen Mengen von Inosin und Guanosin lagen auch bei den männlichen Tieren immer um ein Vielfaches über denen für Desoxyinosin bzw -guanosen. Erst die Elaeozyten ausgewachsener Tiere begannen damit deutlich größere Mengen an Desoxynukleosiden im Medium anzureichern, gleichzeitig konnte eine Synthese dieser Desoxynukleoside beobachtet werden. Die Sekretion von Inosin kam in allen beobachteten Reifestadien nach etwa 6-12 Kulturtagen zum Erliegen; während die Sekretion von Guanosin und Desoxyguanosen bzw -inosin in manchen Stadien auch nach 6 bzw 8 Tagen noch in vollem Gange war.

2.2 Aufnahme von Nucleosiden durch Keimzellen von *Nereis virens*

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Elaeozyten Nucleoside geschlechts- und reifestadienspezifisch sezernieren, stellte sich die Frage, ob die Nucleoside in der Cölomflüssigkeit vielleicht für die Entwicklung der Keimzellen notwendig sind. Deshalb wurde die Fähigkeit der Keimzellen beiderlei Geschlechts von *Nereis virens* zur Aufnahme von Inosin bzw. Guanosin untersucht. Hierzu wurden isolierte weibliche bzw. männliche Keimzellen verschiedener Reifungsstadien von *Nereis virens* in einem Kulturmedium inkubiert, das neben nicht markiertem auch ^{14}C -markiertes Inosin oder ^{14}C -Guanosin enthält. Die Aufnahme dieser Nucleoside durch die Keimzellen wurde entweder in Abhängigkeit von der Nucleosidkonzentration (Inkubationsdauer meist 3 h) oder bei einer festen Nucleosidkonzentration (100 μM Inosin bzw. Guanosin) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit gemessen.

2.2.1 Aufnahmekinetik für Inosin bzw. Guanosin bei mittelgroßen Oozyten

Die **Abb. 14** zeigt, dass mittelreife Oozyten exogen angebotenes Inosin aufnehmen konnten; man sieht, dass die Aufnahme in Abhängigkeit von der Substratkonzentration durch Oozyten zweier Tiere sättigbar war und einer Michaelis-Menten Kinetik entsprach. Dementsprechend konnten für die Aufnahme die kinetischen Parameter K_m und V_{max} bestimmt werden ($K_m = 42$ bzw. $68 \mu\text{M}$; $V_{max} = 144$ bzw. $220 \text{ fmol} / \text{Oozyte} \times 1 \text{ h}$). Die lineare Darstellung der Ergebnisse im Hanes-Plot wies mit $r^2 = 0,973$ bzw. $0,992$ gute bis sehr gute Korrelationskoeffizienten auf.

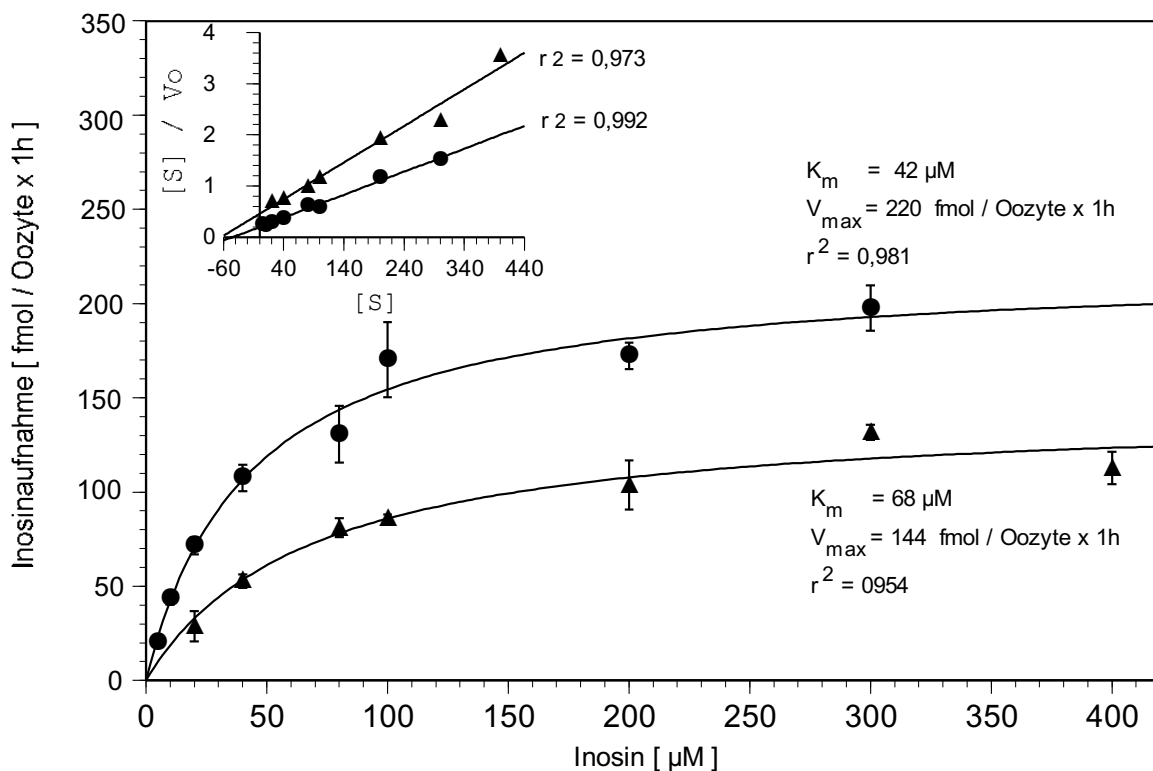


Abb. 14: Konzentrationsabhängige Aufnahme von ^{14}C -Inosin durch mittelgroße Oozyten (140 μm \varnothing ; September) zweier Tiere von *Nereis virens*; das eingeschobene Diagramm zeigt eine linearisierte Darstellung der Ergebnisse im Hanes-Plot (Dreifachbestimmung je Meßwert).

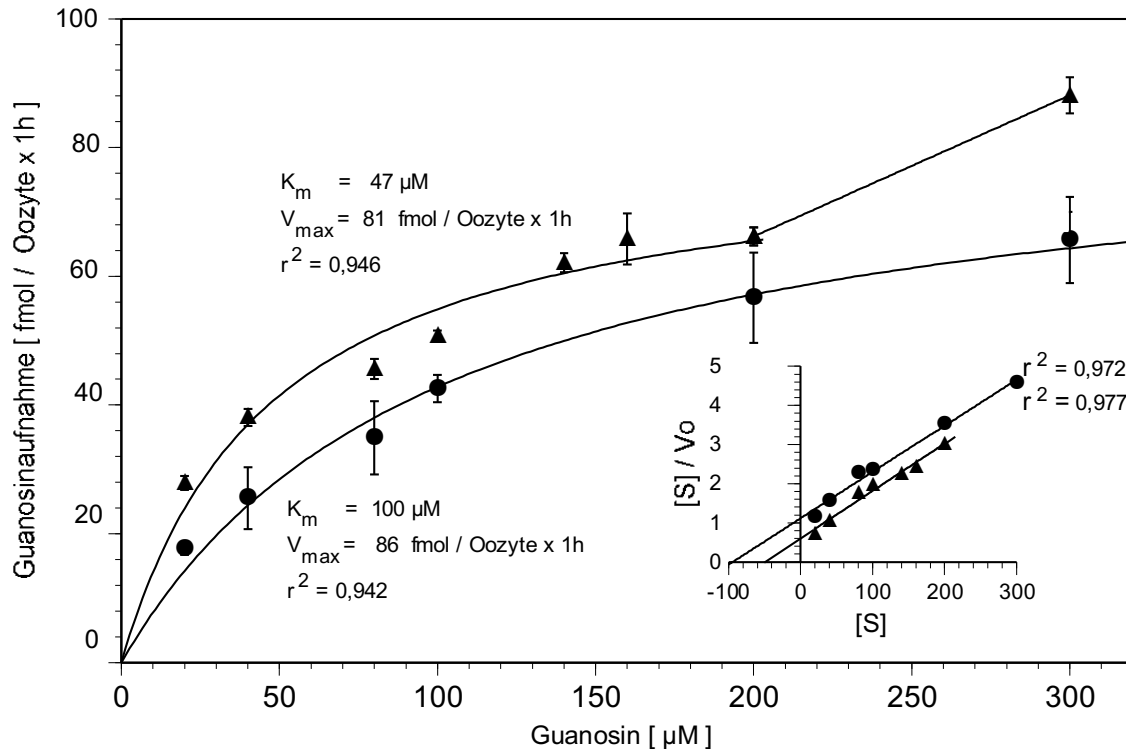


Abb. 15: Konzentrationsabhängige Aufnahme von ^{14}C -Guanosin durch mittelgroße Oozyten ($140 \mu\text{m} \varnothing$; September) zweier Tiere von *Nereis virens*; das eingeschobene Diagramm zeigt eine linearisierte Darstellung der Ergebnisse im Hanes-Plot (Dreifachbestimmung je Meßwert).

In der **Abb. 15** sieht man, dass mittelreife Oozyten zweier verschiedener Tiere von *Nereis virens* auch Guanosin aus dem Medium aufgenommen haben. Die Aufnahme von Guanosin durch die Oozyten des einen Tieres war bis zu einem Angebot von $300 \mu\text{M}$ sättigbar und entsprach ebenfalls einer Michaelis-Menten Kinetik. Die Aufnahme erreichte mit $V_{\text{max}} = 86 \text{ fmol/Oozyten} \times 1\text{h}$ ihre maximale Geschwindigkeit; die halbmaximale Aufnahmegeschwindigkeit wurde bei $K_m = 100 \mu\text{M}$ Guanosin erreicht. Die Aufnahme durch Oozyten des zweiten Tieres war dagegen nur bis zu einem Angebot von $200 \mu\text{M}$ Guanosin sättigbar und nahm darüber erstaunlicherweise wieder stark zu. Deshalb wurden die kinetischen Parameter in diesem Fall nur für die Aufnahme bis zu einem Angebot von $200 \mu\text{M}$ Guanosin berechnet. Für V_{max} erhielt man somit $V_{\text{max}} = 81 \text{ fmol / Oocyte} \times 1\text{h}$ und $K_m = 47 \mu\text{M}$). Die maximalen Aufnahmegeschwindigkeiten für Guanosin lagen in beiden Fällen deutlich unter denen für Inosin.

2.2.2 Aufnahme von Nucleosiden in Abhängigkeit von der Zeit durch Oozyten

Die Aufnahme von ^{14}C -Inosin oder ^{14}C -Guanosin durch Oozyten verschiedener Reifungsstadien blieb in allen Fällen über einen Zeitraum von 6 h gleich (siehe **Abb. 16 je a-d**). Da die Inkubationen bei konstantem Angebot von $100 \mu\text{M}$ erfolgten kann der Zeitpunkt angegeben werden an dem die aufgenommene Nucleosidkonzentration in den Zellen der Angebotskonzentration im Medium entspricht.

1.7

Aus früherer Untersuchung ist bekannt, dass die Oozyten innerhalb der letzten 13 Monate der Entwicklung ca. 1600 - 5000 $\mu\text{mol/l}$ ZV Inosin und ca 100 - 1300 $\mu\text{mol/l}$ ZV Guanosenin enthalten (Rebscher, 1994). Man kann also davon ausgehen, dass die Nucleosid-Konzentrationen in den Eizellen bereits vor Inkubationsbeginn um ein Vielfaches über der Angebotskonzentration von 100 μM Inosin bzw. Guanosenin im Medium lag.

In der **Abb. 16 a - d.** sieht man, dass die aufgenommene Inosin- bzw. Guanoseninkonzentration bereits nach 1-2 h der Angebotskonzentration im Medium entsprach. Bei ausgewachsenen Oozyten entsprach die aufgenommene Inosin- bzw. Guanoseninkonzentration dagegen erst nach 4 h der Angebotskonzentration (**Abb. 16 d.**). Die nach 6 h aufgenommene Nucleosidkonzentration überstieg die Angebotskonzentration in allen untersuchten Reifungsstadien mindestens um das Zweifache. Die Ergebnisse in **Abb. 16 a.-d.** zeigen somit auch, dass die Oozyten Inosin und Guanosenin zusätzlich zu den hohen Anfangsgehalten anreichern konnten.

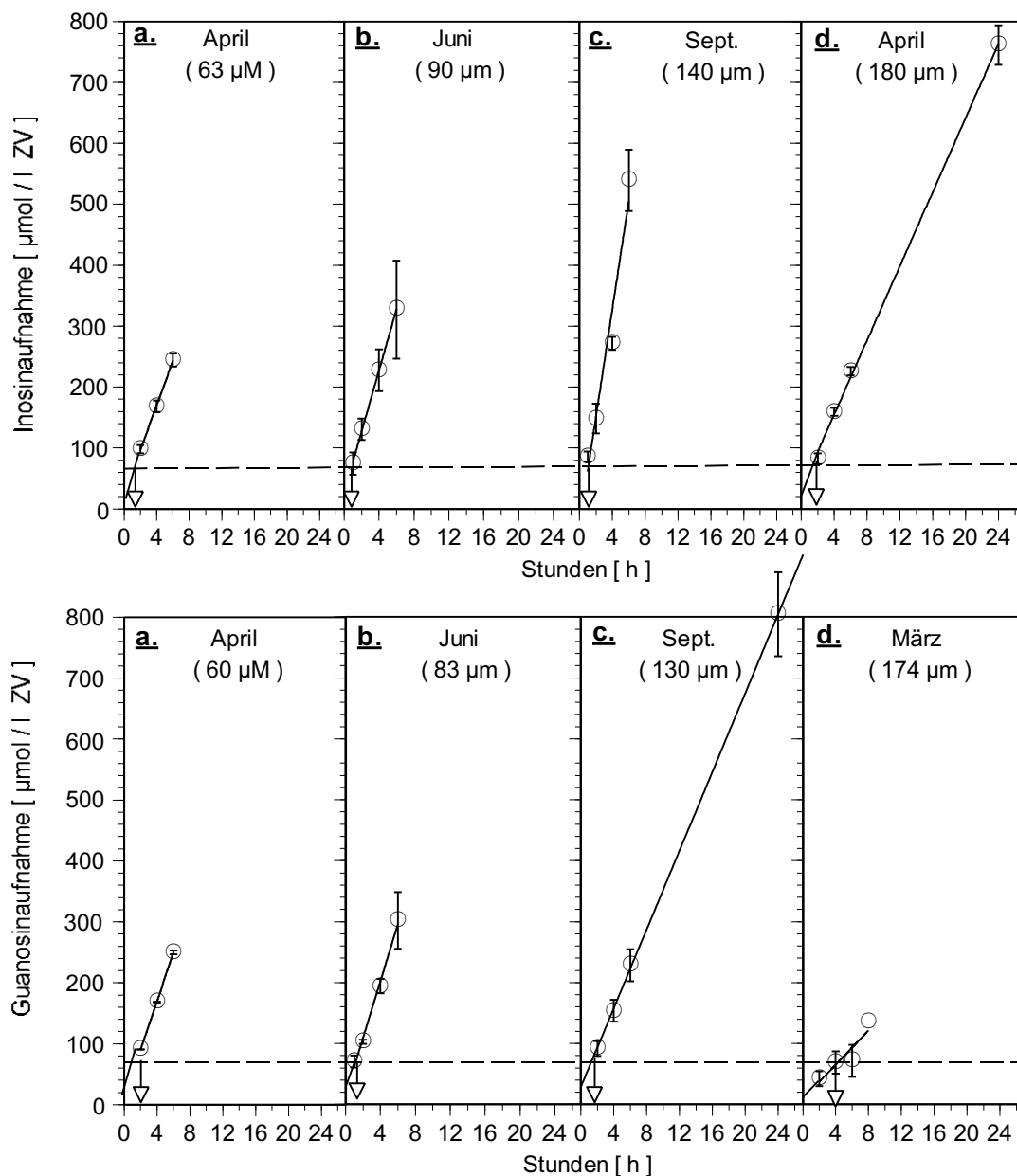


Abb. 16 (a. - d.): Aufnahme von ^{14}C -Inosin bzw. Guanosenin in Abhängigkeit von der Zeit durch Oozyten verschiedener Größen von *Nereis virens*. Nucleosidkonzentration im Medium

1.7

jeweils 100 μM ; die Pfeile geben die Zeit an nach der die aufgenommene Nucleosidkonzentration der Angebotskonzentration im Medium (gestrichelte Line) entspricht (Vierfachbestimmung je Meßwert). Hierbei wurde berücksichtigt, dass der Anteil der Zellflüssigkeit (Cytosol, Cytoplasma) am Volumen der Oozyten aller Reifungsstadien nach Mahlein (1996) nur 62 % beträgt. Jeder Meßreihe liegen Messungen an Oozyten eines Tieres zugrunde.

2.2.3 Konzentrationsabhängige Aufnahme von Nucleosiden durch Oozyten

Schon die Aufnahme von Nucleosiden durch Oozyten in Abhängigkeit von der Zeit hatte gezeigt, dass sich die Aufnahmeraten bei Oozyten verschiedener Reifungsstadien unterscheiden (siehe **Abb. 16 a-d**). Im Folgenden soll deshalb die konzentrationsabhängige Aufnahme von Nucleosiden genauer untersucht werden. Hierzu wurde die Aufnahme von ^{14}C -Inosin bzw. Guanosin in Abhängigkeit von der Substratkonzentration über einen Zeitraum von 3 oder 5 h gemessen. Bereits in **Abb. 16 a.-d.** war zu sehen, dass die Oozyten aller untersuchten Reifungsstadien Nucleoside innerhalb dieses Zeitraumes und oft auch weit darüber hinaus mit gleichbleibender Rate aufgenommen haben, dies ist Voraussetzung dafür, dass man die konzentrationsabhängigen Aufnahmekinetiken verschiedener Reifungsstadien miteinander vergleichen kann. War die konzentrationsabhängige Aufnahme sättigbar, so konnten die Parameter K_m und V_{\max} einer Michelis-Menten Kinetik berechnet werden. Für eine Aufnahme die nicht-sättigbar war konnte nur die Diffusionsgeschwindigkeit V_{diff} angegeben werden.

Die **17 (a.-f.)** zeigt die konzentrationsabhängige Aufnahme von **Inosin** durch Oozyten verschiedener Reifungsstadien. Auf den ersten Blick fällt auf, dass die jungen Oozyten mit einem Durchmesser bis zu 115 μm (**Abb. 17 a.+ b.**), im Vergleich zu den späteren Stadien nur sehr wenig Inosin aufgenommen haben. Kurze Zeit nach dem Eintritt der Oozyten in die schnelle Wachstumsphase, im September, erhöhte sich die Aufnahme im Vergleich zu den Oozyten vom Juli bei gleichem Substratangebot um das sechs- bis siebenfache (**Abb. 17 c.**). Im weiteren Verlauf der schnellen Wachstumsphase, im Oktober, blieb die Aufnahme unverändert hoch in zwei Fällen war sie sogar nochmals angestiegen (siehe **Abb. 17 d.**). Gegen Ende der schnellen Wachstumsphase, im November bzw. Dezember, war bereits eine deutlich geringere Aufnahme zu verzeichnen (**Abb 17 e.**). Die Aufnahme durch Oozyten aus Novembertieren war in zwei Fällen vergleichsweise sehr gering und nicht mehr sättigbar; daher konnte nur V_{diff} angegeben werden. Die Aufnahme durch Oozyten des anderen Novembertieres und der Dezembertiere war dagegen noch sättigbar die K_m -Werte streuten allerdings stärker als dies sonst der Fall war. Bei fast reifen Oozyten war die Aufnahme in zwei Fällen nicht mehr sättigbar (**Abb 17 f.**), deshalb konnten ebenfalls nur V_{diff} -Werte angegeben werden. Die Aufnahme durch Oozyten eines Märztieres war dagegen noch sättigbar, der V_{\max} Wert war sogar vergleichsweise hoch. In einem anderen Fall zeigte die Aufnahme durch fast ausgewachsene Oozyten einen deutlich biphasischen Verlauf: Bis zu einem Angebot von 80 μM Inosin war die Aufnahme sättigbar, darüber ging sie in eine nicht-sättigbare Aufnahme über. Die K_m -Werte für die Aufnahme von ^{14}C -Inosin lagen bei allen untersuchten Reifungsstadien, mit Ausnahme der Oozyten im Dezember, im Mittel bei etwa 65 μM .

Die **Abb. 18 (a.-f)**. zeigt die konzentrationsabhängige Aufnahme von Guanodin durch Oozyten verschiedener Reifungsstadien. Junge Oozyten bis zu einem Durchmesser von etwa 115 μM nahmen nur sehr geringe Mengen Guanodin auf (siehe **Abb 18 a.-b.**). Die Werte für V_{max} waren dementsprechend gering; die K_m -Werte streuten ziemlich stark. Bei Oozyten von zwei Tieren vom Juli hatte sich die Aufnahme noch nicht wesentlich erhöht, nur bei einem Tier vom Juni war eine deutlich höhere Aufnahme zu beobachten (**Abb. 18 c.**). Es fällt auf, dass man in manchen Tieren auch im Zeitraum von September bis Oktober noch relativ kleine Oozyten finden kann (siehe **Abb. 18 b.**). Bei anderen Tieren desselben Zeitraumes (siehe **Abb. 18 d.**) waren die Oozyten dagegen schon in die schnelle Wachstumsphase eingetreten und es war es zu einer stark erhöhten Aufnahme von Guanodin gekommen. Die Aufnahme hatte sich im Vergleich zu den nur 20 μm kleineren Oozyten desselben Monats (**Abb. 18 b.**) im Mittel um etwa das sechs bis siebenfache erhöht. Die Werte für K_m streuten bei diesen Oozyten nicht mehr ganz so stark. Das Bild wandelte sich sobald die Oozyten im November das Ende der schnellen Wachstumsphase erreicht hatten (**18. e.**); die Aufnahme hatte sich nämlich wieder drastisch reduziert; die Werte für K_m veränderten sich nicht. Kurze Zeit später im Dezember (siehe **Abb. 18 e.**) stieg die Aufnahmerate erstaunlicherweise wieder stark an. Allerdings hatte sich zu diesem Zeitpunkt auch die Aufnahmecharakteristik stark verändert; die K_m -Werte waren so hoch wie zu keinem Zeitpunkt zuvor. Bei fast reifen Oozyten (**18. f.**) war die Aufnahme von Guanodin schließlich nicht mehr sättigbar so dass nur V_{diff} -Werte angegeben werden konnten. Im Verlauf des Oozytenwachstums fiel auf, dass die K_m -Werte für die Aufnahme von ^{14}C -Guanodin insgesamt sehr stark streuten; im Mittel lagen sie mit etwa 160 μM deutlich über den K_m -Werten der Inosinaufnahme. Die mit Abstand höchsten K_m -Werte wurden bei Oozyten im Dezember gefunden.

Es hat sich also gezeigt, dass die Aufnahme von Inosin bzw. Guanodin durch Oozyten von *Nereis virens* im starken Maße vom Reifestadium der Oozyten abhängig ist. Junge Oozyten bis zu einem Durchmesser von etwa 110 μM nahmen Inosin bzw. Guanodin nur in geringem Maß auf. Kurz nach dem Eintritt der Oozyten in die schnelle Wachstumsphase (etwa ab einem Durchmesser von 120 μM) kam es zu einem dramatischen Anstieg der Aufnahmeraten um das sechs bis siebenfache. Diese hohen Aufnahmeraten hielten an bis die Oozyten einen Durchmesser von ca. 150 μM erreicht hatten, dies entspricht einem Zeitraum von etwa zwei Monaten. Gegen Ende der schnellen Wachstumsphase (ab einem Durchmesser von ca. 150 μm) war nur in manchen Fällen eine reduzierte Aufnahme zu beobachten. Fast reife Oozyten waren durchaus noch in der Lage größere Mengen Inosin bzw. Guanodin aufzunehmen, jedoch hatte sich die Aufnahmecharakteristik teilweise stark verändert, die Aufnahme war in vielen Fällen nämlich nicht mehr sättigbar.

2.2.4 K_m -Werte für die Aufnahme von Inosin bzw. Guanodin durch Oozyten

In der **Abb. 19 (a. + b.)** sind die K_m -Werte für die Aufnahme von Inosin bzw. Guanodin durch Keimzellen aufgetragen. Diese K_m -Werte resultieren aus Messungen der Inosin bzw. Guanodinaufnahme im Verlauf der letzten zwölf Monate der Keimzellentwicklung (siehe **Abb. 17 a-f** und **Abb. 18. a-f**). Man sieht, dass sich die K_m -Werte für die Aufnahme von Inosin bis zum Ende der schnellen Wachstumsphase ganz überwiegend in einem relativ engen Bereich zwischen 50 und 100 μM bewegen (**Abb. 19 a.**). Auch während der schnellen Wachstumsphase, in der die Oozyte besonders dramatische Veränderung ihres Metabolismus erfährt, änderte sich der K_m -Wert nicht wesentlich. Erst gegen Ende der schnellen

1.7

Wachstumsphase und bei den fast reifen Oozyten gab es K_m -Werte weit über 50 - 100 μM Inosin. Bei den fast reifen Oozyten (180 - 200 μm Durchmesser) konnte in den meisten Fällen kein Wert für K_m mehr berechnet werden, da die Aufnahme nicht mehr sättigbar war. Die K_m -Werte lagen während des gesamten Zeitraumes des Oozytenwachstums immer deutlich über den in der Cölomflüssigkeit vorhandenen Konzentrationen an Inosin (Konzentration in der Cölomflüssigkeit < 20 μM), das Inosinangebot vermag also das Niveau der Halbsättigung des Aufnahmesystems nicht zu erreichen.

Die K_m -Werte für die Aufnahme von Guanosin streuten bei Oozyten eines Reifungsstadiums und auch bis zum Ende der schnellen Wachstumsphase im Vergleich zur Inosinaufnahme viel stärker ($K_m = 20$ bis 300 μM) (**Abb. 19 b**). Oozyten am Ende der schnellen Wachstumsphase wiesen sogar noch höhere K_m -Werte auf. Die K_m -Werte lagen aber dennoch alle um ein Vielfaches über dem Guanosinangebot in der Cölomflüssigkeit (1-10 μM); dies bedeutet, dass das Aufnahmesystem immer weit von einer Halbsättigung mit Guanosin entfernt war. Bei den fast reifen Oozyten war in keinem Fall eine Bestimmung des K_m -Wertes mehr möglich, da die Aufnahme nicht-sättigbar war.

1.7

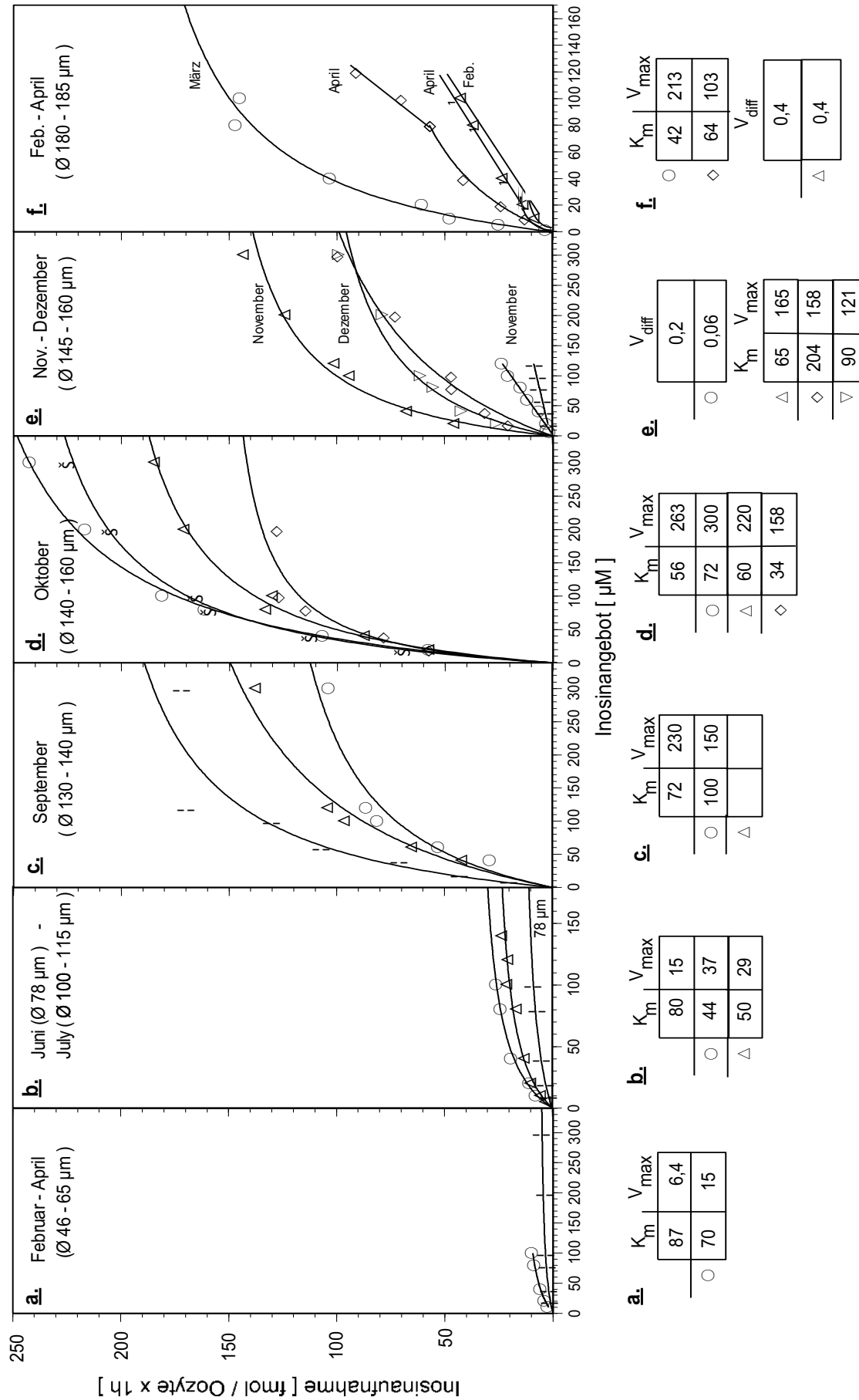


Abb. 17: Konzentrationsabhängige Aufnahme von ^{14}C -Inosin durch Oozyten verschiedener Reifungsstadien (a - f). Unterhalb der Diagramme sind jeweils die entsprechenden Werte für K_m und V_{max} bzw. für V_{diff} angegeben.

1.7

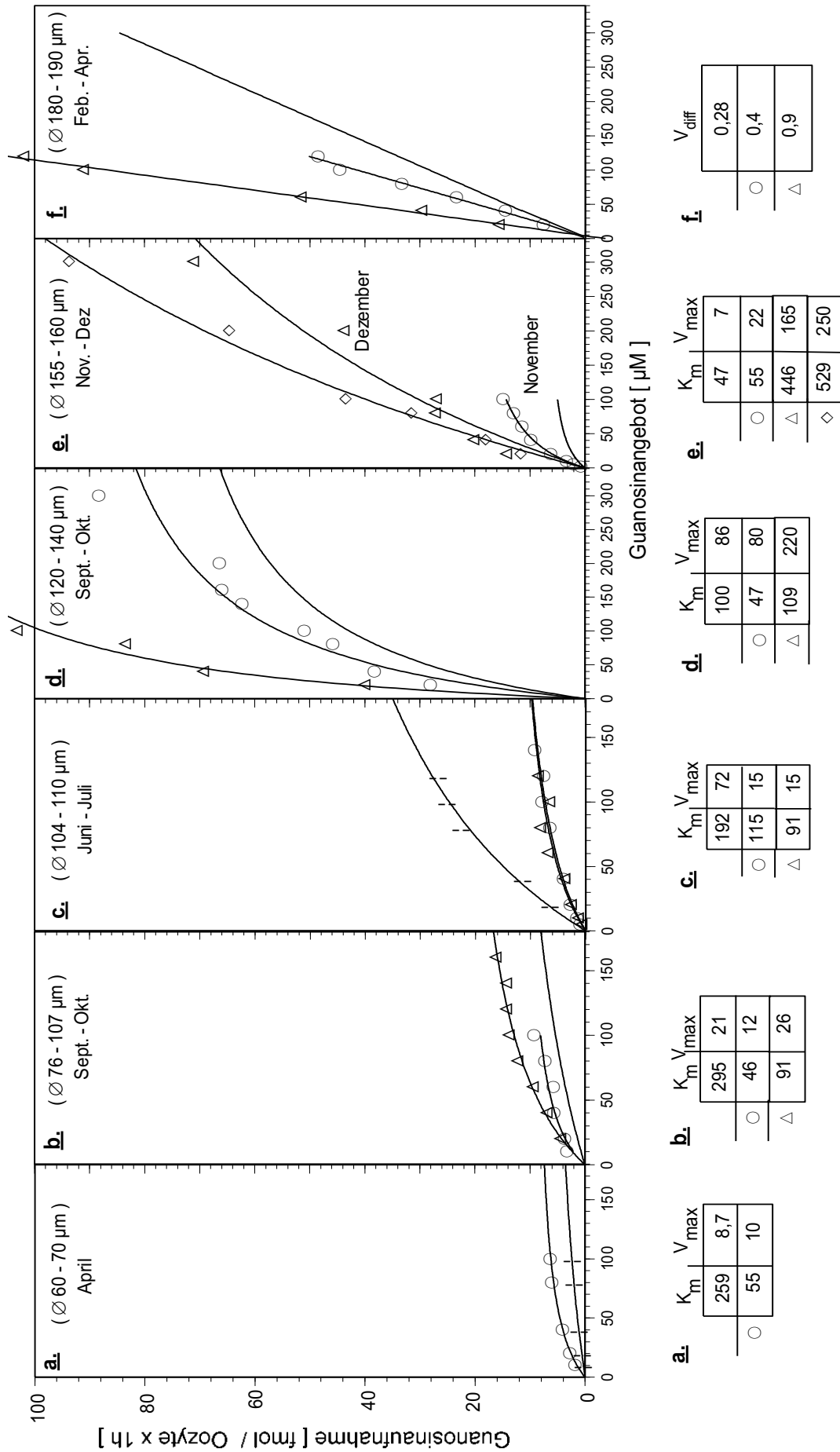


Abb. 18: Konzentrationsabhängige Aufnahme von ¹⁴C-Guanosin durch Oozyten verschiedener Reifungsstadien (**a. - f.**). Unterhalb der Diagramme sind jeweils die entsprechenden Werte für K_m und V_{max} bzw. für V_{diff} angegeben. Beachte, dass es im Zeitraum September - Oktober Tiere mit relativ kleinen Oozyten (Durchmesser 76-107 μm) gibt während andere Tiere desselben Zeitraums bereits Oozyten mit einem Durchmesser von 120 - 140 μm aufwiesen (siehe **Abb. b.** und **Abb. d.**).

1.7

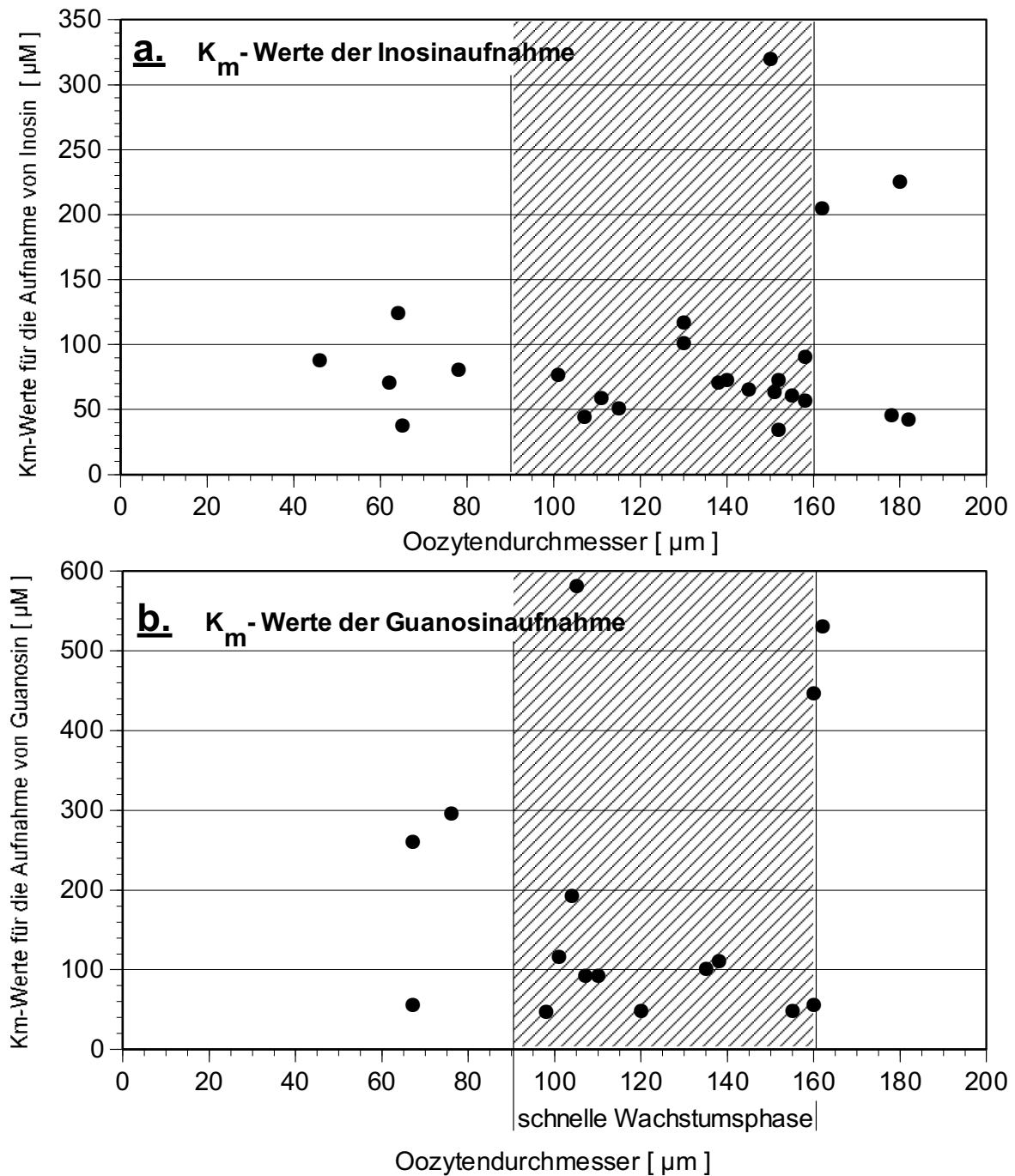


Abb. 19 (a. + b.): Darstellung der K_m -Werte für die Aufnahme von Inosin bzw. Guanosin durch Oozyten unterschiedlicher Größen, während der letzten zwölf Monate der Keimzellentwicklung von *Nereis virens*. Jedes Symbol repräsentiert die Aufnahme von Nucleosiden durch Oozyten eines Tieres.

2.2.5 Aufnahmeraten von Nucleosiden in Abhängigkeit vom Oozytendurchmesser

In der **Abb. 20 (a.+b.)** ist die Aufnahme von Inosin bzw. Guanosin durch Oozyten von *Nereis virens* **pro Oberflächeneinheit** in Abhängigkeit vom Oozytendurchmesser bei einer Angebotskonzentration von 20 μM dargestellt. Die Angebotskonzentration von 20 μM wurde gewählt, weil sie der physiologischen Konzentration in der Cölomflüssigkeit am nächsten kommt.

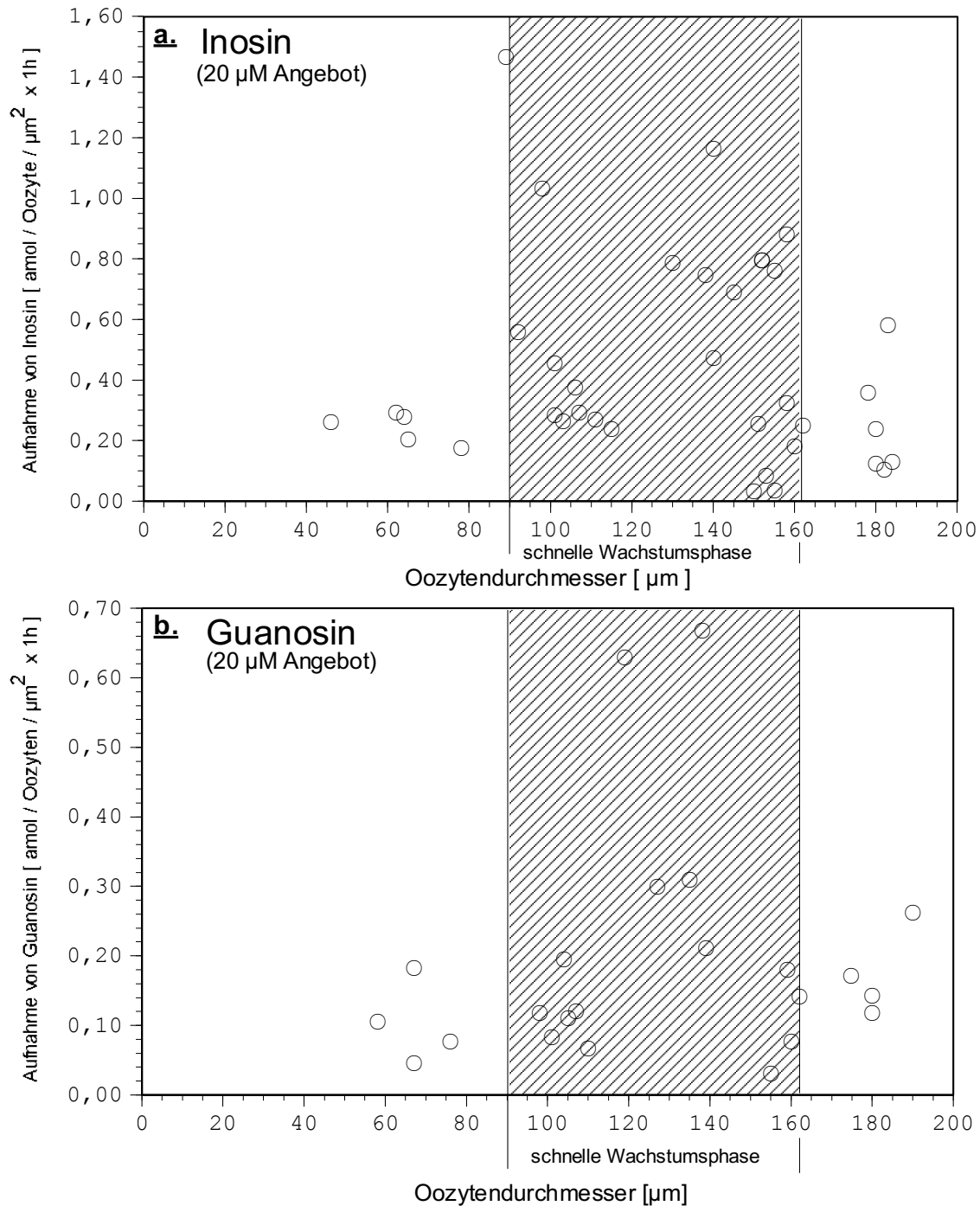


Abb. 20 (a.+b.): Aufnahme von ^{14}C -Inosin (a.) bzw. Guanosin (b.) durch Oozyten von *Nereis virens* **pro Oberflächeneinheit** in Abhängigkeit vom Oozytendurchmesser. Nucleosidkonzentration im Medium: 20 μM . Der grau unterlegte Bereich kennzeichnet die

1.7

schnelle Wachstumsphase der Oozyten. Jedes Symbol repräsentiert die Aufnahme von Nucleosiden durch Oozyten eines Tieres.

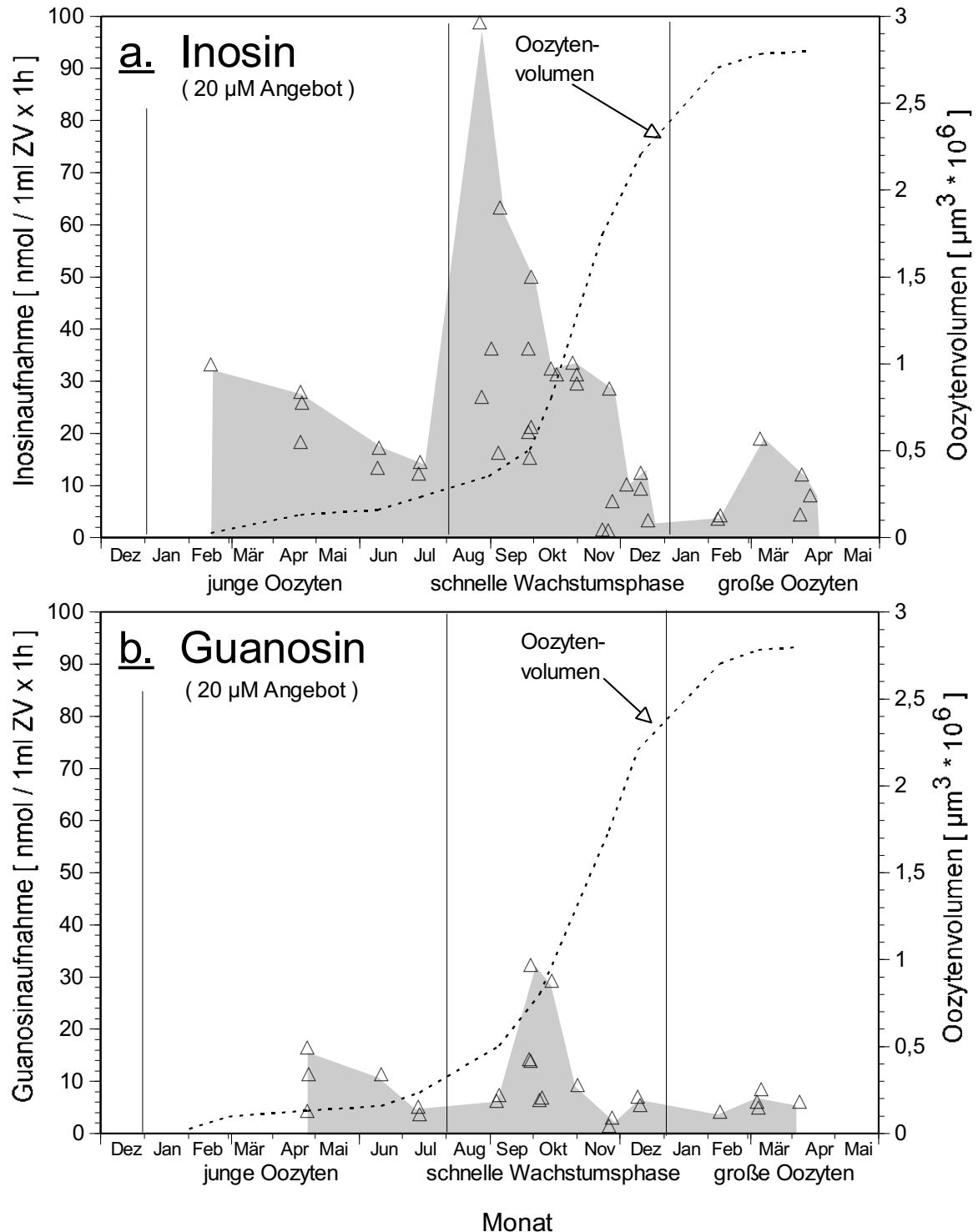


Abb. 21 (a.+b.): Aufnahme von ^{14}C -Inosin (a.) bzw. Guanosen (b.) durch Oozyten von *Nereis virens* während der letzten fünfzehn Monate der Geschlechtsreifung. Nucleosidkonzentration im Medium: 20 μM . Der grau unterlegte Bereich gibt die maximalen Aufnahmezeiten an; die gestrichelte Linie markiert die Zunahme des Oozytenvolumens im Verlauf des

Oozytenwachstums. Jedes Symbol repräsentiert die Aufnahme von Nucleosiden durch Oozyten eines Tieres.

Man sieht **Abb. 20 a**, dass die Aufnahme **pro Oberflächeneinheit** von Inosin pro Oozyte in der schnellen Wachstumsphase (Oozytendurchmesser 90-160 μm) im Vergleich zur Aufnahme durch junge Oozyten (Durchmesser bis 75 μm) stark zugenommen hatte. Dabei streuen die Werte, vor allem zu Beginn der schnellen Wachstumsphase, sehr stark; bei Oozyten einer Gruppe unterschiedlicher Tiere lag die Aufnahmerate nur wenig über derjenigen jungen Oozyten. Etwa ab einem Oozytendurchmesser von 130 μm war eine stetige Verringerung der Inosinaufnahme pro Oberflächeneinheit zu beobachten. Für die Aufnahme von Guanosin **pro Oberflächeneinheit** in Abhängigkeit vom Oozytendurchmesser ergab sich ein ähnliches Bild (siehe **Abb. 20 b.**); im Verlauf der schnellen Wachstumsphase war bei zwei Tieren ein leichter und zwei anderen Tieren ein deutlicher Anstieg der Aufnahme zu beobachten. Bei ausgewachsenen Oozyten (Durchmesser über 160 μm) ging die Aufnahme auf das Niveau der Aufnahme bei jungen Tieren zurück.

Die **Abb. 21 (a.+b)** zeigt daher noch einmal die in **Abb. 20** enthaltenen Daten in einer Projektion auf ein **Einheits-Oozytenvolumen**. Anhand dieser Darstellung werden die Veränderungen der absoluten Nucleosidaufnahme pro Einheitsvolumen im Verlauf der Oozytenreifung deutlicher. Man sieht, dass bereits ganz junge Oozyten vom Februar und April vergleichsweise hohe Mengen an Inosin bzw. Guanosin aufgenommen haben (Inosin: 20 - 35 nmol/ml ZV; Guanosin: 4 - 20 nmol/ml ZV). Im weiteren Verlauf des Oozytenwachstums bis zum Juli gingen die Einbauraten dieser beiden Nucleoside wieder stark zurück. Mit dem Eintritt der Oozyten in die schnelle Wachstumsphase kam es zu einem starken Anstieg der Nucleosid-Aufnahme. Die **Abb. 21 a.+b.** zeigt auch, dass die Aufnahme von Inosin bzw. Guanosin gegen Ende der schnellen Wachstumsphase (November - Januar) wiederum stark abgenommen hatte (Inosin: 2 - 10 nmol / ml ZV; Guanosin: 2 - 6 nmol/ml ZV). Bei den ausgewachsenen Oozyten war es schließlich wieder zu einem leichten Anstieg vor allem der Inosinaufnahme gekommen (Inosin: 4-20 nmol/ml ZV; Guanosin: 4-8 nmol/ml ZV).

2.2.6 Aufnahmekinetik für Inosin bzw. Guanosin bei Spermatogonien II

Die **Abb. 22** zeigt, dass die Spermatogonien II. (Spg II) von *Nereis virens* ebenfalls exogen angebotenes Inosin aufnehmen können. Die Aufnahme von Inosin in Abhängigkeit von der Substratkonzentration durch Spg II zweier Tiere war sättigbar und ließ sich sehr gut mit einer Michaelis-Menten Kinetik beschreiben. Die Bestimmung der kinetischen Parameter K_m und V_{max} ergab folgende Werte : $K_m = 60$ bzw. $380 \mu\text{M}$; $V_{max} = 14$ bzw. $15 \text{ nmol} / 100 \mu\text{l ZV} \times 1\text{h}$. Man sieht, dass sich die K_m -Werte der beiden dargestellten Kinetiken sehr stark unterscheiden, obwohl es sich in beiden Fällen um Keimzellen des gleichen Reifestadium handelte. Die lineare Darstellung der Ergebnisse im Hanes-Plot wies recht gute Korrelationskoeffizienten von $r^2 \geq 0,981$ auf.

1.7

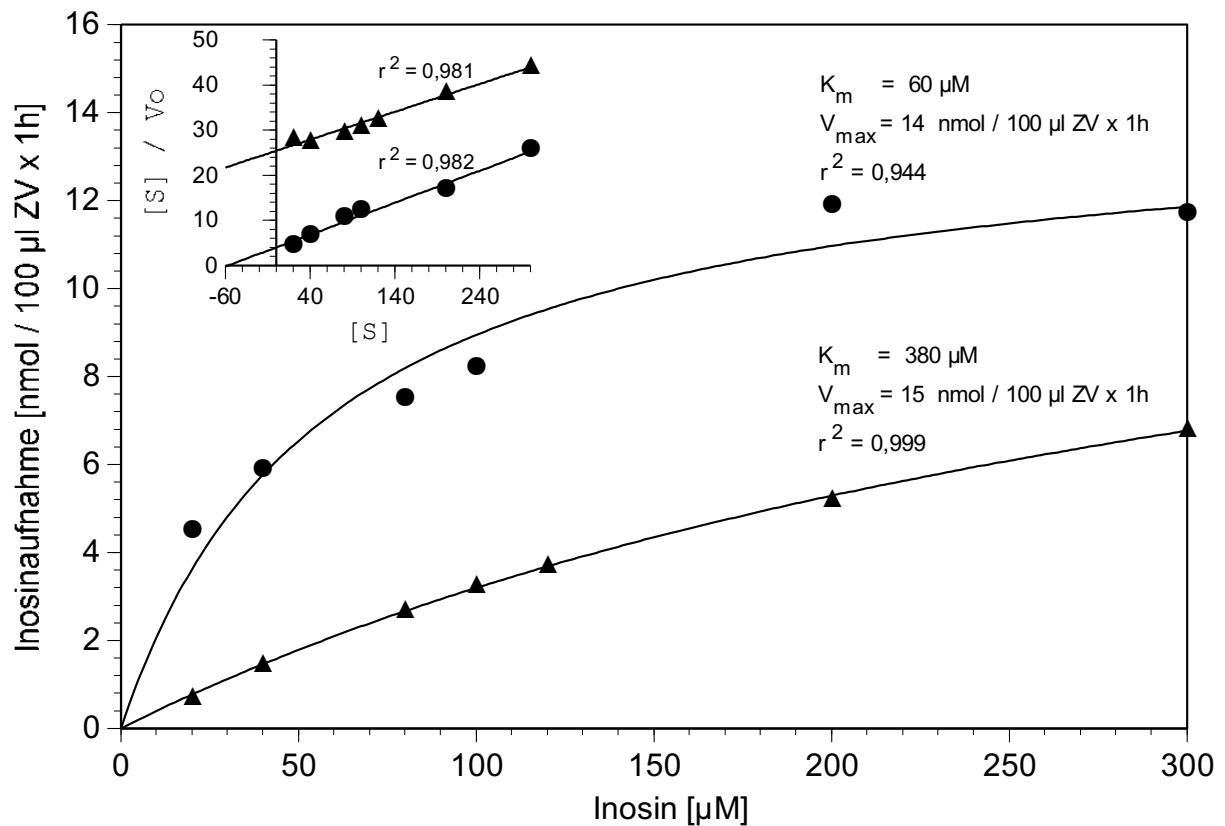


Abb. 22: Konzentrationsabhängige Aufnahme von Inosin durch Spermatogonien 2. Ordnung (Spg II zweier Tiere von *Nereis virens* vom Oktober); das eingeschobene Diagramm zeigt eine linearisierte Darstellung der Ergebnisse im Hanes-Plot (Zweifachbestimmung je Meßwert).

In der **Abb. 23** sieht man, dass die Spermatogonien zweier verschiedener Tiere von *Nereis virens* auch Guanosin aus dem Medium aufgenommen haben. Die Aufnahme von Guanosin durch die Spermatogonien des einen Tieres war sättigbar; dementsprechend konnte eine Michaelis-Menten Kinetik berechnet werden. Die Aufnahme erreichte bei $V_{\text{max}} = 6,9 \text{ nmol}/100 \mu\text{l ZV} \times 1\text{h}$ ihre maximale Geschwindigkeit; die halbmaximale Aufnahmerate wurde bei $K_m = 100 \mu\text{M}$ Guanosin erreicht. Die Aufnahme durch Oozyten des zweiten Tieres war nur bis zu einem Angebot von $200 \mu\text{M}$ Guanosin sättigbar und nahm darüber erstaunlicherweise wieder stark zu. Deshalb wurden die kinetischen Parameter in diesem Fall nur für die Aufnahme bis zu einem Angebot von $200 \mu\text{M}$ Guanosin berechnet. Für V_{max} erhielt man somit $V_{\text{max}} = 2,4 \text{ nmol}/100 \mu\text{l ZV} \times 1\text{h}$ und $K_m = 50 \mu\text{M}$). Die maximalen Aufnahmegeschwindigkeiten für Guanosin lagen in beiden Fällen deutlich unter denen für Inosin.

1.7

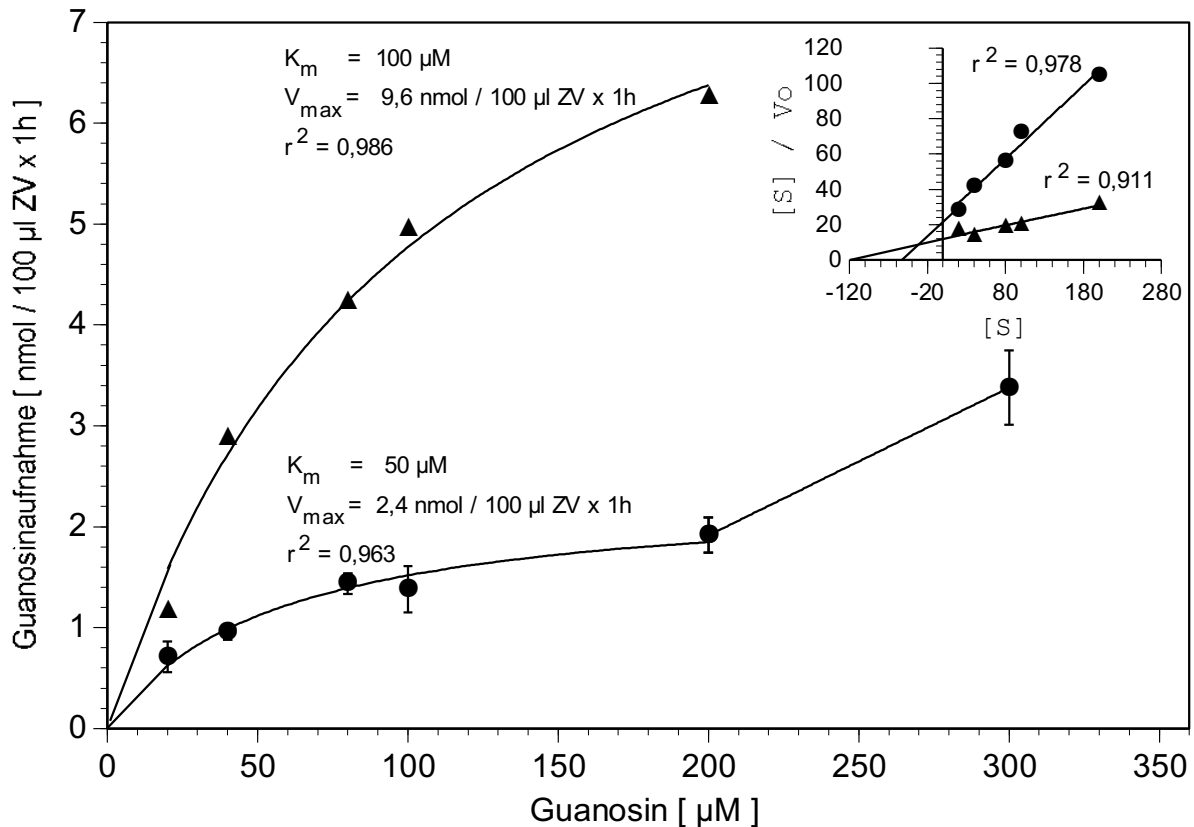


Abb. 23: Konzentrationsabhängige Aufnahme von Guanosin durch Spermatogonien 2. Ordnung (Spg II zweier Tiere von *Nereis virens* vom November); das eingeschobene Diagramm zeigt eine linearisierte Darstellung der Ergebnisse im Hanes-Plot (Vierfachbestimmung je Meßwert).

2.2.7 Nucleosidaufnahme in Abhängigkeit von der Zeit durch männliche Keimzellen

Die Aufnahme von ^{14}C -Inosin oder Guanosin durch männliche Keimzellen verschiedener Reifungsstadien war in allen Fällen über einen Zeitraum von 6 h linear (siehe **Abb. 24**). Da die Keimzellen bei konstantem Angebot von 100 µM Inosin bzw. Guanosin inkubiert wurden kann der Zeitraum angegeben werden nach dem die Konzentration aufgenommener Nucleoside in den Zellen der Angebotskonzentration im Medium entspricht. Untersucht man die Nucleosidgehalte männlicher Keimzellen so findet man, dass Spg II etwa 100 µmol/l ZV Inosin und frühe Spermien (Januar) im Mittel bereits ca. 900 µmol/l ZV Inosin enthalten; bei späten Spermien (März - April) findet man sogar bis zu 2300 µmol/l ZV Inosin. Die Guanosinkonzentration in Spg II beträgt etwa 300 µmol /l ZV Guanosin und bei den späten Spermien (Januar - April) 110 und 210 µmol /l ZV Guanosin. Man kann also auch bei den männlichen Keimzellen davon ausgehen, dass die Nucleosid-Konzentrationen fast aller Reifungsstadien bereits vor Inkubationsbeginn um ein Vielfaches über der Angebotskonzentration von 100 µM Inosin bzw. Guanosin im Medium lagen. Die von den Spermatogonien I und II vom Oktober zusätzlich zu diesen Anfangsgehalten aufgenommene Menge an Inosin bzw. Guanosin erreichte bereits nach 1-2 h dieselbe Konzentration wie im Medium (siehe Pfeile in den Diagrammen der **Abb. 24 a - c.**). Bei späten Spermatogonien vom Dezember (siehe **Abb. 24 c.**) entsprach die Konzentration des aufgenommenen Inosin erst nach 4h der Angebotskonzentration im Medium; die Konzentration des aufgenommenen

1.7

Guanosins reichte dagegen auch nach 6 h noch nicht an die Angebotskonzentration von 100 μM Guanosin heran. Spermien (Januar und April) hatten, dagegen schon nach weniger als 1 h eine dem Außenmedium entsprechende Konzentration an Inosin bzw. Guanosin aufgenommen (**Abb. 24 d.**).

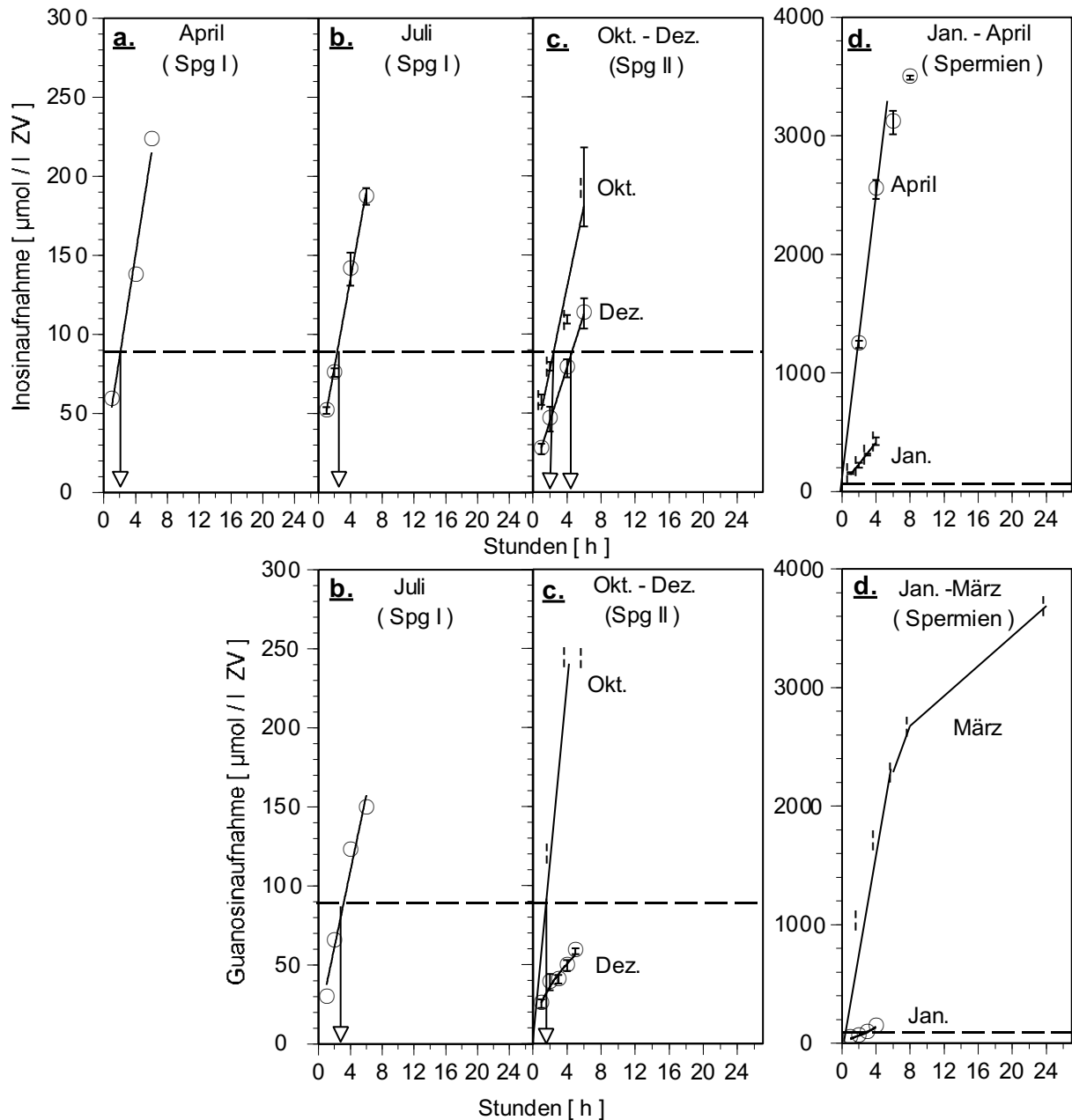


Abb. 24 (a.-d. und b.-d.): Aufnahme von ^{14}C -Inosin bzw. ^{14}C -Guanosin in Abhängigkeit von der Zeit durch männliche Keimzellen verschiedener Reifungsstadien (a.-d. bzw. b.-d.) von *Nereis virens*. Angebotskonzentration im Medium jeweils 100 μM ; die Pfeile geben die Zeit an nach der die Konzentration der aufgenommenen Nucleoside der Angebotskonzentration im Medium (gestrichelte Linie) entspricht (Vierfachbestimmung je Messwert). Hierbei wurde bei allen untersuchten Reifungsstadien berücksichtigt, dass der Anteil der Zellflüssigkeit am Volumen der männlichen Keimzellen etwa 90 % beträgt. Dieser Wert orientiert sich an dem Flüssigkeitsvolumen, das bei einer Vielzahl von Säugerspermien bestimmt wurde (Mann, 1964). Beachte, dass für die Darstellung der Aufnahme durch Spermien (d.) eine andere Skalierung verwendet wurde. Jeder Messreihe liegen Messungen an Keimzellen eines Tieres zugrunde

1.7

Wenn man, jeweils die nach 6 h Inkubation gemessene Konzentration des aufgenommenen Inosin- bzw. Guanosins verschiedener Reifungsstadien miteinander vergleicht, so kann man erkennen, dass die Spg I (April-Juli) und Spg II (Oktober) etwa das 0,5 bis 2,5 fache der Angebotskonzentration aufgenommen haben. Bei späten Spermatogonien II vom Dezember war nach 6 h nur eine geringe oder gar keine Akkumulation von Inosin bzw. Guanosin über die Angebotskonzentration hinaus zu finden (**Abb. 24 c.**) Fast reife Spermien (**Abb. 24 d.**) vom März bzw. April akkumulierten nach 6 h in Kultur erstaunlicherweise sogar das zwanzig bis dreißigfache an Inosin bzw. Guanosin.

2.2.8 Nucleosidaufnahme in Abhängigkeit von der Konzentration durch männliche Keimzellen

Schon die Aufnahme von Nucleosiden durch männliche Keimzellen in Abhängigkeit von der Zeit hatte gezeigt, dass sich die Aufnahmeraten bei Keimzellen verschiedener Reifungsstadien unterscheiden (siehe **Abb. 24**). Im Folgenden soll deshalb die konzentrationsabhängige Aufnahme von Nucleosiden genauer untersucht werden. Hierzu wurde die Aufnahme von ^{14}C -Inosin bzw. Guanosin in Abhängigkeit von der Substratkonzentration über einen standardisierten Zeitraum von 3 oder 5 h gemessen. Innerhalb dieses Zeitraumes und oft auch weit darüber hinaus hatten die männlichen Keimzellen, bei standardisiertem Angebot, Nucleoside mit gleichbleibender Rate aufgenommen (siehe **Abb. 24 a.-d.**); dies ist Voraussetzung dafür, dass die konzentrationsabhängigen Aufnahmekinetiken verschiedener Reifungsstadien miteinander verglichen werden können. War die Aufnahme in Abhängigkeit vom Substratangebot sättigbar, so konnten die Parameter einer Michaelis-Menten Kinetik K_m und V_{\max} berechnet werden. Für eine Aufnahme die nicht-sättigbar war konnte nur die Diffusionsgeschwindigkeit V_{diff} angegeben werden.

In der **Abb. 25 a.** sieht man, dass die Aufnahme von Inosin durch Spermatogonien I (Spg I) in beiden dargestellten Fällen sehr gering war. Nur in einem Fall konnte auch ein K_m -Wert ermittelt werden. Erst nach zwei bis drei Monaten kam es bei den mittlerweile als spät zu bezeichnenden Spg I (**Abb. 25 b.**) zu einem überaus starken Anstieg der Aufnahme. Da die Aufnahme bei den eingesetzten Maximalkonzentrationen von 100 bzw. 300 μM Inosin in keinem Fall sättigbar war, kann jeweils nur V_{diff} angegeben werden; bei einem Angebot von 100 μM Inosin lag die Aufnahmerate später Spg I um das Achtfache über der Aufnahmerate junger Spg I. Beim anschließenden Übergang vom Spg I zum Spg II-Stadium veränderten sich Aufnahmeraten bei einem Angebot von 100 μM kaum. Die Aufnahmekinetik veränderte sich aber deutlich (**Abb. 25 c.**); die Aufnahme war in allen Fällen bis zu einem Angebot von 100 μM Inosin sättigbar, oberhalb dieser Konzentration war die Aufnahme linear-proportional zur Angebotskonzentration. Nach Parallelverschiebung dieses linear ansteigenden Anteils der Aufnahme durch den Nullpunkt des Koordinatensystems und nach seinem Abzug von der Gesamtaufnahme erhält man die sättigbare Komponente der Aufnahme. Für die sättigbare Komponente der Inosinaufnahme durch Spermatogonien II erhielt man somit deutlich niedrigere Werte für V_{\max} und K_m (siehe Werte in Klammern in **Abb. 25 c.**) im Vergleich zur Gesamtaufnahme (siehe Werte ohne Klammern in **Abb. 25 c.**). Die Natur dieser beiden Aufnahme-Komponenten wird im **Kapitel 2.3** genauer untersucht.

Die Aufnahme von Inosin durch Spermatozyten und Tetraden (siehe **Abb. 25 d.**) war in zwei Fällen nicht mehr sättigbar; die Aufnahme durch Spermatozyten eines weiteren Tieres war zwar noch sättigbar, der V_{\max} -Wert war aber sehr gering. Insgesamt waren die Aufnahmeraten der Spermatozyten bzw. Tetraden deutlich geringer als bei den Spg II. Die Aufnahmeraten stiegen bei Spermien wieder an, das Aufnahmeverhalten der Spermien war allerdings extrem

1.7

variabel (**Abb. 25 e**): Die Aufnahme von Inosin durch Spermien vom Januar war durchweg nicht-sättigbar; die Aufnahme von Inosin durch Spermien vom Februar war dagegen eindeutig sättigbar. Der hohe K_m -Wert deutet allerdings darauf hin, dass die lineare Komponente immer noch einen hohen Anteil an der Aufnahme hatte. Bei ausgewachsenen Spermien vom März-April war die Aufnahme sättigbar, die Aufnahmeraten waren noch erstaunlich hoch, und variierten noch stärker als bei den frühen Spermien (Januar bzw. Februar).

Die Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden. **a.** zeigt, dass frühe Spg I vom April nur sehr wenig Guanosin aufgenommen haben. Bei den späten Spg I (Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden. **b.**), die man von Juli bis August in den Tieren findet, stieg die Guanosinaufnahme, anders als die Aufnahme von Inosin nicht dramatisch an. Beim Übergang vom Spg I zum Spg II Stadium (**26. c.**) war in zwei Fällen auch für Guanosin eine Veränderung der Aufnahmecharakteristik zu beobachten; die Aufnahme war bis zu einem Angebot von 200 μM Inosin sättigbar, oberhalb dieser Konzentration kann man die Aufnahme als nicht mehr sättigbar interpretieren. Insgesamt nahmen die späten Spg II nicht verstärkt Guanosin auf. Die Aufnahme von Guanosin durch Spermatozyten bzw. Tetraden (**26. d.**) war wie schon die Aufnahme von Inosin nicht-sättigbar. Auch die Aufnahme von Guanosin durch Spermien war sehr variabel und im Gegensatz zur Inosinaufnahme durch Spermien in keinem der beobachteten Fälle sättigbar. Während frühe Spermien (**26. e.**) immerhin noch vergleichsweise hohe Mengen Guanosin aufnahmen ging die Aufnahme bei fast reifen Spermien (**26. f.**) vom März bzw. April stark zurück. Die **26. g.** zeigt, dass auch die Residualkörper Guanosin aufnehmen können. Residualkörper kann man neben den Spermien in großer Zahl in der Cöloflüssigkeit fast reifer männlicher Tiere findet. Auch bei einem Angebot von 100 μM war die Aufnahme von Guanosin durch Residualkörper noch nicht sättigbar.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Aufnahme von Inosin bzw. Guanosin durch männliche Keimzellen von *Nereis virens* ebenfalls vom Reifungsstadium der Keimzellen abhängig war. Die Aufnahme von Inosin durch Spg I stieg innerhalb von 2-3 Monaten bis zum Juli-August stark an; solch ein Anstieg war allerdings bei der Aufnahme von Guanosin nicht zu beobachten. Bis zum Dezember (Spermatozyten) ging die Aufnahme von Inosin deutlich zurück, während die Guanosinaufnahme unverändert war; frühe Spermien (Januar) und fast reifen Spermien (März-April) nahmen erstaunlicherweise wieder größere Mengen Inosin auf. Bei späten Spermien wurde die Guanosinaufnahme dagegen fast gänzlich eingestellt. Männliche Keimzellen eines Reifungsstadiums zeigten eine viel uneinheitlichere Aufnahmecharakteristik für Inosin bzw. Guanosin als die dies bei heranwachsenden Oozyten eines Reifungsstadiums der Fall war: Neben sättigbarer bzw. nicht-sättigbarer Aufnahme waren vor allem bei Spg II zusammengesetzte Kinetiken aus sättigbarer und nicht-sättigbarer Aufnahme zu beobachten. Wenn K_m -Werte für die Aufnahme von Inosin ermittelt werden konnten, dann lagen sie meist im Bereich physiologischer Inosinkonzentrationen von 10-1000 μM . Das Inosinangebot reichte also in den meisten Fällen aus, um das Aufnahmesystem etwa zur Hälfte mit Inosin ab zu sättigen. Die K_m -Werte der Guanosinaufnahme lagen im Gegensatz zur Inosinaufnahme immer weit über den Guanosin-Konzentrationen in der Cöloflüssigkeit (1-10 μM), bei diesen geringen Substratkonzentrationen ist die Aufnahme noch weitgehend direkt proportional zur Substratkonzentration. Dies bedeutet auch, dass das Aufnahmesystem immer weit von einer Halbsättigung mit Guanosin entfernt war. Bei Spermatozyten und Spermien konnten gar keine K_m -Werte für die Aufnahme von Guanosin bestimmt werden, da die Aufnahme im untersuchten Konzentrationsbereich linear-proportional zum Angebot war.

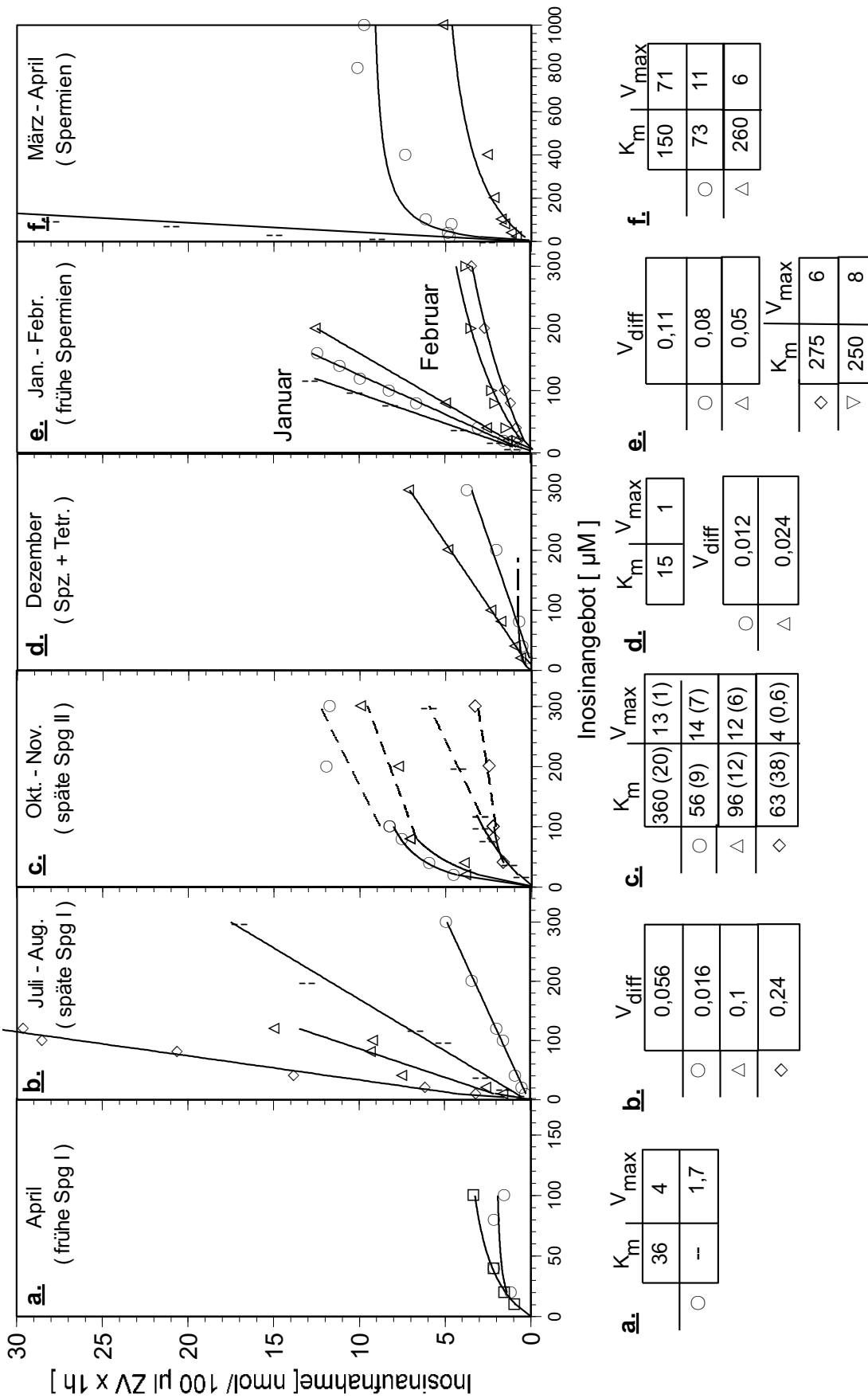


Abb. 25 (a.-f.): Konzentrationsabhängige Aufnahme von ^{14}C -Inosin durch männliche Keimzellen verschiedener Reifungsstadien (a. - f.); in **Abb. c** sind die kinetischen Parameter nach Abzug des linearen Anteils der Aufnahme angegeben (Werte in Klammern). (Zweifach- bzw. Vierfachbestimmung je Meßwert). Unterhalb der Diagramme sind jeweils K_m und V_{max} bzw. V_{diff} angegeben

1.7

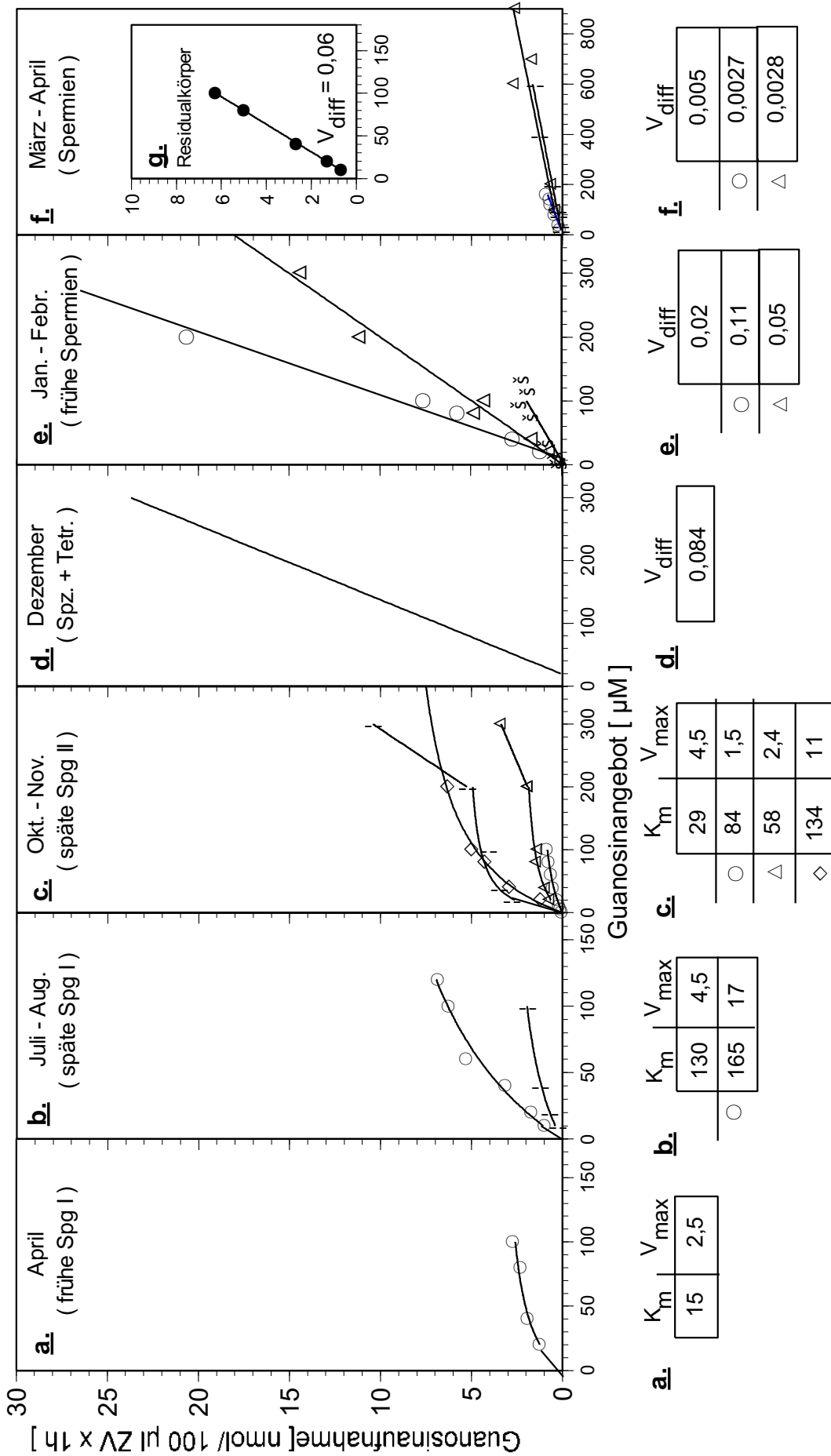


Abb. 26 a. - g. : Konzentrationsabhängige Aufnahme von ^{14}C -Guanosin durch männliche Keimzellen verschiedener Reifungsstadien (**a. - f.**); (Zwei- bzw. Vierfachbestimmung je Meßwert). Unterhalb der Diagramme sind jeweils K_m und V_{max} bzw. V_{diff} angegeben.

2.2.9 Aufnahme von Inosin bzw. Guanosin bei physiologischem Nukleosidangebot

Die **Abb. 27 a.+b.** zeigt die Aufnahme von Inosin bzw. Guanosin bei einem Angebot von $20 \mu\text{M}$ durch verschiedene Spermatogenesestadien. 20

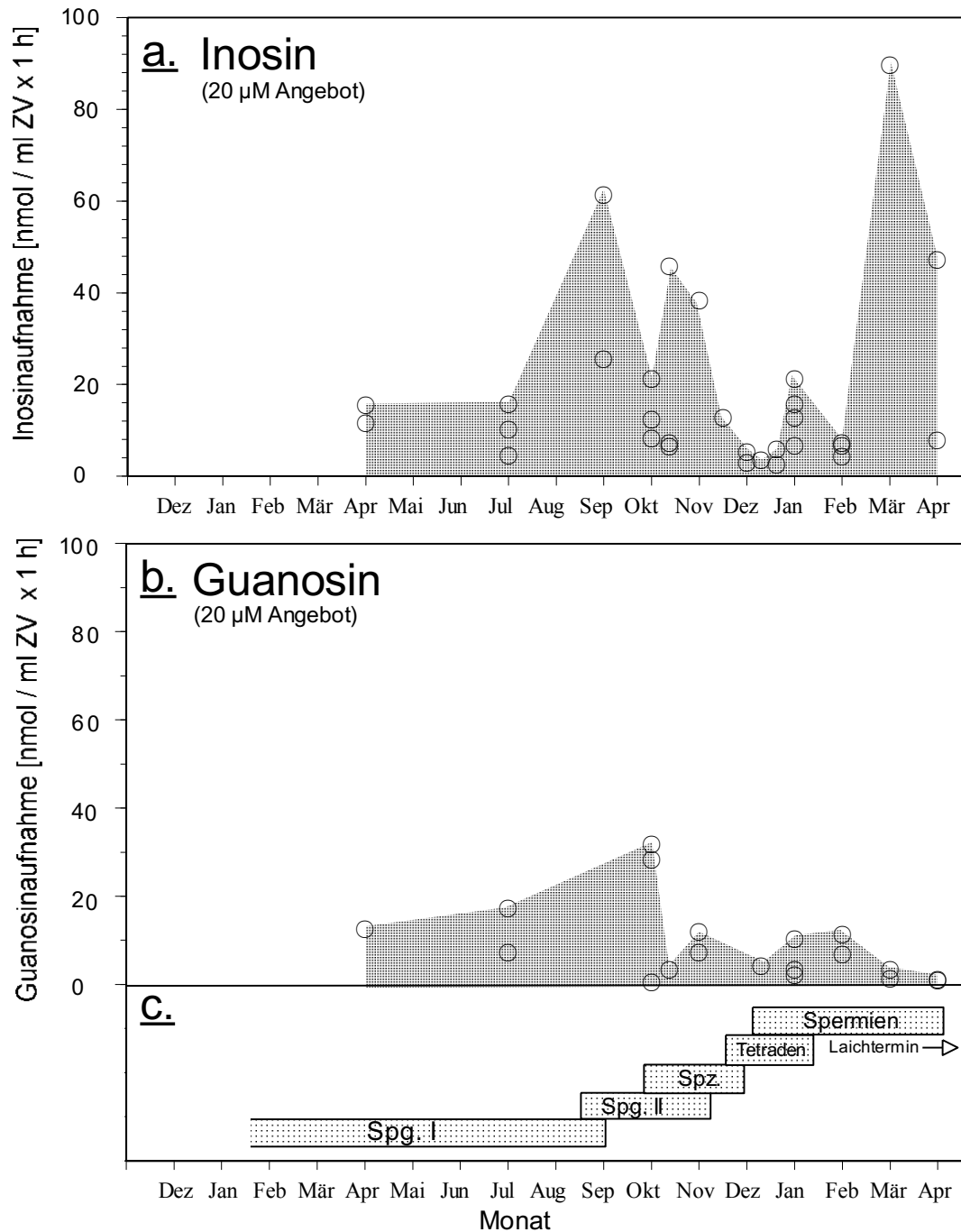


Abb. 27 (a-c): Aufnahme von ^{14}C -Inosin (a.) bzw. Guanosin (b.) in Abhängigkeit vom Spermatogenesestadium bei einem Nukleosidangebot von $20 \mu\text{M}$. Der grau unterlegte Bereich gibt die maximalen Aufnahmeleistungen an; (c.) Jahreszeitliche Verteilung männlicher Keimzellstadien in heranreifenden Tieren, die Stadien überlappen sich etwas d.h., dass mehr als ein Reifungsstadium in einem Tier gefunden werden kann. Jedes Symbol repräsentiert die Aufnahme von Nukleosiden durch Keimzellen eines Tieres.

Die Konzentration von 20 μM Inosin bzw. Guanosin wird in der Cöloflüssigkeit aller Spermatogenesestadien erreicht, und bei reifen Tieren sogar noch bei weitem übertroffen. Bei einem Angebot von 100 μM Inosin ergaben sich allerdings ganz ähnliche Tendenzen für die Aufnahme von Inosin bzw. Guanosin durch verschiedene Spermatogenesestadien (Geier und Hoeger, 1997). Man sieht, dass die Aufnahmerate von Guanosin insgesamt nur wenig unter dem Niveau der Inosinaufnahme lag. Spg I nahmen wenig Inosin bzw. Guanosin auf (Inosin: 4 - 15 nmol / ml ZV x 1h; Guanosin: 7-17 nmol / ml ZV x 1h). Beim Übergang vom Spg I zum Spg II Stadium kam es vor allem im September zu einem starken Anstieg der Inosinaufnahme (5 - 60 nmol / ml ZV x 1h), und nur zu einem vergleichswisen leichten Anstieg der Guanosinaufnahme (1 - 31 nmol / ml ZV x 1h). Tetraden, unter denen man auch noch viele Spermatozyten finden konnte, nahmen schließlich wieder deutlich weniger Inosin bzw. Guanosin auf (Inosin: 2,6 - 12 nmol / ml ZV x 1h; Guanosin: 3,8 - 11 nmol / ml ZV x 1h). Spermien nahmen mit 23 - 89 nmol/ml ZV x 1h Inosin erstaunlicherweise wieder größere Mengen Inosin auf; die Aufnahmerate variierte allerdings vor allem bei den fast reifen Spermien vom März-April sehr stark. Ein Anstieg der Guanosinaufnahme war bei Spermien dagegen nicht zu beobachten; bei fast reifen Spermien vom April ging die Aufnahmerate für Guanosin sogar bis auf 0,1 bzw. 0,6 nmol / ml ZV x 1h zurück.

2.3 Charakterisierung der Nukleosidtransportsysteme bei Keimzellen von *Nereis virens*

Von vielen Säugerzellen weiß man, dass sie Nukleoside sowohl aktiv als auch passiv aufnehmen können. Die Nukleosidtransportsysteme, die hierbei eine Rolle spielen, sind in einigen Fällen ausführlich untersucht worden. Die verschiedenen Transportsysteme werden charakterisiert, indem man die einzelnen Systeme mit Hemmstoffen inhibiert.

Da über die Nukleosidtransportsysteme bei Keimzellen von marinen Invertebraten meines Wissens bislang nichts bekannt war, habe ich Hemmversuche mit den in Kapitel **1.3.11** beschriebenen Substanzen an den Keimzellen von *Nereis virens* durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Hemmversuche werden nachfolgend beschrieben. Die Keimzellen wurden mit den verschiedenen Hemmstoffen vorinkubiert, um eine mögliche Konkurrenz von Inhibitor und Substrat während der Aufnahme auszuschließen. Wenn die Aufnahme bei gleichzeitiger Anwesenheit eines Hemmstoffes getestet wurde, dann ist dies jeweils angegeben. Der Nachweis der Aufnahme geschah durch Verwendung eines Gemisches aus ¹⁴C-markiertem und nicht markiertem Inosin bzw. Guanosin. Nach Vorinkubation der Zellen mit den verschiedenen Hemmsubstanzen betrug die Kulturdauer in der Regel 2-4 h; in diesem Zeitraum war die Aufnahme bei einem Angebot von 100 µmol/l Inosin bzw. Guanosin in allen Fällen linear (siehe auch **Kapitel 2.2.2 und 2.2.7**). Je Messpunkt wurde in der Regel eine Vierfachbestimmung oder wenn dies nicht möglich war wenigstens eine Doppelbestimmung durchgeführt. Auf die Angabe einer Standardabweichung wurde in den meisten Fällen verzichtet, da die Abweichung vom Mittelwert i.d.R. weniger als 10 % betrug. Die Untersuchungen wurden sowohl an mittelgroßen Oozyten der schnellen Wachstumsphase, als auch an ausgewachsenen Oozyten durchgeführt. Bei den männlichen Keimzellen wurden die sehr teilungsaktiven Spermatogonien II. Ordnung und schließlich auch fast reife Spermien untersucht.

2.3.1 Charakterisierung der Inosintransportsysteme mittelgroßer Oozyten

2.3.1.1 Aufnahme von Inosin nach Vorinkubation der Oozyten mit einem Gemisch aus Kaliumcyanid (KCN) und Jodacetat (JAC):

Mittelreife Oozyten (130 - 160 µm \square) von *Nereis virens* wurden 45' lang mit je 5 mM KCN und JAC inkubiert um eine ATP-Entleerung der Zellen zu erreichen. KCN kann die Atmungskette der Zelle blockieren, JAC hemmt dagegen die Glykolyse, und zwar spezifisch die Glycerinaldehyd-3-P-Dehydrogenase. Entgegen den Erwartungen hatte die Kombination aus KCN und JAC keinen Einfluss auf die Aufnahme von Inosin durch Oozyten (**Abb. 28 a.**). Die Messung des ATP-Gehaltes in KCN-JAC vorbehandelten Zellen zeigte auch weshalb. Der ATP-Gehalt der 45' lang mit KCN-JAC vorbehandelten Oozyten hatte sich im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen nämlich nicht verringert (**Abb. 28 b.**)

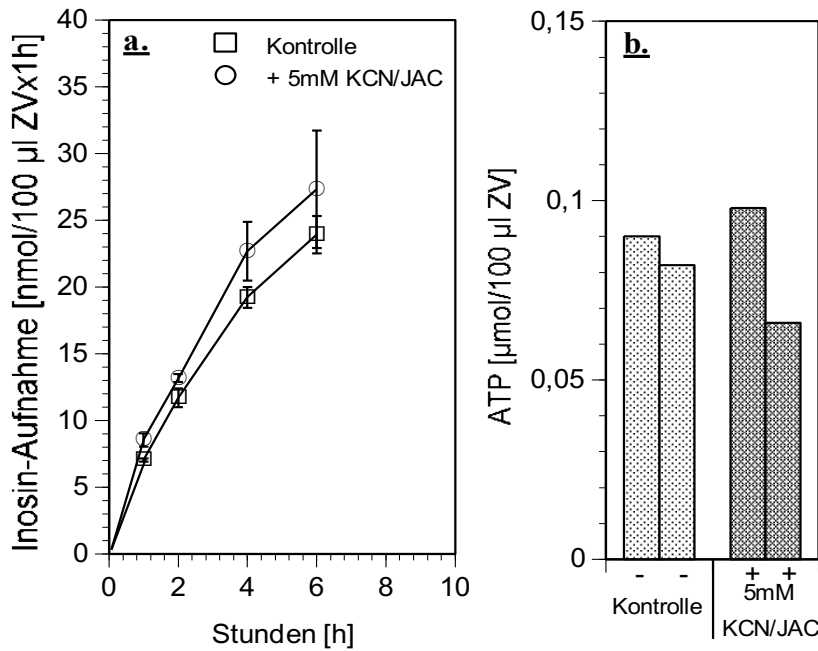


Abb. 28: Aufnahme von Inosin durch Oozyten in Abhängigkeit von der Zeit nach Vorinkubation mit einem Gemisch aus KCN und JAC: (a) Nach 45' Vorinkubation mit je 5 mM KCN und 5 mM JAC bei einem Angebot von 100 μ M Inosin; (b) Einfluss von 5 mM KCN und 5 mM JAC nach 45' Inkubation auf den ATP-Gehalt der Oozyten.

2.3.1.2 Aufnahme von Inosin nach Vorinkubation der Oozyten mit Nitrobenzylthioinosin:

Nitrobenzylthioinosin (NBTI) ist ein Nucleosidanalogon; es wirkt als spezifischer, kompetitiver Inhibitor der erleichterten Diffusion (Berlin, et al, 1975). Es bindet irreversibel an den Transporter und verhindert dadurch die Bindung und den Transport von verschiedenen Nucleosiden in die Zelle (Williams, 1991). Die **Abb. 29 a + b** zeigen, dass eine 2 stündige Vorinkubation der Oozyten mit 5 μ M NBTI keinen Einfluss auf den Verlauf und auf die Konzentrationsabhängigkeit der Aufnahme hatte.

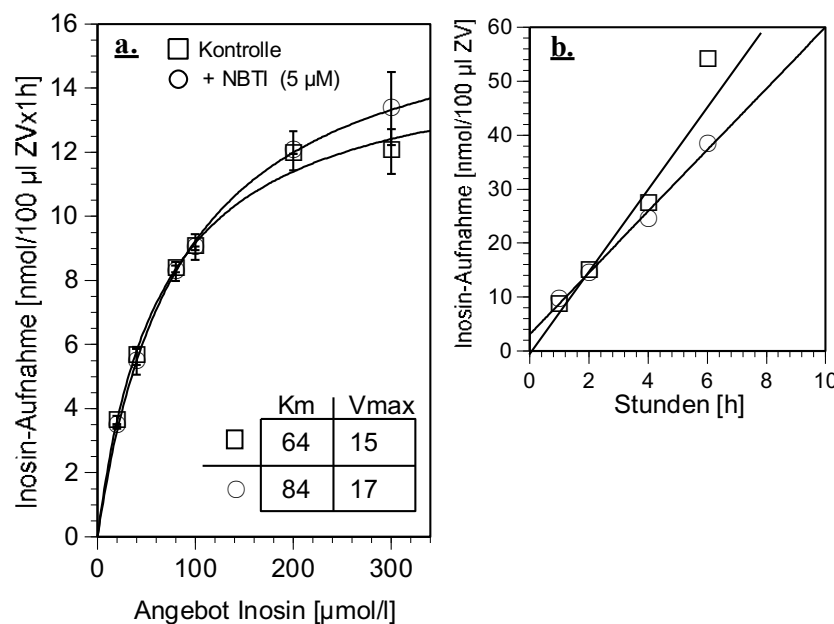


Abb. 29 a+b: Versuch zur Inhibition der Inosin-aufnahme durch Oozyten mit NBTI: (a) Verlauf der Aufnahme nach 2 h Vorinkubation mit 5 μ M Nitrobenzylthioinosin (NBTI) bei verschiedenen Substratkonzentrationen; (b) Verlauf der Aufnahme nach 2 h Vorinkubation mit 5 μ M NBTI in zeitabhängiger Darstellung bei einem Angebot von 100 μ M Inosin.

2.3.1.3 Inosinaufnahme nach Vorinkubation der Oozyten mit Perchloromercuribenzoat:

Perchloromercuribenzoat (PCMB) alkyliert Sulfhydrylgruppen von Membranproteinen und hemmt dadurch die erleichterte Diffusion von Nucleosiden (Plagemann et al, 1974 Plagemann et al, 1988). Erst eine dreistündige Vorbehandlung der Oozyten mit 5 mM PCMB konnte die Aufnahme von Inosin deutlich hemmen so, dass nur noch eine zum Substratangebot linear-proportionale Aufnahme verblieb (siehe **Abb. 30**). Bei einem Inosinangebot von 100 $\mu\text{mol/l}$ hatte sich die Aufnahme nach Vorinkubation mit 1 mM PCMB im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle um ca. 70 % verringert.

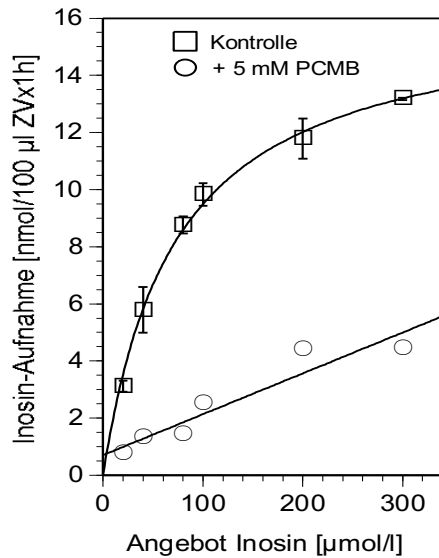


Abb. 30: Inhibition der Inosinaufnahme durch Oozyten in Abhängigkeit von der Substratkonzentration: Nach dreistündiger Vorinkubation mit 5 mM Perchloromercuribenzoat (PCMB) ($r^2 > 0,898$ für beide Kurven).

2.3.1.4 Vorinkubation der Oozyten mit Jodacetamid:

Jodacetamid (JAA) hemmt ein Schlüsselenzym der Glykolyse mit der Folge, dass die Zelle ATP-Entleert wird (Rawl, 1989). Die Oozyten wurden je 1 h lang mit 0,5, 1 und 5 mM JAA vorinkubiert. Die **Abb. 31 a.** zeigt die Ergebnisse der durch JAA bedingten Hemmung. Die Erhöhung der JAA-Konzentration im Medium führte zu einer fortschreitenden Hemmung der Inosinaufnahme; gleichzeitig näherte sich die Inosinaufnahme in Abhängigkeit vom Inosinangebot immer mehr einer linearen Funktion. Nach Vorinkubation mit 5 mM JAA verblieb eine überwiegend linear-proportionale Abhängigkeit der Aufnahme vom Inosin- bzw. Guanosinangebot. Die Steigung dieser Geraden kann man als Maß für die Diffusionsgeschwindigkeit V_{diff} des Inosins durch die Membran nehmen (siehe auch Hauschka, 1973), sie betrug in Abhängigkeit vom Inosinangebot $V_{\text{diff}} = 0,017 \text{ nmol}/100 \mu\text{l ZV} \times 1\text{h}$. Eine einstündige Vorinkubation mit 1 bzw. 5 mM JAA beeinflusste den ATP-Gehalt der Oozyten, im Gegensatz zur Vorbehandlung mit JAC, deutlich (siehe **Abb. 31 b**). Der ATP-Gehalt der so vorbehandelten Oozyten hatte sich im Vergleich zu den Kontrollen ohne JAA-Behandlung um etwa 75 % reduziert. Die verbliebene lineare Aufnahme kann man deshalb als ATP-unabhängige Aufnahme interpretieren. Längere Vorinkubationen mit 5 mM JAA hatten sich als ungeeignet erwiesen, da die Oozyten hierbei, wahrscheinlich infolge einer völligen ATP-Entleerung, abstarben. Deutlich erkennbar war dies immer daran, dass sich die Oozyten im Zentrifugenröhrchen nicht mehr von allein am Grund des Röhrchens absetzen, sondern in der

Schwebelieben. Solche Zellen waren in Kultur auch nicht mehr in der Lage Nucleoside aufzunehmen.

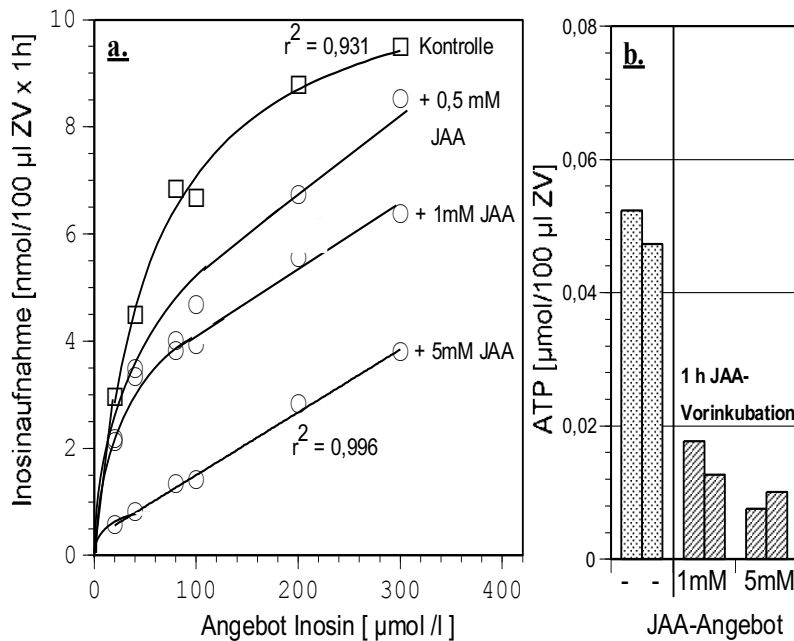


Abb. 31 a+b: Hemmung der Inosinaufnahme durch Oozyten in Abhängigkeit vom Substratangebot nach Vorinkubation mit verschiedenen Konzentrationen von JAA: **(a)** 1 h Vorinkubation mit 0,5, 1 und 5 mM JAA; **(b)** Einfluss einer 1 h Vor-inkubation mit 1 und 5 mM JAA auf den intra-zellulären ATP-Gehalt der Oozyten (HPLC-Messung); Kontrolle jeweils ohne JAA.

In der folgenden **Abb. 32 a.-c.** werden die Ergebnisse nach Vorinkubation mit 5 mM JAA aus **Abb. 31 a** noch einmal in anderer Form dargestellt. Die Kennlinie der nach Vorinkubation mit 5 mM JAA verbliebenen, linearen Aufnahme wurde zuerst leicht parallelverschoben, so dass sie durch den Nullpunkt des Koordinatensystems ging und dann von der hyperbolischen Funktion, dh den Kontrollwerten abgezogen. Auf diese Weise erhielt man nur noch eine resultierende, ATP-abhängige Aufnahme. Die ATP-abhängige Aufnahme von Inosin erreichte schon ab einem Angebot von etwa 100 μ mol/l Inosin ein Sättigungsniveau. Der apparente K_m -Wert dieses Systems, berechnet nach Hanes, hatte sich im Vergleich zur Kontrolle etwa um mehr als die Hälfte von 60 auf 20 μ mol/l verringert. Der apparente V_{max} -Wert nahm von 11,3 auf 6,6 nmol/100 μ l ZV ab.

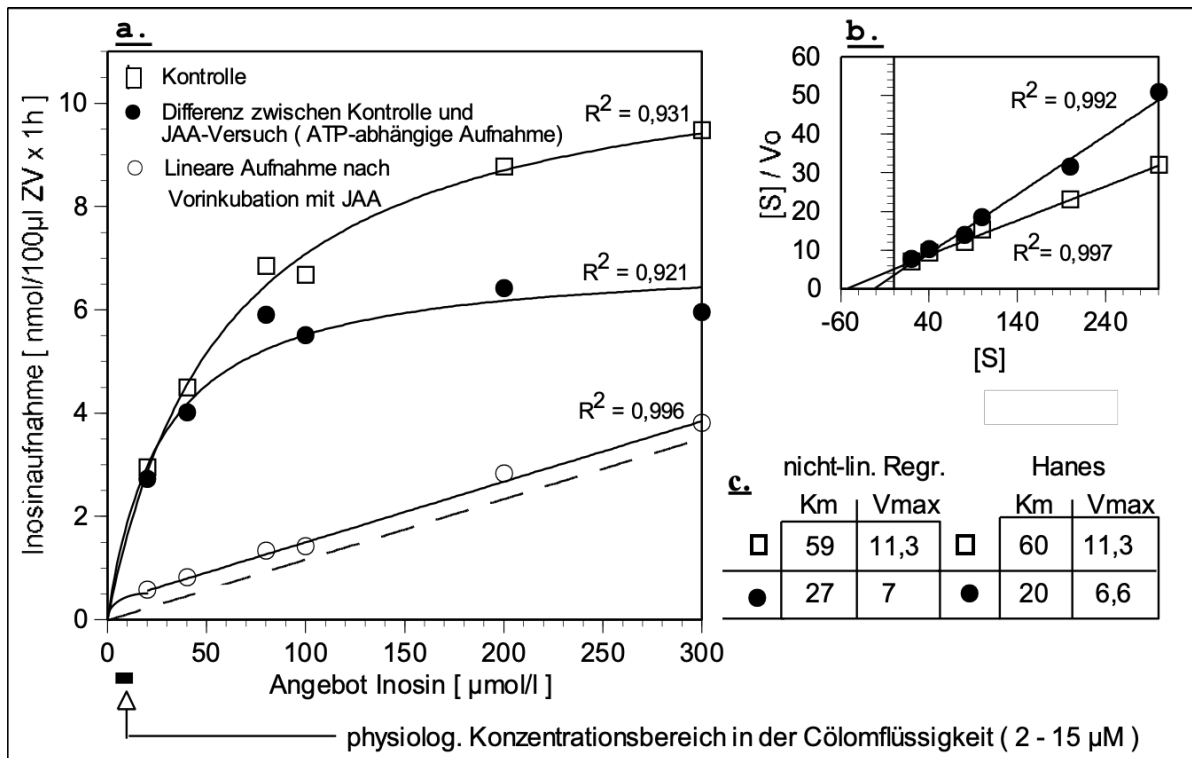


Abb. 32 (a-c): Darstellung der Aufnahme von Inosin durch Oozyten nach Vorbehandlung mit JAA: (a) Nach 1 stündiger Vorinkubation mit 5 mM JAA verbleibt eine lineare Aufnahme (○) (siehe auch **Abb. 31 a.**); nach Abzug der linearen Aufnahme von den Kontrollwerten (□) erhält man die Kennlinie der resultierenden, ATP-abhängigen Aufnahme (●); (b) Berechnung der apparenten K_m und V_{max} für die Kontrolle (□) und die ATP-abhängige Aufnahme (●) im Hanes-Plot; (c) Tabelle: Berechnung von K_m und V_{max} durch nicht-lineare Regression (nicht-lin. Regr.) und nach Hanes im Vergleich.

2.3.1.5 Aufnahme von Inosin bei Na^+ -Mangel sowie in Gegenwart von Ouabain und Quercetin

Durch die Inkubation der Oozyten in Na^+ -freiem Medium und in Gegenwart von Ouabain sollte untersucht werden, ob der Aufnahme von Inosin ein aktives, Na^+ -abhängiges Transportsystem zugrundeliegt.

Bei verringertem Na^+ -Gehalt im Medium nahmen inkubierte Oozyten etwas weniger Inosin auf (**Abb. 33 a.**); der V_{max} Wert in dem Ansatz ohne Na^+ reduzierte sich im Vergleich zur Na^+ -haltigen Kontrolle von 13 auf 9 μM $\mu\text{mol}/100 \mu\text{l ZV} \times 1\text{h}$. Der K_m -Wert hatte sich ebenfalls etwas von 55 auf 33 $\mu\text{mol}/100 \mu\text{l ZV} \times 1\text{h}$ verringert. Innerhalb des physiologischen Konzentrationsbereiches für Inosin (2 - 15 μM) kam es allerdings zu keiner erkennbaren Hemmung durch den geringeren Gehalt von Na^+ im Medium. Eine deutlich sichtbare Hemmung trat erst oberhalb eines Angebotes von 80 $\mu\text{mol}/\text{l}$ Inosin ein. In einem weiteren Versuch wurde getestet, ob die Aufnahme von Inosin durch Oozyten bei Anwesenheit von 3 mM Ouabain im Medium hemmbar ist (**Abb. 33 b.**). Ouabain hemmt ganz gezielt Na^+/K^+ -

ATPasen mit der Folge, dass der Na^+ -Gradient über der Zellmembran nicht aufrechterhalten werden kann.

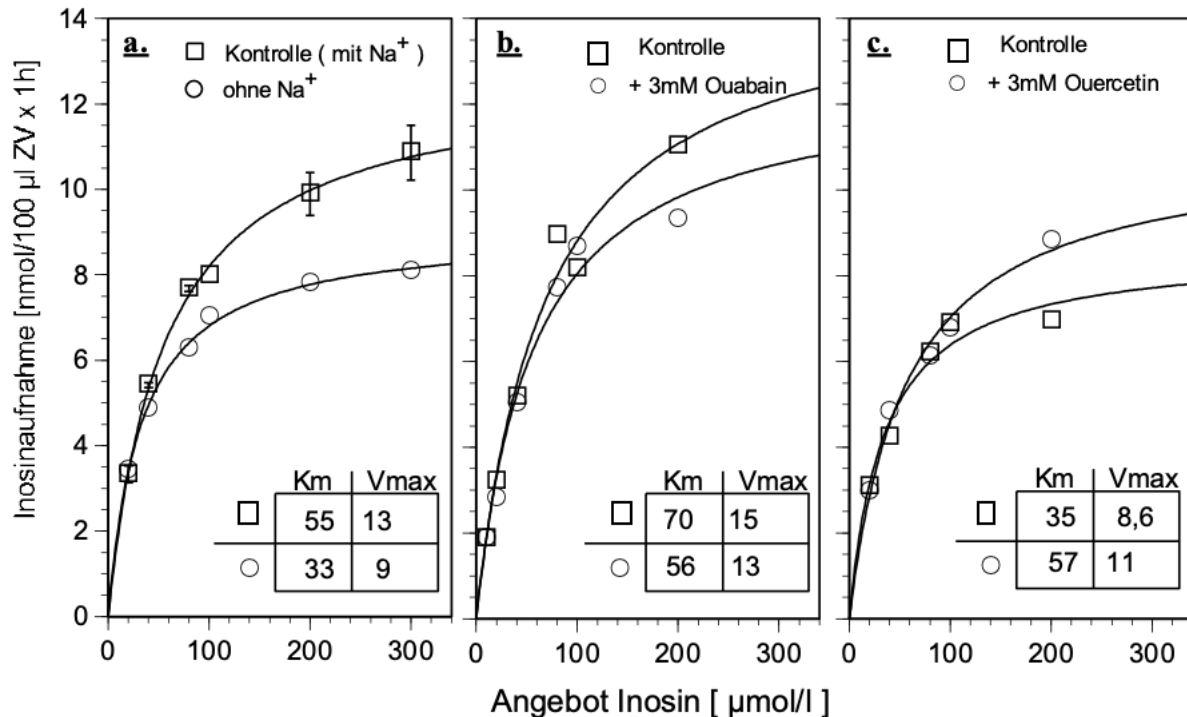


Abb. 33 (a-c): Aufnahme von Inosin durch Oozyten in Abhängigkeit von der Substratkonzentration: (a) nach 3h Inkubation in Na^+ -freiem Medium (○) ($r^2 > 0,995$); (b) Nach 3h Inkubation in Gegenwart von 3 mM Ouabain (○) ($r^2 > 0,978$); (c) Nach 3 h Inkubation in Medium in Gegenwart von 3 mM Quercetin (○) ($r^2 = 0,951; 0,984$). Die Berechnung von K_m und V_{max} erfolgte durch nicht-lineare Regression.

Sollten die Oozyten Inosin mit Hilfe eines Na^+ -abhängigen Transports einschleusen, so wäre durch Ouabain eine deutliche Hemmung der Aufnahme zu erwarten. Eine dreistündige Inkubation der Oozyten mit Ouabain beeinflusste die Aufnahme von Inosin fast nicht.

Der Wert für K_m und der V_{max} hatte sich in Gegenwart von Ouabain im Vergleich zur Kontrolle kaum verändert. Erst ab einer Angebotskonzentration von 200 $\mu\text{mol/l}$ Inosin, also weit außerhalb des physiologischen Konzentrationsbereiches, war ein geringer Effekt zu beobachten, der durchaus noch innerhalb der üblichen Meßwertschwankungen liegen könnte. Die maßgebliche Beteiligung einer Na^+/K^+ -ATPase an einer Na^+ getriebenen, aktiven Inosinaufnahme muss aufgrund dieser Befunde endgültig ausgeschlossen werden.

Um auch eine zweite mögliche Form der aktiven, ionengetriebenen Aufnahme von Inosin auszuschließen wurden die Oozyten 3 h lang mit Quercetin inkubiert (**Abb. 33 c.**) Quercetin inhibiert selektiv die $\text{Ca}^{2+}/\text{K}^+$ -ATPase. Die Inkubation bei Anwesenheit von Quercetin hatte im physiologischen Konzentrationsbereich von Inosin ebenfalls keinen sichtbaren Effekt. Bei einem Angebot von 200 $\mu\text{mol/l}$ Inosin wurde die Aufnahme sogar leicht erhöht, wofür aber auch Meßwertschwankungen verantwortlich sein könnten. Die direkte Beteiligung von Ca^{2+} am Transport von Inosin durch Oozyten war damit ebenfalls auszuschließen.

2.3.1.6 Aufnahme von Inosin durch mittelgroße Oozyten in Gegenwart von Guanosin

Die konzentrationsabhängige Aufnahme von ^{14}C -Inosin durch Oozyten wurde auch in Gegenwart von nichtmarkiertem Guanosin getestet. Guanosin ist ebenfalls immer in der Cölomflüssigkeit der Tiere zu finden, weshalb man vermuten kann, dass beide Nukleoside um dasselbe Transportsystem konkurrieren können. Guanosin erreicht in mittelreifen Tieren, allerdings höchstens halb so hohe Konzentrationen wie das Inosin. In **Abb. 34 a.** sieht man, dass die Zugabe von $100\ \mu\text{mol/l}$ Guanosin die Affinität des Aufnahmesystems für Inosin zwar vermindert hatte (Erhöhung des K_m -Wertes von 62 auf $92\ \mu\text{M}$), dass die maximale Aufnahmerate aber mit $4,4$ bis $4,7\ \text{nmol}/100\ \mu\text{l ZVx1h}$ unverändert geblieben war (berechnet nach Hanes; siehe **Abb. 34 c**). Das Inosin konnte somit den Hemmstoff, in diesem Fall das Guanosin bei sehr großem Überschuss vollständig verdrängen; V_{max} veränderte sich nicht. Dieses Aufnahmeverhalten lässt auf eine kompetitive Hemmung schließen (Bisswanger, 1994). Bei diesem Hemmtyp konkurriert der Hemmstoff, das Guanosin, aufgrund enger Strukturanalogie mit dem Substrat Inosin um dessen Bindungsstelle am aktiven Zentrum eines Enzyms oder eines Transportrezeptors. Die apparente Bindungsaffinität wird dadurch herabgesetzt. Im Hanes-Plot zeigt sich die kompetitive Hemmung daran, dass die Geraden ohne gemeinsamen Schnittpunkt auf der x oder y-Achse möglichst parallel nebeneinander herlaufen. Dies trifft für den vorliegenden Versuch annähernd zu (**Abb. 34 b**). Um das Ergebnis zu untermauern, wären zusätzliche Versuche bei verschiedenen Konzentrationen von Guanosin notwendig gewesen. Für die Inhibition der Inosinaufnahme durch Guanosin kann man eine Dissoziationskonstante K_i berechnen. Diese Konstante gibt Auskunft darüber, wie schwach oder stark ein Inhibitor von dem Rezeptor eines Transporters gebunden wird, er wird deshalb auch als kompetitive Hemmkonstante bezeichnet (Bisswanger, 1994). Erhält man einen K_i -Wert der weit über dem K_m -Wert für das Substrat liegt so kann man vermuten, dass der Inhibitor an den Rezeptor bindet, ohne in größerem Ausmaß transportiert zu werden (Plagemann et al, 1974). Stimmen der K_i und der K_m Wert dagegen überein so deutet dies eher darauf hin, dass Substrat und Inhibitor in gleichem Maße transportiert werden (Plagemann, 1971). Zur Berechnung von K_i sei auf das **Kapitel 1.3.14** verwiesen. Für den vorliegenden Versuch erhält man demnach einen K_i -Wert für Guanosin von $K_i = 68\ \mu\text{M}$. Der K_i -Wert entspricht dem K_m -Wert der Kontrolle (berechnet nach Hanes), was vermuten lässt, dass Inosin und Guanosin im gleichen Ausmaß in die Oozyten aufgenommen werden.

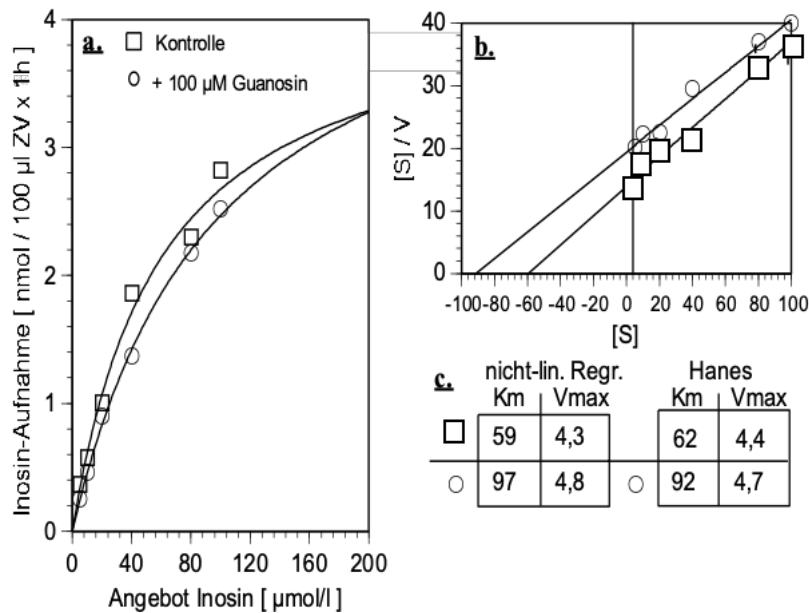


Abb. 34 (a-c): (a) Aufnahme von Inosin in Abhängigkeit von der Konzentration in Gegenwart von 100 µmol/l Guanosin ($r^2 = 0,985; 0,998$); (b) Hanes-Plot zur Bestimmung von K_m und V_{max} . ($r^2 = 0,959; 0,984$); (c) Tabelle: K_m und V_{max} -Werte berechnet durch nicht-lineare Regression (nicht-lin. Regr.) und nach Hanes im Vergleich.

2.3.1.7 Test auf Inosinausstrom aus Oozyten:

Mittelgroße Oozyten wurden 3 h lang mit ^{14}C -Inosin inkubiert. Die Oozyten wurden danach dreimal gründlich gewaschen. Ein Aliquot Zellen wurde nach 3 h im Radioaktivitätszähler gemessen, um die in dieser Zeit aufgenommene Menge an Inosin zu bestimmen. Die restlichen Oozyten wurden in ein Medium ohne ^{14}C -Inosin verbracht. Jeweils nach definierten Zeiten wurde diesem Ansatz etwas Medium entnommen und im Zähler auf Radioaktivität getestet. Das Ergebnis ist in **Abb. 35** dargestellt. Mit ^{14}C -Inosin vor inkubierte Oozyten entließen auch nach 24 h in Kultur keine signifikanten Mengen an einmal aufgenommenen ^{14}C -Inosin bzw. seiner Äquivalente in das Medium. Nach 24 h in Kultur waren nur etwa 3-4 % der aufgenommenen Aktivität wieder in das Medium gelangt.

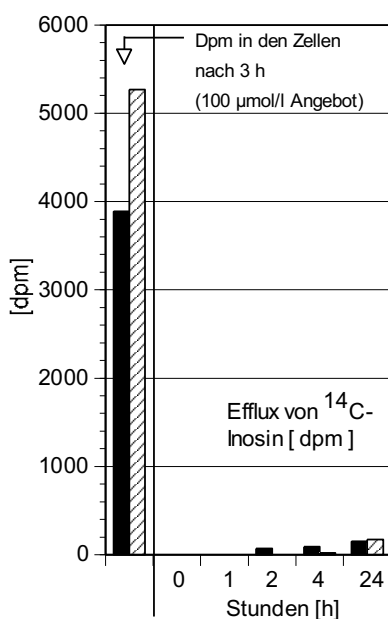
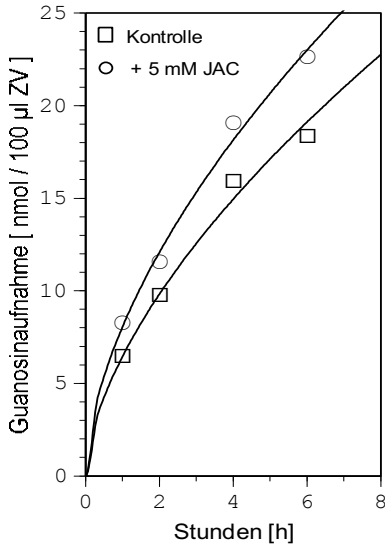


Abb. 35: Die linke Spalte der Grafik gibt die Aktivität nach 3 h Inkubation mit ^{14}C -markiertem Inosin (Angebot von 100 µmol/l Inosin) an. Zum Test auf Inosin-Ausstrom wurden die Zellen danach bis zu 24 h in Medium ohne ^{14}C -markiertes Inosin verbracht. Nach 0, 1, 2, 4 und 24 h wurde etwas Medium entnommen und die darin enthaltene, von den Oozyten abgegebene Aktivität gemessen (Doppelbestimmung).

2.3.2 Charakterisierung der Guanosintransportsysteme mittelgroßer Oozyten

2.3.2.1 Vorinkubation der Oozyten mit Jodacetat (JAC) :

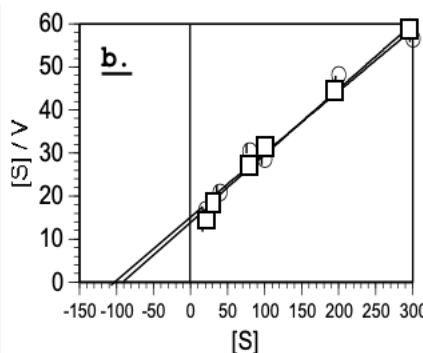
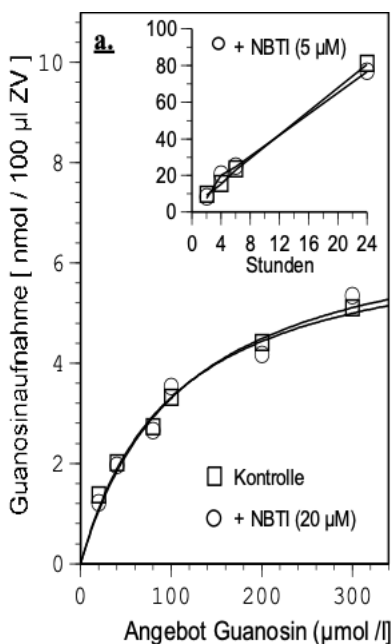


Die Vorbehandlung mittelreifer Oozyten (130 - 160 µm \square) mit 5 mM JAC bewirkte, wie auch beim Inosin, eine leichte Erhöhung der Guanosinaufnahme (**Abb. 36**). Nach 6 h in Kultur hatte sich die Aufnahme von Guanosin im Vergleich zur Kontrolle um fast 24 % erhöht.

Abb. 36: Aufnahme von Guanosin durch Oozyten in Abhängigkeit von der Zeit: 1h Vorinkubation mit 5 mM JAC - Messung der Aufnahme nach Vorinkubation bei einem Angebot von 100 µmol/l Guanosin.

2.3.2.2 Aufnahme von Guanosin nach Vorinkubation der Oozyten mit Nitrobenzylthioinosin (NBTI) :

Die Vorinkubation der Oozyten mit 5 bzw. 20 µM Nitrobenzylthioinosin (NBTI) hatte auf die Aufnahme von Guanosin keinen Einfluss (**Abb. 37 a-c**). K_m und V_{max} hatten sich dementsprechend nach Vorinkubation mit NBTI nur wenig verändert (siehe Tabelle **c** in **Abb. 37**). Somit hatte das NBTI weder auf die Inosin- noch auf die Guanosinaufnahme bei Oozyten einen signifikanten Einfluss.

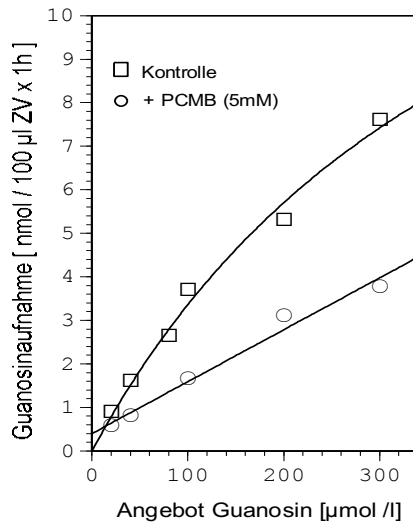


c.

	nicht-lin. Regr.		Hanes	
	K_m	V_{max}	K_m	V_{max}
\square	100	6,6	\square	100
\circ	112	7	\circ	112

Abb. 37 (a-c): Aufnahme von Guanosin durch Oozyten nach Vorinkubation mit NBTI: (a) 2 h Vorinkubation mit 5 bzw. 20 µmol/l NBTI (Einschub: Zeitkinetik bei 100 µmol/l Guanosin-angebot). ($r^2 = 0,953; 0,997$); (b) Hanes-Plot zur Bestimmung von K_m und V_{max} . mit und ohne NBTI-Vorinkubation, ($r^2 = 0,973; 0,987$); (c) Tabelle: K_m und V_{max} -Werte berechnet durch nicht-lineare Regression (nicht-lin. Regr.) und nach Hanes.

2.3.2.3 Aufnahme von Guanosin nach Vorinkubation der Oozyten mit Perchloromercuribenzoat (PCMB):



Die **Abb. 38** zeigt, dass PCMB, ein spezifischer Inhibitor der erleichterten Diffusion, auch die Aufnahme von Guanosin durch Oozyten stark zu hemmen vermochte: es verblieb eine Aufnahme die linear, proportional zum Inosinangebot war.

Abb. 38: Aufnahme von Guanosin durch Oozyten nach Vorinkubation mit PCMB: 2h Vorinkubation mit 5 mM Perchloromercuribenzoat (PCMB) ($r^2 = 0,989; 0,979$).

2.3.2.4 Aufnahme von Guanosin nach Vorinkubation der Oozyten mit Jodacetamid (JAA):

5 mM JAA hemmte nicht nur, wie bereits beschrieben, die Aufnahme von Inosin sondern auch die Aufnahme von Guanosin (**Abb. 39 a.-c.**). Die nach Vorinkubation mit 5 mM JAA verbliebene lineare Aufnahme hatte mit einer Diffusionsgeschwindigkeit von $V_{diff} = 0,012$ nmol/100 µl ZV x 1h einen ganz wesentlichen Anteil an der Aufnahme von Guanosin durch Oozyten. Die Kennlinie der linearen Aufnahme wurde von der hyperbolischen Funktion des Kontrollversuches abgezogen. Auf diese Weise erhielt man auch in diesem Fall eine resultierende, ATP-abhängige Aufnahme. Die ATP-abhängige Aufnahmekinetik ging ab einem Guanosinangebot von etwa 80-100 µmol/l Guanosin bereits in eine Sättigung über. Der apparente K_m -Wert des ATP-abhängigen Systems hatte sich im Vergleich zur Kontrolle von 374 µM auf 69 µM geradezu dramatisch verringert (Berechnung nach Hanes). Ähnliches gilt für den apparenten V_{max} -Wert, der sich von 16,4 auf 2,2 nmol/100 µl ZVx1h verringert hatte.

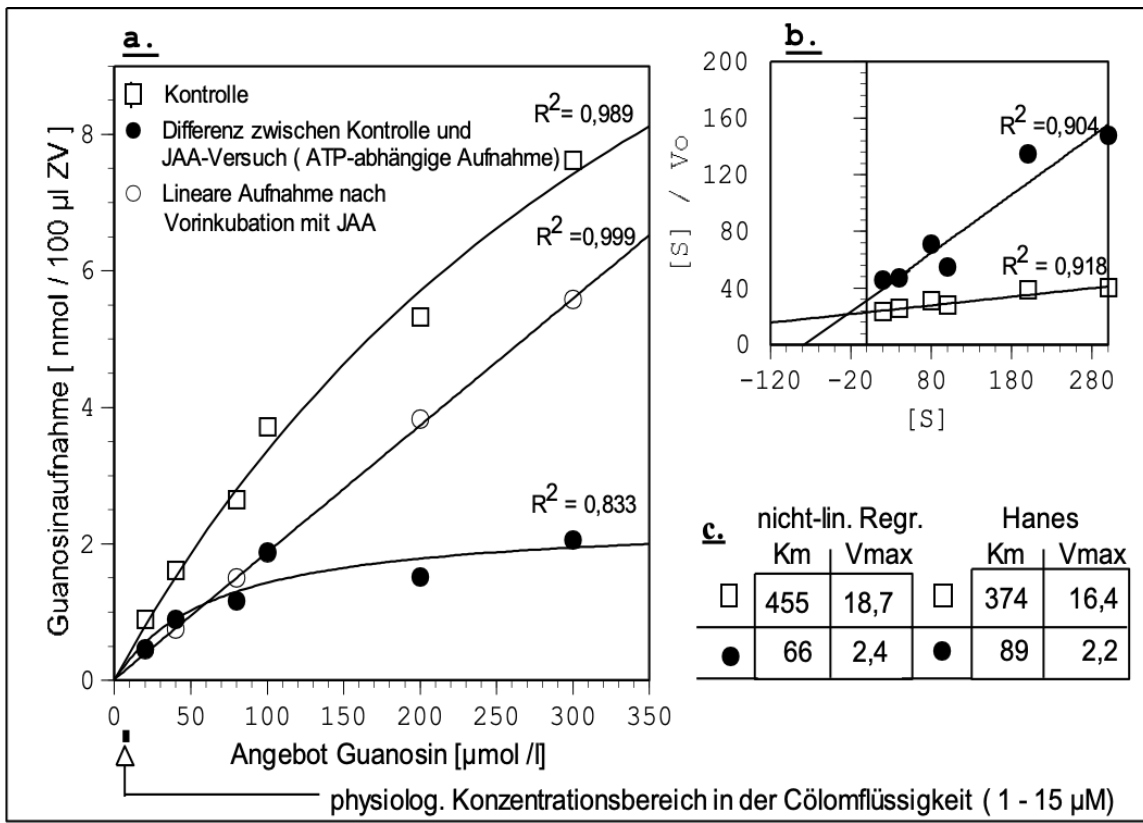


Abb. 39 (a-c): Darstellung der Aufnahme von Guanosin durch Oozyten nach Vorbehandlung mit JAA : (a) Nach 1 stündiger Vorinkubation mit 5 mM JAA verbleibt eine lineare Aufnahme (○); nach Abzug dieser linearen Aufnahme von den Kontrollwerten (□) erhält man die Kennlinie der resultierenden, ATP-abhängigen Aufnahme (●); (b) Berechnung der apparenten K_m und V_{max} für die Kontrolle (□) und die ATP-abhängige Aufnahme (●) im Hanes-Plot; (c) Tabelle : Berechnung von K_m und V_{max} durch nicht-lineare Regression (nicht-lin. Regr.) und nach Hanes im Vergleich.

2.3.2.5 Aufnahme von Guanosin in Gegenwart von Ouabain und Quercetin:

Der K_m und der V_{max} Wert wurden durch die Gegenwart von Ouabain im Vergleich zur Kontrolle kaum verändert (

Abb. 40 a - c). Erst ab einer Angebotskonzentration von 100 μ mol/l Inosin, also einer Konzentration weit außerhalb des physiologischen Bereiches, war ein geringer Hemmeffekt zu beobachten. Die direkte Beteiligung einer Na^+/K^+ -ATPase an der Aufnahme von Guanosin kann aufgrund dieses Befundes wie bei der Aufnahme von Inosin ausgeschlossen werden. Um auch die Beteiligung einer Ca^{2+} -getriebenen, aktiven Aufnahme von Guanosin auszuschließen wurden die Oozyten 15 min lang mit 100 μ mol/l Quercetin vorinkubiert. Bei einem Guanosinangebot von 100 μ mol/l Guanosin war nach 3 h in Kultur keine Inhibition der Aufnahme im Vergleich zur Kontrolle feststellbar (siehe **Abb. 40 d.**).

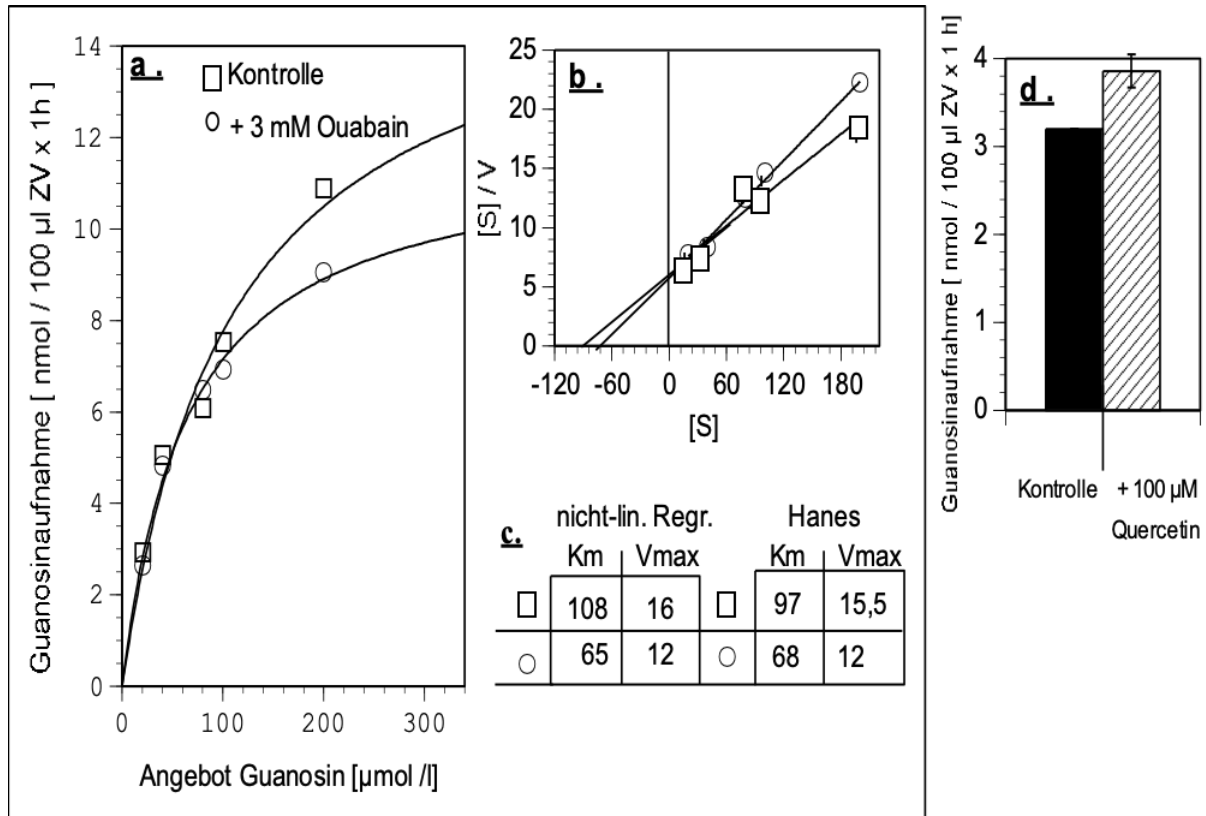


Abb. 40 (a-c) und (d): (a) Aufnahme von Guanosisin in Abhängigkeit von der Substratkonzentration nach 3 h Inkubation in Gegenwart von 3 mM Ouabain (○) ($r^2 = 0,962 - 0,991$); (b) Bestimmung von K_m und V_{max} im Hanes-Plot; (c) Tabelle : Berechnung von K_m und V_{max} durch nicht-lineare Regression (nicht-lin. Repr.) und nach Hanes im Vergleich; (d) 15 min Vorinkubation mit 100 µmol/l Quercetin, danach wurden die Zellen 3h bei einem Guanosisinangebot von 100 µmol/l Guanosisin inkubiert und anschließend die Aufnahme gemessen (n=2).

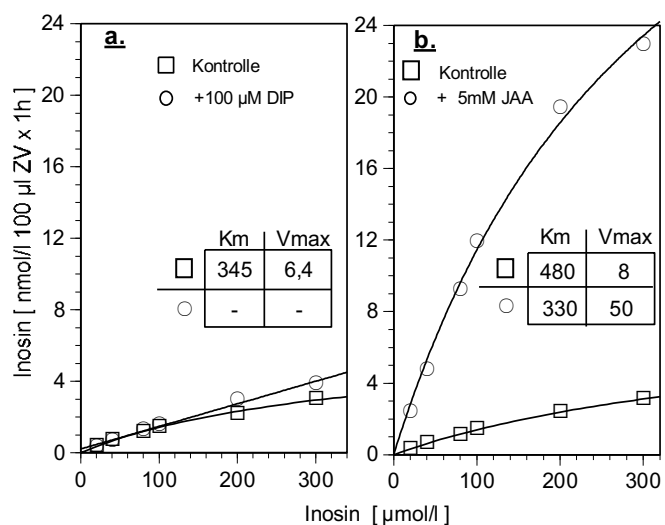
2.3.3 Charakterisierung des Inosin- bzw. Guanosintransports ausgewachsener Oozyten

2.3.3.1 Aufnahme von Inosin nach Vorinkubation reifer Oozyten mit Dipyridamol (DIP) und Jodacetamid (JAA)

Ausgewachsene Oozyten (175-185 μm) von *Nereis virens* wurden 2 h mit 100 μM Dipyridamol (DIP) vorinkubiert. Dipyridamol bindet vermutlich wie NBTI an hydrophobe Gruppen des Nucleosidtransporters (Plagemann et al, 1988).

Die **Abb. 41 a.** zeigt, dass Dipyridamol die Aufnahme von Inosin nicht hemmen konnte. Unterzog man ausgewachsene Oozyten einer zweistündigen Vorinkubation mit JAA (siehe **Abb. 41 b.**), so zeigte sich bei einer Konzentration von 5 mM JAA sogar eine dramatische Steigerung der Aufnahme. Sowohl der K_m Wert ($K_m=330 \mu\text{M}$) als auch der V_{max} Wert (50 $\mu\text{mol}/100\mu\text{l ZV} \times 1\text{h}$) waren sehr hoch. Vergleicht man dieses Ergebnis mit der Aufnahme von Inosin nach JAA-Vorinkubation mittelgroßer Oozyten so hat JAA bei ausgewachsenen Oozyten offensichtlich genau den gegenteiligen Effekt. Eine Vorinkubation von 10-minütiger Dauer mit nur 1mM JAA (Daten nicht gezeigt) hatte dagegen keinen sichtbaren Einfluss auf die Aufnahme von Inosin durch ausgewachsene Oozyten.

Abb. 41 (a+b): Aufnahme von Inosin durch ausgewachsene Oozyten in Abhängigkeit vom Substratangebot: **(a)** Nach 2 h Vorinkubation mit 100 μM Dipyridamol (DIP) ($r^2 = 0,989; 0,998$). **(b)** Nach 2 h Vorinkubation mit 5 mM JAA (JAA) ($r^2 = 0,994; 0,999$).



2.3.3.2 Aufnahme von Guanosin durch ausgewachsene Oozyten nach Vorinkubation mit Dipyridamol (DIP) und mit Jodacetamid (JAA)

Die Vorinkubation mit 100 μM Dipyridamol (DIP) hatte keinen deutlichen Einfluss auf die Aufnahme von Guanosin durch reife Oozyten (**Abb. 42 a.**). Die Behandlung der großen Oozyten mit 5 mM JAA hatte dagegen einen deutlichen Einfluss auf die Aufnahme von Guanosin (**Abb. 42 b.**). Bei Angebotskonzentrationen bis 100 $\mu\text{mol/l}$ Guanosin hatte sich die Aufnahme sogar leicht erhöht, während sie bei höheren Konzentrationen, im Gegensatz zur Kontrolle, in eine deutliche Sättigung überging. Ein ganz ähnliches Phänomen konnte nach JAA-Vorinkubation schon bei der Aufnahme von Inosin durch reife Oozyten beobachtet werden.

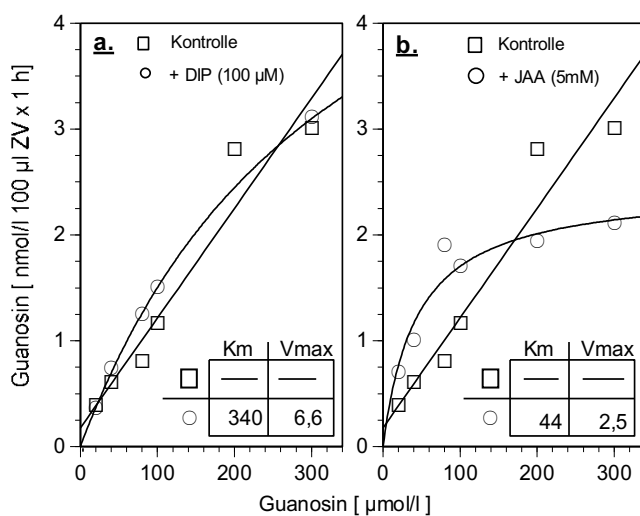


Abb. 42 (a+b): Aufnahme von Guanosin durch reife Oozyten: (a) Nach 2 h Vorinkubation mit 100 $\mu\text{mol/l}$ Dipyridamol (DIP). (b) Nach 2 h Vorinkubation mit 5 mM JAA ($r^2 = 0,914; 0,999$).

Ausgewachsene Oozyten nehmen Guanosin in einem nahezu linear-proportionalen Verhältnis zur angebotenen Konzentration auf (**Abb. 42 a + b**). Die Kenndaten K_m und V_{max} für eine Sättigungskinetik konnten hier daher nicht bestimmt werden. Schon bei den mittelgroßen Oozyten (**Abb. 39 a**) gelangte Guanosin im physiologischen Konzentrationsbereich zu einem großen Teil durch **nicht-sättigbare** Aufnahme in die Zellen, der Anteil dieses linearen Systems scheint bei den ausgewachsenen Keimzellen noch mehr an Bedeutung gewonnen zu haben.

2.3.4 Charakterisierung des Inosintransports männlicher Keimzellen

2.3.4.1 Vorinkubation der Spermatogonien mit Jodacetat (JAC), Nitrobenzylthioinosin (NBTI) und Perchloromercuribenzoat (PCMB):

Spermatogonien wurden 4 h lang mit 5 mM JAC vorinkubiert. Die anschließende Messung der Aufnahme von Inosin in Abhängigkeit von der Substratkonzentration ist in **Abb. 43 a.** dargestellt.

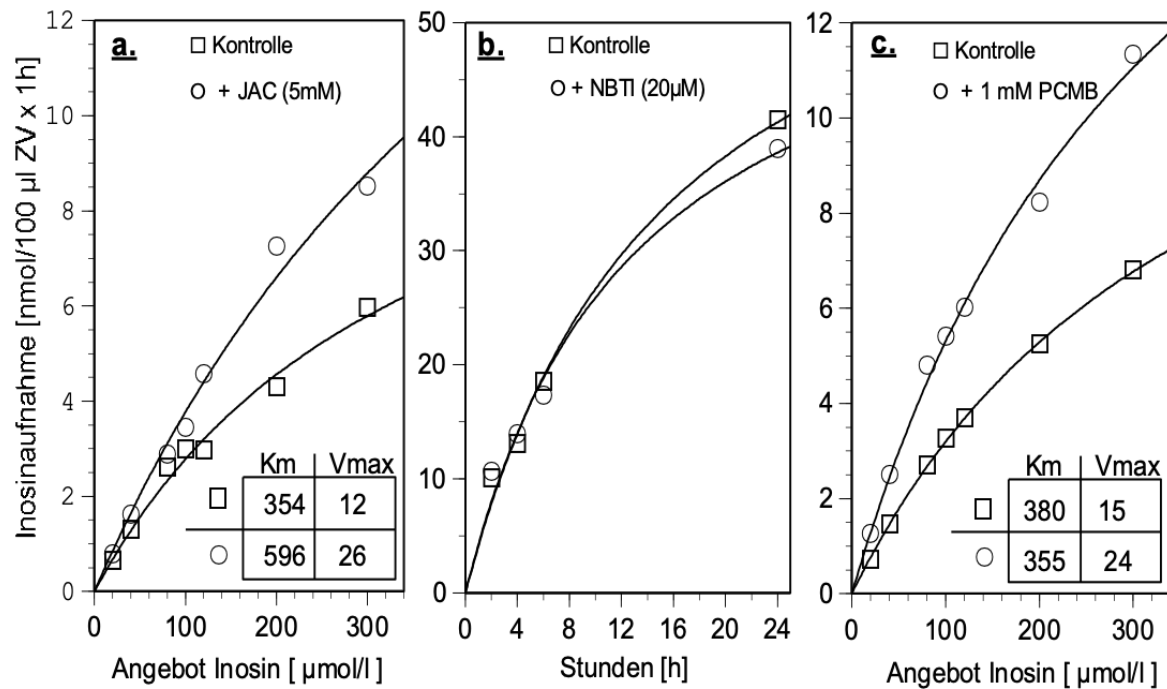


Abb. 43 (a-c): Aufnahme von Inosin durch Spermatogonien II. Ordnung (Spg II.) in Abhängigkeit von der Konzentration und von der Zeit: (a) 4 h Vorinkubation mit 5 mM JAC (JAC) ($r^2 > 0,986$); (b) 3 h Vorinkubation mit 20 μ mol/l Nitrobenzylthioinosin (NBTI) - Zeitkinetik nach Vorinkubation bei einem Inosinangebot von 100 μ M; (c) 3 h Vorinkubation von Spg II mit 1 mM Perchloromercuribenzoat (PCMB) ($r^2 > 0,999$).

JAC führte zu einer verstärkten Aufnahme, und zwar hauptsächlich im Angebotsbereich über 100 μ mol/l Inosin, also oberhalb der physiologischen Konzentration von Inosin in der Cölomflüssigkeit. Der Wert für V_{max} hatte sich durch die Vorinkubation im Vergleich zur Kontrolle etwas mehr als verdoppelt; der K_m -Wert von 354 auf 596 μ M erhöht. Der Einfluss von JAC auf den ATP-Gehalt der Spg. II wurde nicht getestet.

Die Vorinkubation mit 20 μ M NBTI hatte auf die Aufnahme von Inosin durch Spermatogonien keinen Einfluss siehe (Abb. 43 b). Auch nach 24 h in Kultur, bei einem konstanten Angebot von 100 μ M Inosin, war kein deutlicher Unterschied der Aufnahmeraten zwischen der Kontrolle und dem mit NBTI vorinkubierten Ansatz erkennbar. 1 mM PCMB führte, wie auch JAC, zu einer deutlichen Steigerung der Inosinaufnahme bei Spg II (siehe Abb. 43 c). Der K_m Wert wurde nur leicht verändert. Er verringerte sich von 380 μ M in der Kontrolle auf 355 μ M im JAC behandelten Ansatz. V_{max} hatte sich dagegen deutlich von 15 auf 24 μ mol/ 100 μ l ZV x 1h erhöht.

2.3.4.2 Vorinkubation der Spermatogonien mit Jodacetamid (JAA):

Die Aufnahme von Inosin durch Spermatogonien zeigte bereits bei den unbehandelten Kontrollzellen, ab einer Inosinkonzentration von 200 μ mol/l, einen Übergang von einer sättigbaren in eine nicht-sättigbare Aufnahme (siehe Abb. 44 a.). Dieses „Durchbrechen“ eines linearen Systems war auch bei der Aufnahme von Guanosin durch Spermatogonien II (siehe Abb. 50) zu beobachten gewesen. Eine solche biphasische Kinetik ließ das

Vorhandensein von wenigstens zwei verschiedenen Transportsystemen vermuten. In Analogie zum Verhalten der Oozyten wurde auch von den Spermatogonien erwartet, dass JAA auf einen ATP-abhängigen Anteil der Transportkinetik hemmend wirken würde. Die Spermatogonien wurden 30, 60 und 180 min lang mit jeweils 5 mM JAA vorinkubiert, um die Inkubationsdauer herauszufinden, bei der das erwartete ATP-abhängige, sättigbare Transportsystem völlig unterdrückt wird. Die **Abb. 44 a.** zeigt die Ergebnisse dieser Hemmung mit JAA. Je länger die Spermatogonien mit 5 mM JAA vorbehandelt wurden, desto gradliniger entwickelte sich der Zusammenhang zwischen Inosinangebot und Inosinaufnahme. Die Spermatogonien zeigten schließlich nach einer einstündigen Vorinkubation mit JAA bei allen Angebotskonzentrationen nur noch eine lineare Aufnahme, die man, wie schon bei den Oozyten gezeigt, als ATP-unabhängige Aufnahme bezeichnen kann. Die einstündige Vorinkubation mit 5 mM JAA hatte auch einen deutlichen Einfluss auf den ATP-Gehalt der Spermatogonien. Der ATP-Gehalt in den so vorbehandelten Spermatogonien hatte sich im Vergleich zu den Kontrollen ohne JAA-Behandlung um etwa 45 % reduziert (**Abb. 44 b**). In der **Abb. 45 a-c** werden die Ergebnisse nach Vorinkubation der Spermatogonien mit 5 mM JAA in einem zweiten Versuch gleicher Art dargestellt. Die Kontrolle zeigte zwar diesmal kein „Durchbrechen“ eines linearen Systems, dennoch offenbarte sich auch in diesem Fall nach Vorinkubation mit 5 mM JAA die Beteiligung eines nicht-sättigbaren Aufnahme. Die Diffusionsgeschwindigkeit von Inosin belief sich bei dieser linearen Aufnahme auf $V_{\text{diff}} = 0,014 \text{ nmol}/100 \mu\text{l ZV} \times 1\text{h}$.

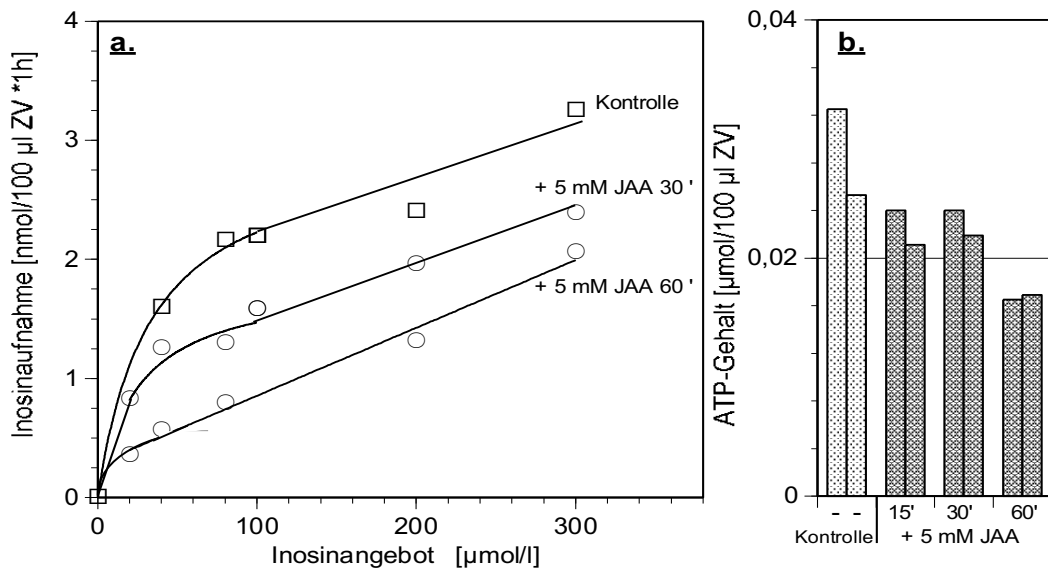


Abb. 44 (a+b): Inhibition der Inosinaufnahme bei Spermatogonien II. Ordnung (Spg II.) durch JAA. (a) 30, 60 und 180 min Vorinkubation mit 5 mM JAA; (b) Einfluss von 5 mM JAA nach 15, 30 und 60 min Vorinkubation auf den intrazellulären ATP-Gehalt der Spg II. Kontrolle jeweils ohne JAA (Doppelbestimmung).

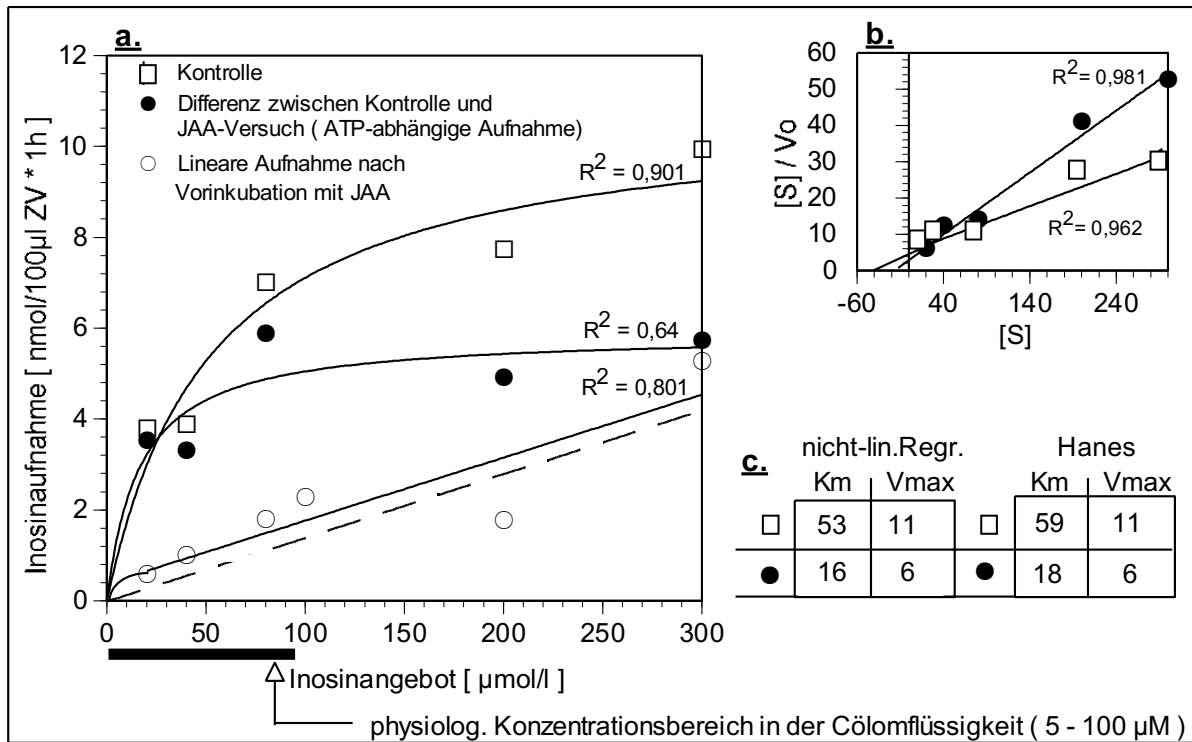


Abb. 45 (a-c) : Darstellung der Aufnahme von Inosin durch Spermatogonien II. nach Vorbehandlung mit JAA: (a) Nach 1 stündiger Vorinkubation mit 5 mM JAA verbleibt eine

lineare Aufnahme (○); nach Abzug der linearen Aufnahme von den Kontrollwerten (□) erhält man die Kennlinie der resultierenden, ATP-abhängigen Aufnahme (●); (b) Berechnung der apparenten K_m und V_{max} für die Kontrolle (□) und die ATP-abhängige Aufnahme (●) im Hanes-Plot; (c) Tabelle: Berechnung von K_m und V_{max} durch nicht-lineare Regression und nach Hanes im Vergleich.

Das ATP-abhängige Aufnahmesystem ging ab einem Inosinangebot von etwa 50 $\mu\text{mol/l}$ Inosin in Sättigung über. Der apparente K_m -Wert dieses Systems, berechnet nach Hanes, hatte sich im Vergleich zur Kontrolle von 59 auf 18 $\mu\text{mol/l}$ erniedrigt. Der apparente V_{max} -Wert hatte sich ebenfalls deutlich von 11 auf 6 $\text{nmol}/100 \mu\text{l ZV} \times 1\text{h}$ verringert (Berechnung nach Hanes).

2.3.4.3 Aufnahme von Inosin im Na^+ -armen Medium und in Gegenwart von Ouabain

Durch Na^+ -Mangel im Medium wurde die Aufnahme von Inosin durch Spermatogonien vor allem im physiologischen Konzentrationsbereiches von Inosin (5 - 100 μM) etwas stärker gehemmt als bei den Oozyten. Der V_{max} -Wert in dem Ansatz mit Na^+ -armen Medium reduzierte sich im Vergleich zur Na^+ -haltigen Kontrolle nur von 13 auf 10 μM . Der K_m -Wert hatte sich von 25 auf 38 $\mu\text{mol}/100 \mu\text{l ZV} \times 1\text{h}$ erhöht (siehe

Abb. 46 a). Um die Frage nach der Beteiligung einer Na^+/K^+ -ATPase an der Aufnahme von Inosin sicher beantworten zu können, wurden die Spermatogonien außerdem in Anwesenheit von 3 mM Ouabain inkubiert (

Abb. 46 b.). Bis zu einem Angebot von 80 $\mu\text{mol/l}$ Inosin hatte das Ouabain keinen Effekt auf die Inosinaufnahme. Erst ab einem Inosinangebot von 100 $\mu\text{mol/l}$ war eine leichte Erhöhung der Aufnahme zu beobachten. Der Wert für V_{max} hatte sich kaum verändert (15 - 13,5 $\text{nmol}/100 \mu\text{l ZV}$) während sich der K_m -Wert durch das Ouabain im Vergleich zur Kontrolle von 280 auf 365 μM deutlich erhöht hatte.

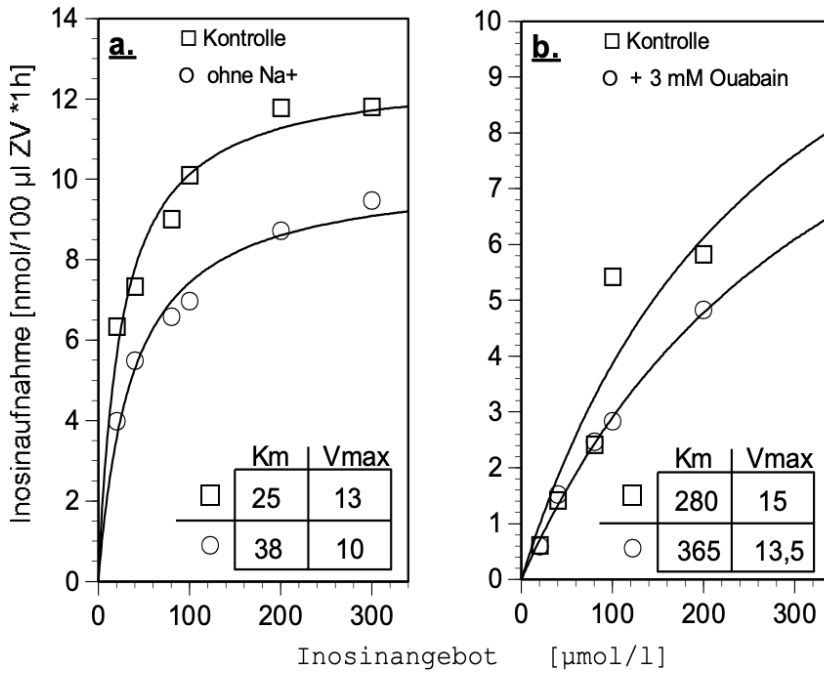


Abb. 46 (a+b): Aufnahme von Inosin durch Spermato-gonien II. Ordnung (Spg II.): (a) nach 3 h Inkubation in Na⁺-freiem Medium (É). (b) Aufnahme von Inosin nach 3 h Inkubation in Gegenwart von 3 mM Ouabain (É). ($r^2 = 0,85 - 0,995$).

2.3.4.4 Aufnahme von Inosin in Gegenwart von Guanosin

Die Aufnahme von Inosin durch Spermato gonien wurde in Anwesenheit von Guanosin stark gehemmt (**Abb. 47 a**). Man sieht, dass die Zugabe von 100 $\mu\text{mol/l}$ Guanosin den K_m -Wert der Inosinaufnahme von 70 auf 290 μM erhöhte hatte, der V_{max} Wert blieb dabei nahezu unverändert (Werte berechnet nach Hanes). Inosin könnte den Hemmstoff, in diesem Fall Guanosin, bei sehr großem Überschuss verdrängen; V_{max} verändert sich dadurch nicht. Dieses Aufnahmeverhalten deutet, wie schon bei den Oozyten gezeigt, auf eine kompetitive Hemmung hin. Der K_i Wert beträgt 24 μM . Er ist also deutlich kleiner als der K_m -Wert der ungehemmten Kontrolle mit 70 μM .

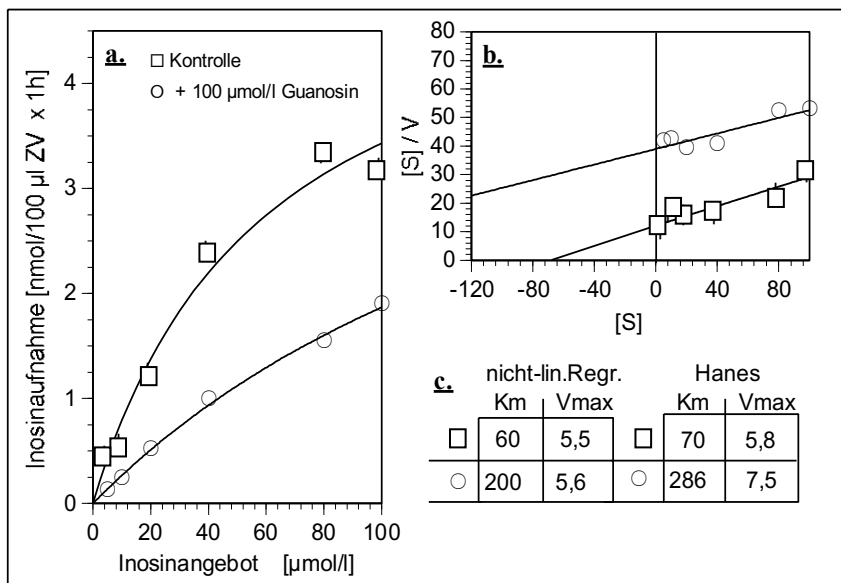


Abb. 47 (a-c): (a) Aufnahme von Inosin ohne ($r^2 = 0,976$) und in Gegenwart von 100 $\mu\text{mol/l}$ Guanosin ($r^2 > 0,996$); (b) Hanes-Plot zur Bestimmung von K_m und V_{max} , ($r^2 = 0,876 ; 0,811$); (c) Tabelle: K_m und V_{max} -Werte berechnet durch nicht-lineare Regression (nicht-lin.Regr.) und nach Hanes im Vergleich.

2.3.4.5 Ausstrom von Inosin aus Spermatogonien:

Die Spermatogonien wurden 3 h lang mit ^{14}C -Inosin inkubiert und anschließend viermal gründlich gewaschen; danach war in der Waschlösung immer noch eine etwas erhöhte, Aktivität messbar. Die Zellen wurden aber nicht noch einmal gewaschen, um sie nicht zu schädigen. In einem Aliquot der Zellen wurde die nach 3 h aufgenommene Aktivität im Radioaktivitätszähler gemessen. Die restlichen Zellen wurden in ein Medium ohne ^{14}C -Inosin verbracht. Nach 0, 1, 6 und 24 h wurde den Kulturen etwas Medium entnommen und im Zähler auf vorhandene Radioaktivität getestet. Gleich nachdem die Zellen in Medium ohne radioaktives Inosin verbracht waren (Stunde 0) konnten relativ hohe Aktivitäten in diesem Medium gemessen werden, ein Großteil des aufgenommenen Inosins hat die Spermatogonien demnach sofort wieder verlassen (**Abb. 48**). Die im Medium gemessenen Aktivitäten nahmen zwar im Lauf der nächsten Stunden wieder etwas ab, was auf eine gewisse Aufnahme des zuvor ausgeströmten Inosins durch Spermatogonien beruhen könnte, erreichten nach 24 h aber wieder den zur Stunde 0 gemessenen Wert.

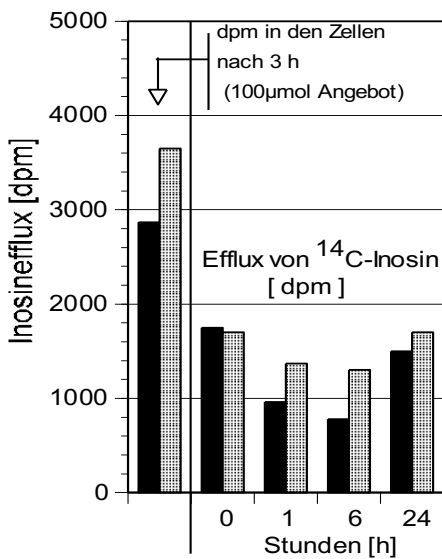


Abb. 48: Die linke Spalte gibt die Aktivität in den Spermatogonien II. Ordnung nach 3 h Inkubation mit ¹⁴C-markiertem Inosin (Angebot von 100 µmol/l Inosin) an. Zum Test auf Inosin-Efflux wurden die Zellen danach entnommen, gründlich gewaschen und bis zu 24 h in Medium ohne ¹⁴C-markiertes Inosin verbracht. Nach 0, 1, 6 und 24 h wurde etwas Medium entnommen und die abgegebene Aktivität im Zähler gemessen (Doppelbestimmung).

2.3.5 Charakterisierung des Guanosintransports männlicher Keimzellen

2.3.5.1 Vorinkubation der Spermatogonien mit Perchloromercuribenzoat (PCMB)

Die Vorinkubation von Spermatogonien mit 1 mM PCMB hatte eine sehr starke Hemmung der Aufnahme von Guanosin zur Folge (siehe **Abb. 49**). PCMB führte vor allem bei Angebotskonzentrationen bis 100 µmol/l Guanosin zu einer starken Hemmung, darüber schien die Aufnahme unter PCMB-Einfluss in eine nicht-sättigbare Aufnahme überzugehen. Die Zugabe von PCMB hatte den K_m -Wert der Guanosinaufnahme zwar deutlich erhöht (nach Hanes von 16,8 auf 120 µM), der V_{max} Wert blieb aber ziemlich unverändert (nach Hanes von 5,8 auf 5,9 nmol/ 100 µl ZV x 1 h).

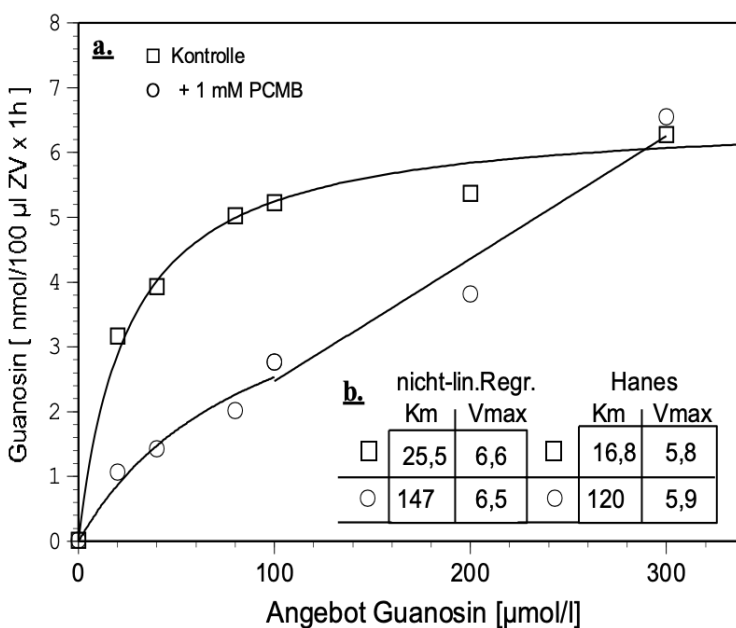


Abb. 49: Aufnahme von Guanosin durch Spermatogonien II. Ordnung: (a) Nach 3 h Vorinkubation mit 1 mM PCMB ($r^2 = 0,986; 0,987$); (b)Tabelle : K_m und V_{max} -Werte berechnet durch nicht-lineare Regression und nach Hanes im Vergleich.

2.3.5.2 Vorinkubation der Spermatozoen mit Jodacetamid (JAA):

Die Aufnahme von Guanosin durch Spermatozoen zeigte bereits bei der unbehandelten Kontrolle, ab einer Guanosinkonzentration von 200 $\mu\text{mol/l}$, einen Übergang von einer sättigbaren in eine nicht-sättigbare Kinetik (**Abb. 50 a.**).

Nach Vorinkubation mit 5 mM JAA erhielt man für die Aufnahme von Guanosin fast ausschließlich eine nicht-sättigbare Aufnahmekinetik. Diese nicht-sättigbare Aufnahme kam aber erst ab einer Substratkonzentration von 100 μM Guanosin zum Tragen, also weit außerhalb des physiologischen Konzentrationsbereiches. Die Diffusionsgeschwindigkeit für dieses System betrug $V_{\text{diff}} = 0,009 \text{ nmol}/100 \mu\text{l ZV} \times 1\text{h}$. Die Kennlinie der nach Vorinkubation mit 5 mM JAA verbliebenen, linearen Aufnahme konnte auch in diesem Fall von der hyperbolischen Funktion, dh, den Kontrollwerten abgezogen werden. Auf diese Weise erhielt man nur noch eine resultierende, ATP-abhängige Aufnahme. Die ATP-abhängige Aufnahme ging bereits ab einem Angebot von etwa 25 - 50 $\mu\text{mol/l}$ Guanosin in eine Sättigung über. Weder der apparente K_m - noch der V_{max} -Wert der ATP-abhängigen Aufnahme, berechnet nach Hanes, hatte sich im Vergleich zur Kontrolle sehr verändert (siehe **Abb. 50 c**).

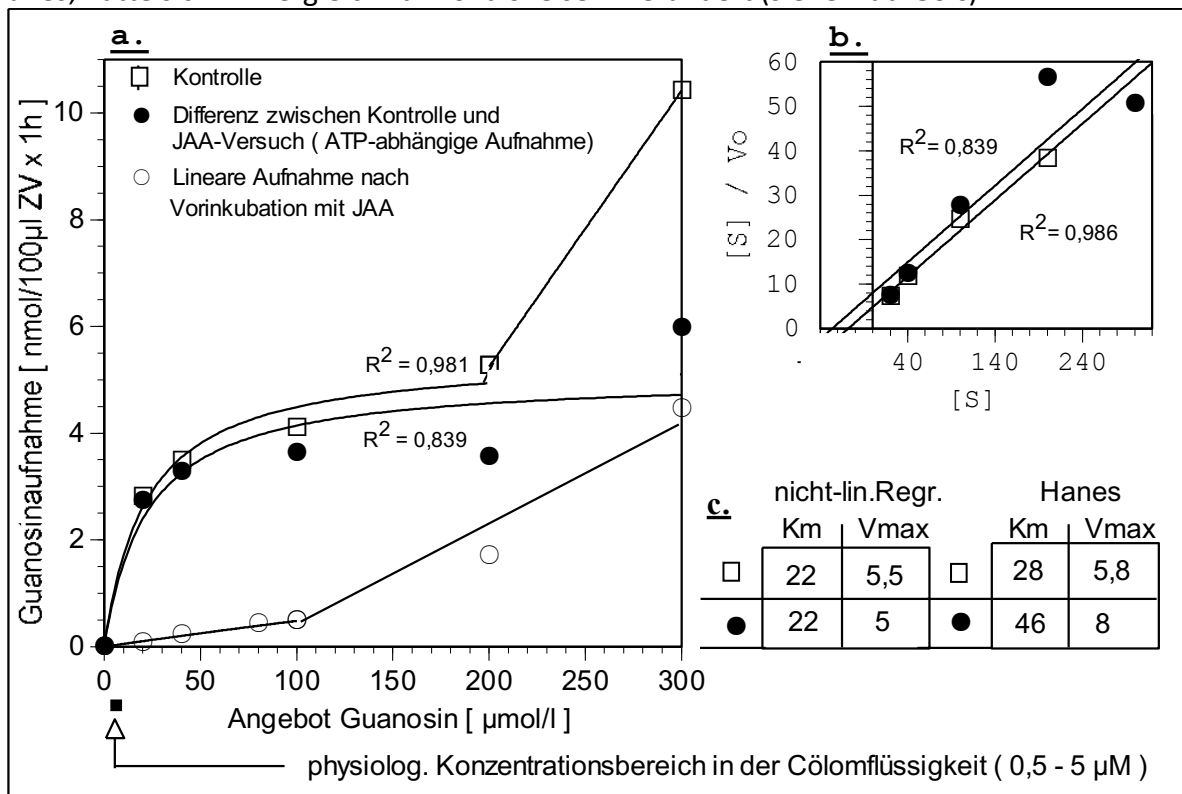


Abb. 50 (a-c): Darstellung der Aufnahme von Guanosin durch Spermatozoen II. nach Vorbehandlung mit JAA : (a) Nach 1 stündiger Vorinkubation mit 5 mM JAA verbleibt eine lineare Abhängigkeit der Aufnahme von der Angebotskonzentration (○); nach Abzug dieser linearen Aufnahme von den Kontrollwerten (□) erhält man die Kennlinie der resultierenden, ATP-abhängigen Aufnahme (●); (b) Berechnung der apparenten K_m und V_{max} für die Kontrolle (□) und die ATP-abhängige Aufnahme (●) im Hanes-Plot; (c) Tabelle: Berechnung von K_m und V_{max} durch nicht-lineare Regression und nach Hanes im Vergleich.

2.3.6 Charakterisierung des Inosin- bzw. Guanosintransports bei Spermien

Fast reife Spermien von *Nereis virens* wurden 2 h mit 100 μ M Dipyridamol (DIP) vorinkubiert, anschließend wurde die Aufnahme von Inosin gemessen (**Abb. 51 a.**). DIP hatte eine vollständige Linearisierung des Zusammenhangs zwischen Inosinangebot und Inosinaufnahme zur Folge. Dadurch wurde die Inosinaufnahme nur im Konzentrationsbereich unter 200 μ mol/l leicht gehemmt; im darüber liegenden Konzentrationsbereich wurde die Inosinaufnahme sogar leicht gesteigert. Eine zehninütige Vorinkubation der Spermien mit 1 mM JAA hatte erstaunlicherweise einen ähnlichen Effekt (**Abb. 51 b.**). Sowohl die Werte für K_m als auch für V_{max} stiegen stark an. Die **Abb. 51 c.** zeigt, dass NBTI die Inosinaufnahme bei Spermien nicht beeinflussen konnte.

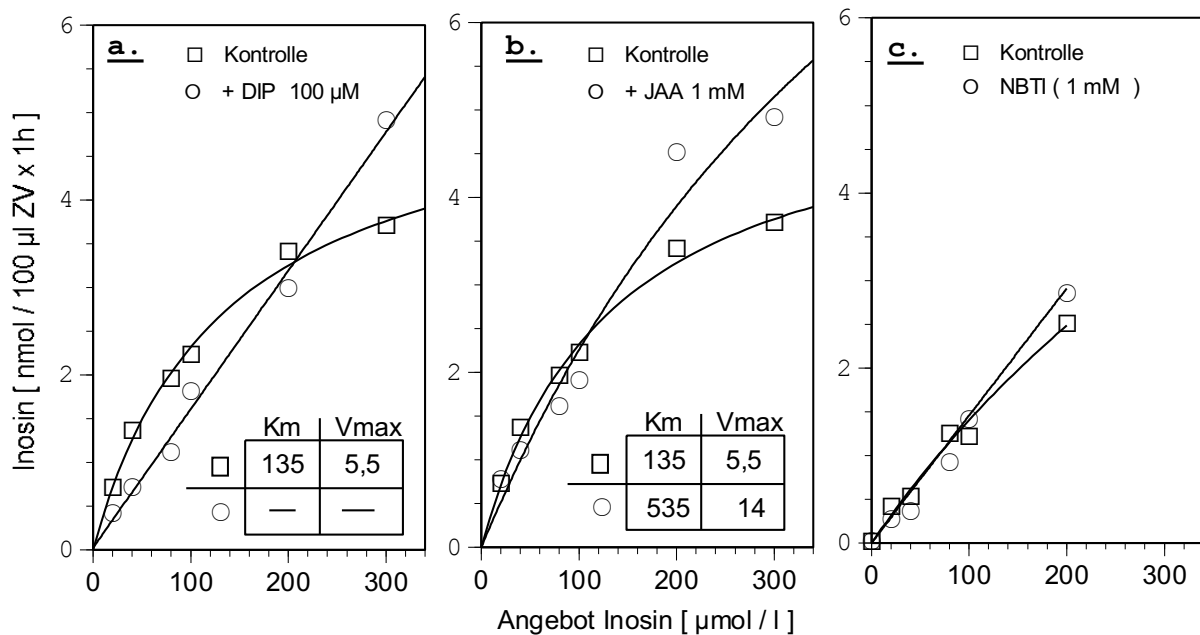


Abb. 51 (a-c): Aufnahme von Inosin durch reife Spermien nach Vorinkubation mit verschiedenen Hemmsubstanzen: (a) 2 h Vorinkubation mit 100 μ M Dipyridamol (DIP); (b) 10' Vorinkubation mit 1mM JAA; (c) 2 h Vorinkubation mit 1 mM NBTI. ($r^2 = 0,956 - 0,991$).

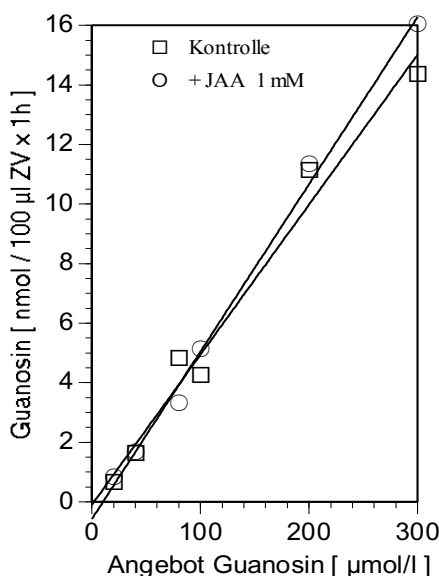


Abb. 52 : Zweistündige Vorinkubation fast reifer Spermien von *N. virens* mit 1 mM JAA ($r^2 = 0,978 - 0,995$).

In der **Abb. 52** ist die Aufnahme von Guanosin durch Spermien nach Vorinkubation mit 1 mM JAA dargestellt. Bereits die lineare Kinetik der Kontrollwerte ließ vermuten, dass die Spermien Guanosin nur noch **ATP-unabhängig** aufnehmen. Die Vorinkubation mit JAA hatte dementsprechend keinen Einfluss auf die Guanosinaufnahme mehr.

2.3.7 Zusammenfassung der Ergebnisse (Nukleosidtransportsysteme)

Die Wirkungen verschiedener Inhibitoren auf die Nukleosidaufnahme durch Keimzellen beiderlei Geschlechts von *Nereis virens* sind in der folgenden Tabelle noch einmal zusammengefasst:

Inhibitor bzw. Mangelmedium	reaktive Gruppe	Effekt auf die Aufnahme bei :	
		Oozyten	Spg + Spermien
Cyanide (zB KCN)	Fe, Cu, Zn, etc (sehr unspezifische Wirkung)	kein Effekt	nicht getestet
Jodacetat (JAC)	Sulfhydryl-,imidazol-, carboxyl-, thioethergruppen (Zubay, 1988)	kein Effekt	Erhöhung der Ino Aufnahme
Jodacetamid (JAA)	Sulfhydrylgruppen (zB. D- G3-P-dehydrogenase der Glykolyse)	Hemmt die ATP-abhängige Aufnahme von Ino und Gua; steigert die Ino.- und Gua.- Aufnahme bei reifen Oozyten	Hemmt ATP-abhängige Aufnahme von Ino und Gua; ohne bzw. geringer Einfluss auf die Ino und Gua Aufnahme bei Spermien
Perchloromercuri- benzoat (PCMB)	Sulfhydrylgruppen Inhibitor der erl.Diff ohne Einfluss auf Kinasen (Plagemann und Erbe, 1972)	Hemmt die Aufnahme von Ino und Gua	Steigert Aufnahme von Ino und hemmt die Aufnahme von Gua
Nitrobenzylthioinosin (NBTI)	Hydrophobe Gruppen; Inhibitor der erl.Diff (siehe Williams et al, 1991)	kein Effekt	Kein Effekt
Ouabain	hemmt Na ⁺ /K ⁺ - ATPase (Tobin et al, 1970)	Geringer bis keinen Effekt auf die Aufnahme von Ino	Geringer bis keinen Effekt auf die Aufnahme von Ino
Na ⁺ - Mangelmedium	hemmt Na ⁺ gekoppelten Transport von Nukleosiden	Geringer Effekt auf die Aufnahme von Ino	Geringer Effekt auf die Aufnahme von Ino; bei Spg II leichte Hemmung der Ino Aufnahme
Quercetin	hemmt Ca ⁺ /K ⁺ ATPase (Lang et al, 1974)	Kein Effekt auf die Aufnahme von Ino	nicht getestet
Dipyridamol (DIP)	Hemmt Kinaseaktivität (?) Inhibitor der erl. Diff. (Williams, 1991)	Steigert die Aufnahme von Ino bei reifen Oozyten	Leichte Hemmung der Aufnahme von Ino bei Spermien; bei Spg II nicht getestet

2.4 Metabolismus von Inosin und Guanosin in Keimzellen von *Nereis virens*

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit, neben der Bestimmung der Aufnahmekinetiken für Purinnukleoside, war es die physiologische Bedeutung der aufgenommenen Nukleoside für die Reifung der Keimzellen zu untersuchen. Dazu wurden Oozyten und männliche Keimzellen verschiedener Reifungsstadien 2 - 96 h mit ^{14}C -markiertem Inosin bzw. Guanosin inkubiert. Da zu vermuten war, dass aufgenommene Nukleoside von den Keimzellen für die RNA- bzw. DNA-Synthese verwendet werden, wurden die Zellen in die RNA, und DNA aber auch in die säurelösliche, die Lipid- und die Proteinfraction aufgetrennt (siehe **Kapitel 1.4**). Die Verteilung der Radioaktivität auf diese fünf Fraktionen wurde nach Inkubation mit ^{14}C -Inosin bzw. ^{14}C -Guanosin bestimmt. Diese Betrachtungsweise beantwortet nicht wie groß die Anteile der exogenen Purinnukleoside an den intrazellulären Gehalten der Purinnukleoside bzw. Purinmetabolite sind. Um dieser Frage nachzugehen wurden die über einen Zeitraum von bis zu 96 h mit ^{14}C -Inosin bzw. ^{14}C -Guanosin inkubierten und in die säurelösliche, die RNA- und DNA-Fraction aufgetrennten Keimzellen mittels HPLC untersucht; die aufgetrennten, Substanzen wurden anschließend im Radioaktivitätszähler gemessen (siehe **Kapitel 2.4.2 und 2.4.5**).

Durch die Charakterisierung der Nukleosidmetabolite mittels HPLC und die Bestimmung ihrer Aktivitäten im Radioaktivitätsmonitor bzw. -zähler (siehe **Kapitel 1.5.7**) war es außerdem möglich die Reaktionswege der aufgenommenen Nukleoside im Purin-Stoffwechsel der Keimzellen beiderlei Geschlechts zu rekonstruieren und die Stoffwechselbilanzen des exogenen Inosins bzw. Guanosins entlang der verschiedenen Stoffwechselwege zu bestimmen (siehe **Kapitel 2.4.3 und 2.4.6**).

2.4.1 Einbau radioaktiv markierter Nukleoside in DNA, RNA, Lipid und Protein der Oozyten

Oozyten unterschiedlicher Stadien wurden 24 h lang in einem Medium inkubiert, das neben einem standardisierten Angebot von 60 μM nicht-markiertem Inosin bzw. Guanosin jeweils auch eine geringe Menge ^{14}C -markiertes Inosin bzw. ^{14}C -Guanosin enthielt. Die so inkubierten Oozyten wurden homogenisiert und durch eine Reihe von Trennverfahren (siehe **Kapitel 1.4**) in die säurelösliche Fraction, in die RNA, die DNA und in die Lipidfraction aufgetrennt. Dabei erwiesen sich alle vier Fraktionen als markiert. In der **Abb. 53 a.+b** ist das Ausmaß dieser Markierung in den einzelnen Fraktionen als Prozentwert von der in den Oozyten nach 24 h gemessenen **Gesamtaktivität** angegeben. Dabei waren deutliche Unterschiede im Markierungsmuster zwischen Keimzellen unterschiedlicher Reifungsstadien zu erkennen. Der überwiegende Teil des aufgenommenen Inosins bzw. Guanosins war nach 24 h in der säurelöslichen Fraction verblieben: Die säurelösliche Fraction enthielt je nach Reifungsstadium zwischen 75 und fast 98 % des aufgenommenen ^{14}C -Inosins und zwischen 78 und 90 % des ^{14}C -Guanosins (Daten in **Abb. 53 a.+b** nicht angegeben). Der geringere Teil des aufgenommenen ^{14}C -Inosins bzw. ^{14}C -Guanosins wurde demnach in die RNA, die DNA und in das Lipid eingebaut. Bei sehr jungen Oozyten (April) waren 8 % des aufgenommenen ^{14}C -Inosins in der RNA zu finden (**Abb. 53 a.**). Im Juli belief sich der Einbau in die RNA nur noch auf etwa 1 %. Bei Oozyten in der schnellen Wachstumsphase (Oktober bzw. Dezember) war der Anteil des ^{14}C -Inosins in der RNA mit 4-17 % wieder deutlich höher.

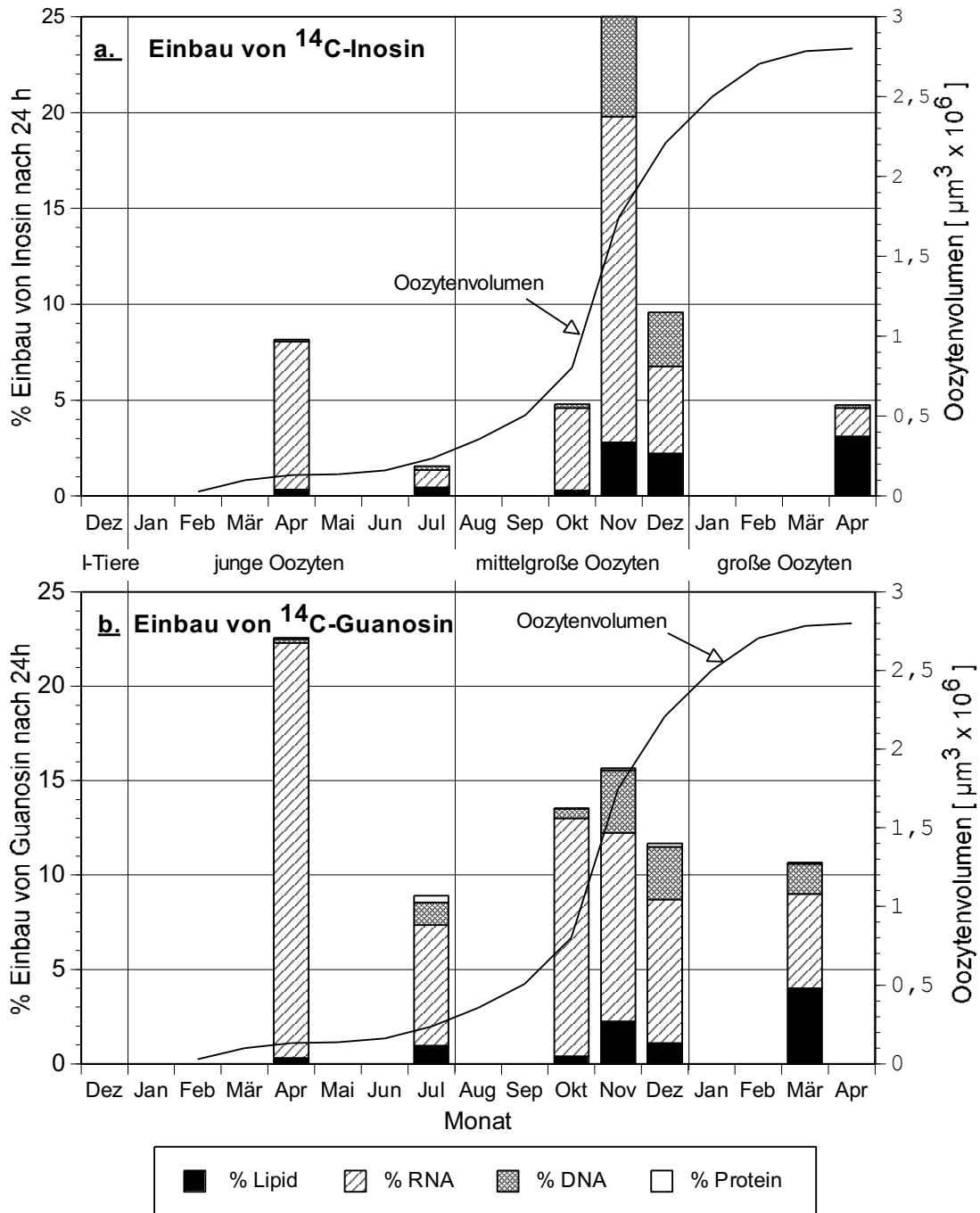


Abb. 53 a+b : Einbau von ^{14}C -Inosin bzw. ^{14}C -Guanosin in die Nukleinsäuren, in das Lipid und in das Protein von Oozyten verschiedener Reifungsstadien nach 24 h. Die linke Ordinate gibt den Einbau in % vom insgesamt inkorporierten ^{14}C -Nukleosid an; die rechte Ordinate das Oozytenvolumen in $\mu\text{m}^3 \times 10^6$.

Ausgewachsene Oozyten bauten dagegen nur noch etwa 2 % des Inosins in die RNA ein. Ganz ähnliche Verhältnisse ergaben sich für den Einbau von ^{14}C -Guanosin in die RNA (**Abb. 53 b**). Guanosin wurde zu 22 % in die RNA junger Oozyten eingebaut. Dieser hohe Anteil nahm mit 6 % wie auch schon der Einbau von ^{14}C -Inosin im Juli deutlich ab und stieg in der schnellen

Wachstumsphase mit 7 - 13 % wieder leicht an. Bei fast ausgewachsenen Oozyten (März) war der Anteil des ^{14}C -Guanosins in der RNA mit 5 % deutlich geringer.

Ganz anders verhielt sich der Einbau von ^{14}C -Inosin bzw. Guanosin in die DNA. Junge Oozyten (April - Juli) bauten lediglich 0,1 - 0,3 % des aufgenommenen ^{14}C -Inosins in die DNA ein. Der Einbau in die DNA steigerte sich erst während der schnellen Wachstumsphase von 0,2 % im Oktober auf fast 7 % im November und 3 % im Dezember. Bei ausgewachsenen Oozyten war mit weniger als 0,2 % fast kein Einbau von ^{14}C -Inosin in die DNA mehr festzustellen. Der Einbau von ^{14}C -Guanosin in die DNA folgte im Prinzip demselben Muster, mit dem Unterschied, dass ausgewachsene Oozyten mit 1,5 % noch etwas mehr ^{14}C -Guanosin in die DNA einbauten. Nicht nur der fortlaufende Einbau von Inosin in die DNA ist erstaunlich, die Oozyten aller untersuchten Reifungsstadien bauten ^{14}C -Inosin und ^{14}C -Guanosin zudem in die Lipidfraktion ein. Während der Einbau dieser Nucleoside in das Lipid junger Oozyten noch sehr gering war (0,4 % Inosin bzw. 0,2 % Guanosin) stieg der Einbau von Nucleosiden in das Lipid im Verlauf der schnellen Wachstumsphase an; im November betrug der Anteil des eingebauten ^{14}C -Inosins fast 3 % und der des ^{14}C -Guanosins etwa 2 %. Bei ausgewachsenen Oozyten erhöhte sich der Prozentsatz eingebauter Nucleoside nochmals leicht auf etwas über 3 % ^{14}C -Inosin bzw. 4 % ^{14}C -Guanosin. ^{14}C -Inosin und ^{14}C -Guanosin wurden im Verlauf des Oozytenwachstums auch in die Proteinfraction von Oozyten eingebaut; der Einbau lag allerdings immer deutlich unter 0,5 %.

2.4.2 Anteil exogener Nucleoside am Nucleosidstoffwechsel der Oozyten

In einem weiteren Ansatz wurden die Oozyten während unterschiedlicher Zeitintervalle (2 bis 96 h) in einem Medium inkubiert, das neben 60 μM nicht-markiertem Inosin bzw. Guanosin auch ^{14}C -markiertes Inosin bzw. Guanosin enthielt. Die so inkubierten Oozyten wurden anschließend in die säurelösliche-, die RNA- und DNA-Fraktion aufgetrennt. In den Fraktionen wurden mittels HPLC die intrazellulären Konzentrationen der Purinnucleoside und -metabolite gemessen; der Grad der Markierung der aufgetrennten Substanzen wurde anschließend im Radioaktivitätszähler bestimmt. Anhand der Radioaktivität konnte, bei bekannter spezifischer Aktivität des im Medium angebotenen Inosins bzw. Guanosins, berechnet werden, wieviel der intrazellulären Purinnucleoside bzw. Purinnucleoside aus exogenen Purinnucleosiden entstanden waren.

Die **Tabelle 4** zeigt die absoluten und relativen Anteile der exogenen Purinnucleoside und der aus exogenen Purinnucleosiden entstandenen Metabolite (**Exogen**) am Purinnucleosidpool und an den Purinmetaboliten (**Gesamt**) nach 48 stündiger Inkubation mit ^{14}C -Inosin bzw. ^{14}C -Guanosin in der säurelöslichen, in der RNA- und DNA-Fraktion von Oozyten unterschiedlicher Reifungsstadien. Der zeitliche Verlauf der Aufnahme von Inosin bzw. Guanosin bzw. deren Umbau zu den entsprechenden Nucleotiden wird exemplarisch nur bei den schnell wachsenden Oozyten besprochen.

Das erste was man der **Tabelle 4** (linke Tabellenhälfte) entnehmen kann ist, dass nach Inkubation mit ^{14}C -Inosin ein Teil des aufgenommenen Inosins in nicht-metabolisierter Form in den Oozyten verblieben war. Der Anteil des aufgenommenen; nicht-metabolisierten Inosins am Inosinpool der Oozyten bei steigendem Oozytendurchmesser zu; gleichzeitig nahm die Gesamt-Inosinmenge in den wachsenden Oozyten stark ab (siehe dazu auch Rebscher, 1992). Bei Oozyten in der schnellen Wachstumsphase (146 μm \varnothing) bestand der Inosinpool nach 48 h nahezu vollständig aus exogenem Inosin.

		48 h Inkubation mit ¹⁴ C-Inosin				48 h Inkubation mit ¹⁴ C-Guanosin			
		Oozyten- ?	60 µm	113 µm	146 µm	60 µm	100 µm	142 µm	176 µm
Inosin	Gesamt	2.5	2.1	0.52		1.1	0.22	0.2	0.22
	Exogen	0.4 lin	0,87 st.	0.5 st		0.18	0.045 st	0.02 st	0.02 st
	%	17	43	96.2		16	20	10	9
Adenin-nukleotide	Gesamt	0.4	1.1	1.12		0.6	1.1	1.13	0.78
	Exogen	0.05	0.013 st.	0.06 st		0.07	0.024 st	0.015 st	0
	%	12.5	1.2	5		12	2.2	1.3	0
Guanin-nukleotide	Gesamt	0.2	0.11	0.2		0.3	0.3	0.4	0.55
	Exogen	0.04 st	0.025 st?	0.005 lin		0.05	0.04 st	0.065 st	0
	%	20	22	2.5		17	13	16	0
Guanosin	Gesamt	0.2	0.3	0.2		0.6	0.7	0.5	1.2
	Exogen	0	0	0.005		0.3	0.3 lin	0.21 st	0.63 st
	%	0	0	2.5		50	43	42	52
RNA									
Adenosin	Gesamt	2.2	3.3	3.9		2	5	4	2.3
	Exogen	0	0.0017	0.0014		0	0	0	0
Guanosin	Gesamt	2.6	6.6	7.2		5	7.7	3.2	3.8
	Exogen	0.04	0.0034	0.005		0.05	0.03	0.02	0.03
Inosin	Gesamt	0.33	0.3	0.2		0.8	0	0	0.1
	Exogen	0.004	0.0013	0		0	0	0	0
	RNA-Ges.	5.1	10.2	11.3		7.8	12.7	7.2	6.2
	Exog.-Ges	0.046	0.0064	0.0064		0.05	0.03	0.02	0.03
	%	0.9	0.06	0.05		0.6	0.2	0.3	0.5
DNA									
Adenin	Gesamt		0.35	1.4			0	1.6	1.3
	Exogen		0	0.005			0	0.02	0.0005
Guanin	Gesamt		0.4	2.1			0.23	0.4	0.6
	Exogen		0	0.01			0.002	0.0004	0.013
	DNA-Ges		0.72	3.5			0.23	2	1.9
	Exog.-Ges		0	0.015			0.002	0.02	0.7
	%	n.g.	0	0.4		n.g.	0.14	0.14	0.06
Lipid (CoA ?)	Exogen	0.001	0.0034	0.016		0.0015	0.002	0.007	0.04
(Lipo-?) Protein	Exogen	0	0	0.0008		0	0	0.002	0.0005
Exogene Nucleoside in allen Metaboliten	µmol/ml ZV	0.141	0.048	0.11		0.352	0.142	0.15	0.1

Tabelle 4 : Absolute und relative Anteile exogener Purinnucleoside und der aus exogenen

Purinnukleosiden entstandenen Metabolite (**Exogen**) an den intrazellulären Gehalten der Purinnukleoside und Purinmetabolite (**Gesamt**) nach 48 stündiger Inkubation mit ^{14}C -Inosin bzw. ^{14}C -Guanosin in der säurelöslichen, in der RNA- und DNA-Fraktion von Oozyten unterschiedlicher Reifungsstadien (alle Angaben in $\mu\text{mol} / \text{ml ZV}$). Die relativen Angaben sind grau unterlegt. Die Gesamtmengen von Lipid und Protein wurden nicht bestimmt. Pro Reifungsstadium wurden Oozyten eines Tieres mit ^{14}C -markiertem Inosin bzw. Guanosin inkubiert. Abkürzungen: **st**, steady state (Aufnahme änderte sich nach 48 h nicht mehr); **lin**, lineare Aufnahme; **n.g.**, nicht gemessen.

Abb. 54 a zeigt, die Aufnahme von Inosin in Abhängigkeit von der Zeit in den Inosinpool schnell wachsender Oozyten: Innerhalb von 72 h waren ca. $0,6 \mu\text{mol}/\text{ml ZV}$ Inosin in die Oozyten gelangt, die Konzentration des intrazellulären Inosins war dadurch aber nur um etwa $0,1 \mu\text{mol}/\text{ml ZV}$ angestiegen, dh das in diesem Zeitraum ein beständiger „turn-over“ von Inosin in der Zelle stattgefunden haben muss. Über 72 h hinaus wurde die Inosinaufnahme zwar nicht gemessen, der Verlauf der Inosinaufnahme bis 72 h lässt aber vermuten, dass die Aufnahme nach 72 h gleich geblieben war; mit anderen Worten Aufnahme und Metabolisierung von Inosin waren nach etwa 72 h im Gleichgewicht (in **Tabelle 4** mit **s.t** (steady state) bezeichnet); zu diesem Zeitpunkt bestand der Inosinpool der Oozyten, wie gesagt, vollständig aus exogenem Inosin; die spezifische Aktivität des freien Inosin in den Oozyten entsprach somit nach 48 bzw. 72 h der spezifischen Aktivität des Inosins im Medium (**Abb. 54 a**). Inosin wurde offenbar nicht endogen bereitgestellt, andernfalls wäre aufgenommenes, radioaktiv markiertes Inosin „verdünnt“ worden und hätte in einer deutlich niedrigeren spezifischen Aktivität in der Oozyte vorgelegen.

Die **Tabelle 4** zeigt auch, dass die Oozyten von *Nereis virens* Inosin zu Adenin- und Guaninnukleotiden umgebaut haben. Der Gesamtgehalt an Adeninnukleotiden hatte vor allem bei den jungen Oozyten ($60\text{-}100 \mu\text{m } \varnothing$) von $0,4$ auf $1,1 \mu\text{mol}/ \text{ml ZV}$ zugenommen; bei den schnell wachsenden Oozyten blieb der Gehalt an Adeninnukleotiden unverändert - bei den ganz jungen Oozyten ($60 \mu\text{m } \varnothing$) waren fast 13 % der Adeninnukleotide aus exogenem Inosin entstanden; bei den etwas größeren Oozyten ($100 \mu\text{m}$) bestanden nur noch 1,2 % und bei den schnell wachsenden Oozyten ($146 \mu\text{m}$) 5 % der Adeninnukleotide aus exogenem Inosin.

Die **Abb. 54 b** zeigt den Umbau von exogenem Inosin zu Adeninnukleotiden bei schnell wachsenden Oozyten in Abhängigkeit von der Zeit: Nach 48 h veränderte sich die Umbaurate kaum mehr dh, dass die Bildung von Adeninnukleotiden und deren weitere Metabolisierung zu diesem Zeitpunkt bereits im Gleichgewicht war (in **Tabelle 4** mit **s.t** = steady state bezeichnet); - erkennbar ist dies auch daran, dass sich die spezifische Aktivität der Adeninnukleotide nach 48 h kaum mehr geändert hat. Zu diesem Zeitpunkt bestand der Adeninnukleotidpool, wie gesagt, nur zu 5 % aus exogenem Inosin. Ein kleiner Teil der Adeninnukleotide entstand sicherlich auch durch die Wiederverwertung von exogenem Guanosin (siehe unten). Der überwiegende Teil der Adeninnukleotide war demnach endogenen Ursprungs; sie können durch *de novo*-Synthese und/oder durch die Konvertierung gespeicherter Nukleotide entstanden sein. Während des Oozytenwachstums hatte sich der Gehalt an Guaninnukleotiden kaum verändert - die relative Anteile der aus exogenem Guanosin entstandenen Guaninnukleotide am Guaninnukleotid-Pool waren ebenfalls bei den ganz jungen Oozyten ($60 \mu\text{m } \varnothing$) und auch bei den etwas größeren Oozyten ($100 \mu\text{m } \varnothing$) mit 20 - 22 % am höchsten. Die **Tabelle 4** zeigt auch, dass die Oozyten aufgenommenes Inosin zu Guanosin umgebaut haben; diese Konvertierung war aber nur bei schnell wachsenden

Oozyten zu beobachten - nach 48 h bestand der Guanosinpool nur zu 2.5 % aus konvertiertem, exogenem Inosin.

Nach Inkubation mit ^{14}C -Inosin waren in den Nukleinsäuren die Adenin- und Guaninnukleotide und in der RNA außerdem noch die Inosinnukleotide markiert (**Tabelle 4**). Letztere müssen durch die Desaminierung von Adeninnukleotiden, nach ihrem Einbau in die RNA, entstanden sein, da Inosinnukleotide nicht für die RNA-Synthese verwendet werden (siehe Harbers, 1975). Der Umbau von exogenem Inosin zu den Purinnukleotiden der RNA war innerhalb eines Zeitraumes von 72 h linear angestiegen (Daten nicht gezeigt); nach 48 h waren bei ganz jungen Oozyten ($60\ \mu\text{m}\ \varnothing$) zu 1 % und bei bei jungen und schnell wachsenden Oozyten höchstens 0.06 % der RNA-Purinnukleotide aus exogenem Inosin entstanden.

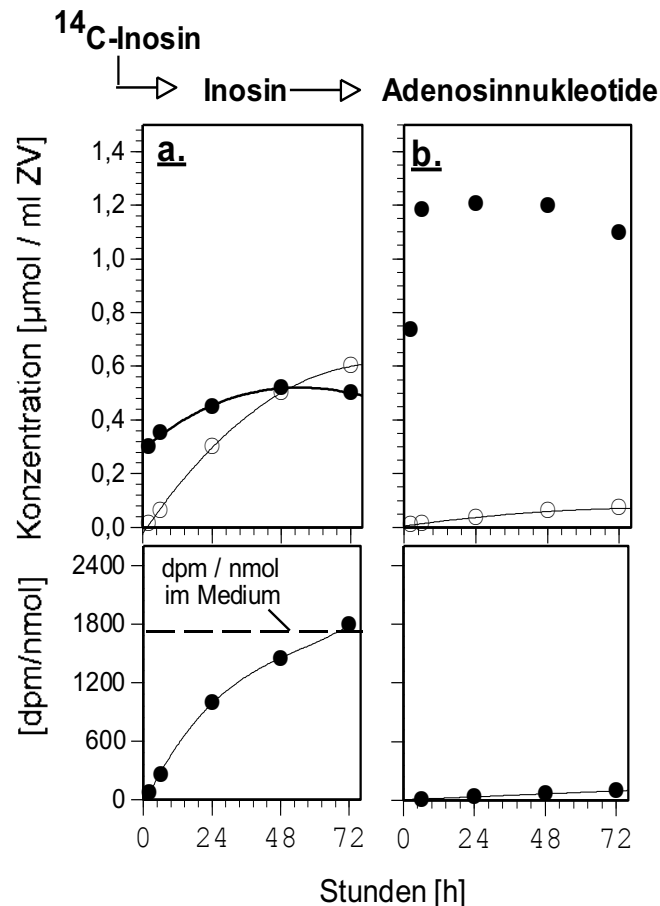


Abb. 54 (a+b): (a) Aufnahme von ^{14}C -Inosin (○) durch mittelgroße Oozyten ($146\ \mu\text{m}\ \varnothing$) und (b) Umbau des aufgenommenen Inosins zu Adeninnukleotiden (○) bei einem standardisierten Inosinangebot von $60\ \mu\text{M}$: die obere Diagrammreihe zeigt außerdem jeweils die mittels HPLC gemessene Gesamtmenge des Inosins (●) und der Adeninnukleotide (●); die untere Diagrammreihe gibt die spezifische Aktivität des im Medium eingesetzten Inosins, des intrazellulären Inosinpools und des Adeninnukleotidpools an.

Von den beiden untersuchten Reifungsstadien waren die Purinnukleotide der DNA nur bei schnell wachsenden Oozyten ($146\ \mu\text{m}\ \varnothing$) markiert - nach 48 h waren 0,4 % der Purinnukleotide der DNA aus exogenem Inosin entstanden. Exogenes Inosin wurde während des gesamten Oozytenwachstums in zunehmendem Maß auch in das Lipid der Oozyten eingebaut; ein Einbau von Inosin in das Protein konnte dagegen nur bei schnell wachsenden Oozyten gezeigt werden.

Auch nach Inkubation mit ^{14}C -Guanosin war ein Teil des aufgenommenen Guanosin in nicht-metabolisierter Form in den Oozyten verblieben (**Tabelle 4**; rechte Tabellenhälfte). Nach 48 h bestand in allen Reifungsstadien etwa die Hälfte des intrazellulären Guanosinpools aus exogenem Guanosin; der Gesamtgehalt an Guanosin hatte sich während des Oozytenwachstums kaum verändert; erst bei den ausgewachsenen Oozyten war die Guanosinkonzentration auf das doppelte angestiegen. Die **Abb. 55 a.** zeigt, die Aufnahme von

Guanosin in den Guanosinpool schnell wachsender Oozyten: Der starke Anstieg der Guanosinkonzentration innerhalb der ersten 8 h von 0,12 auf 0,32 $\mu\text{mol/ml}$ ZV kann nicht auf der Aufnahme von exogenem Guanosin beruht haben, da die Aufnahmerate innerhalb dieser Zeit mit maximal 0,04 $\mu\text{mol/ml}$ ZV noch viel zu gering war. Dieser Anstieg kann nur durch endogen bereitgestelltes Guanosin entstanden sein. Aufgrund des Kurvenverlaufs der Aufnahme ist zu vermuten, dass die Aufnahme von Guanosin nach 48 h ein konstantes Niveau erreicht hatte; mit anderen Worten: Aufnahme und Metabolisierung von Guanosin waren nach 48 h im Gleichgewicht (in **Tabelle 4** mit **s.t** =steady state bezeichnet); was sehr anschaulich auch daran zu erkennen ist, dass sich die spezifische Aktivität des Guanosin-Pools nach 48 h nicht mehr änderte. Unter der Voraussetzung eines konstanten Guanosin-Turnovers kann die Aussage getroffen werden, dass der Guanosinpool der Oozyten nach 48 h zu 42 % aus exogenem Guanosin bestanden hat; die restlichen 58 % müssen demnach endogener Herkunft sein.

Die **Tabelle 4** zeigt, dass die Oozyten von *Nereis virens* Guanosin zu Adenin- und Guaninnukleotiden umgebaut haben. Der Gesamtgehalt an Adeninnukleotiden war bei den ganz jungen Oozyten (60-100 μm \varnothing) angestiegen und blieb bei den größeren Oozyten unverändert - der Anteil der aus exogenem Guanosin entstandenen Adeninnukleotide am Adeninnukleotid-Pool nahm von 12 % bei jungen Oozyten (60 μm \varnothing) auf 2,2 % bei etwas größeren Oozyten (100 μm \varnothing) und auf 1 % bei schnell wachsenden Oozyten (142 μm \varnothing) ab; ausgewachsene Oozyten bauten schließlich gar kein Guanosin mehr zu Adeninnukleotiden um. Die Größe des Guaninnukleotid-Pools hatte sich während des Oozytenwachstums kaum verändert - der Anteil der aus exogenem Guanosin entstandenen Guaninnukleotide am Guaninnukleotid-Pool blieb im Verlauf des Oozytenwachstums mit 17, 13 und 16 % nahezu gleich; ausgewachsene Oozyten bauten schließlich gar kein Guanosin mehr zu Guaninnukleotiden um. In der **Abb. 55 b** ist der Umbau von Guanosin zu Guaninnukleotiden bei schnell wachsenden Oozyten dargestellt: Bereits nach 24 h blieb die Umbaurate konstant, die Bildung von Guaninnukleotiden und ihre weitere Metabolisierung war also im Gleichgewicht - erkennbar ist dies auch daran, dass die spezifische Aktivität der Guaninnukleotide nach 24 bzw. 48 h gleich blieb. Der Guaninnukleotidpool bestand zu diesem Zeitpunkt, wie bereits erwähnt, zu 16 % aus exogenem Guanosin; über 80 % der Guaninnukleotide waren demnach endogenen entstanden. Ein Teil davon wurde sicherlich durch die Wiederverwertung des gleichzeitig aufgenommenen Inosins gebildet (siehe oben). Der andere Teil muss aber durch *de novo*-Synthese und/oder durch die Konvertierung gespeicherter Nukleotide entstanden sein. Durch den Vergleich der spezifischen Aktivität des Guaninnukleotid-Pools mit der spezifischen Aktivität des Guanosinpools kann man bestimmen wieviel der Guaninnukleotide aus dem Guanosinpool, also aus dem Gemisch von exogenem und endogenem Guanosin, entstanden sind: Man sieht in **Abb. 55 b** (untere Diagrammreihe), dass die spezifische Aktivität des Guaninnukleotid-Pools zu diesem Zeitpunkt fast halb so hoch war wie die spezifische Aktivität des Guanosinpools (siehe **Abb. 55 a**, untere Diagrammreihe); das bedeutet, dass in dem betrachteten Zeitintervall etwas weniger als die Hälfte der Guaninnukleotide aus dem Guanosinpool entstanden waren. Die **Tabelle 4** zeigt außerdem, dass die Oozyten aller Reifungsstadien aufgenommenes Guanosin zu Inosin umbauen können. Diese Konversion von Guanosin zu Inosin fand in viel stärkerem Maße statt, als der umgekehrte Weg vom Inosin zum Guanosin (siehe oben). Nach 48 h bestand der Inosinpool bei jungen Oozyten (60 - 100 μm \varnothing) zu 16 bzw. 20 % und bei größeren Oozyten (140-176 μm \varnothing) zu etwa 10 % aus konvertiertem, exogenen Guanosin.

Nach Inkubation mit ^{14}C -Guanosin waren in der RNA nur die Guaninnukleotide, nicht aber die Adeninnukleotide radioaktiv markiert. Der relative Anteil der aus exogenem Guanosin

entstandenen Purinnukleotide an den RNA-Nukleotiden war mit 0,6 % bei den ganz jungen Oozyten ($60 \mu\text{m } \varnothing$) am höchsten und bei etwas größeren Oozyten ($100 \mu\text{m } \varnothing$) und bei schnell wachsenden Oozyten mit 0,2 bzw. 0,3 % am geringsten; bei ausgewachsenen Oozyten waren im betrachteten Zeitintervall 0,5 % der RNA-Nukleotide aus exogenem Guanosin entstanden (**Tabelle 4.**). Bei schnell wachsenden Oozyten war der Umbau von exogenem Guanosin zu RNA-Nukleotiden innerhalb eines Zeitraumes von 72 h linear angestiegen (Daten nicht gezeigt).

In der DNA der Oozyten konnte das aufgenommene Guanosin, im Gegensatz zur RNA, sowohl in den Adenin- als auch in den Guaninnukleotiden nachgewiesen werden (siehe **Tabelle 4**). Der relative Anteil der aus exogenem Guanosin entstandenen Purinnukleotide an den DNA-Nukleotiden belief sich in allen untersuchten Reifungsstadien auf weniger als 0.2 %.

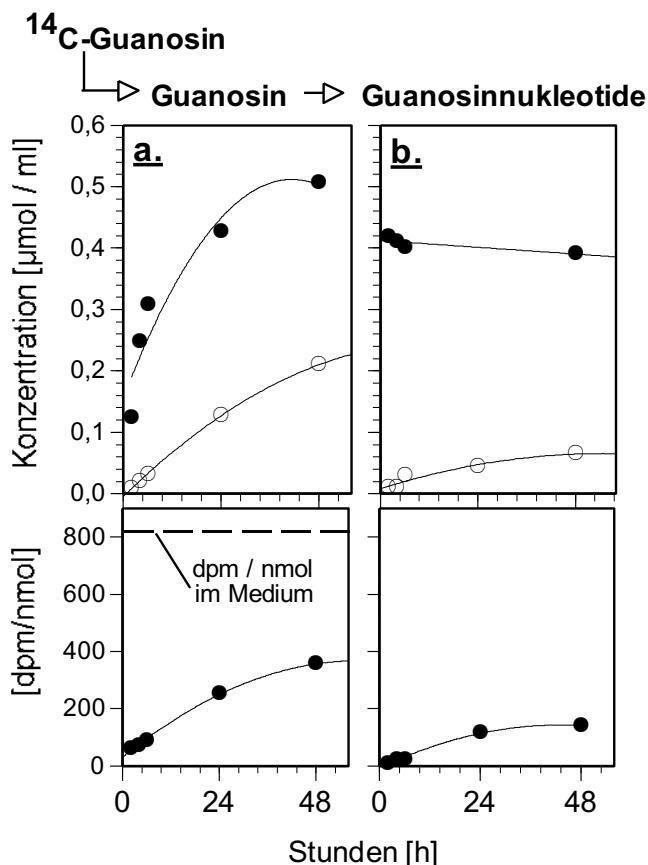


Abb. 55 (a+b): (a) Aufnahme von ^{14}C -Guanosin (○) durch mittelgroße Oozyten ($142 \mu\text{m } \varnothing$) und (b) Umbau des aufgenommenen Guanosins zu Guaninnukleotiden (○) bei einem standardisierten Inosinangebot von $60 \mu\text{M}$: die obere Diagrammreihe zeigt außerdem jeweils die mittels HPLC gemessene Gesamtmenge des Guanosin (●) und der Guaninnukleotide (●); die untere Diagrammreihe gibt die spezifische Aktivität des im Medium eingesetzten Guanosins, des intrazellulären Guanosinspools und des Guaninnukleotidpools an.

Aufgenommenes Guanosin wurde während des gesamten Oozytenwachstums in zunehmendem Maß ebenfalls in das Lipid der Oozyten eingebaut; ein Einbau von Guanosin in das Protein konnte dagegen nur bei schnell wachsenden und bei ausgewachsenen Oozyten gezeigt werden.

Über die Bedeutung des exogenen Inosins bzw. Guanosins für den Nukleosid-Metabolismus der Oozyten von *Nereis virens* läßt sich zusammengefaßt folgendes sagen:

- ⇒ Bei Oozyten der meisten Reifungsstadien konnte gezeigt werden, dass ein beständiger turn-over von Nukleosiden bzw. Nukleotiden stattgefunden hat und, dass dieser turn-over nach 48 bzw. 72 h im Gleichgewicht war. Der Umbau exogener Nukleoside zu den Purinnukleotiden der Nucleinsäuren war dagegen in den meisten Fällen nach 72 h noch nicht im Gleichgewicht.
- ⇒ Die Untersuchungen haben außerdem deutlich gezeigt, dass in den Oozyten, in Abhängigkeit vom Reifungsstadium, meist nur ein Teil der intrazellulären Purinnukleoside

bzw. Purinmetabolite aus exogenen Purinnukleosiden entstanden war: Der Anteil des aufgenommenen Inosins am Inosinpool hatte bei steigendem Oozytendurchmesser beständig zugenommen; bei schnell wachsenden Oozyten bestand der Inosinpool der Oozyten nach 48 h sogar vollständig aus exogenem Inosin. Der Guanosinpool bestand dagegen nach 48 h in allen Reifungsstadien nur etwa zur Hälfte aus exogenem Guanosin; der andere Teil muss durch *de novo* Synthese und/oder durch die Konvertierung vorhandener Nukleotide entstanden sein.

- ⇒ Bei den ganz jungen Oozyten (60 µm Ø) hatten die aus exogenem Inosin bzw. Guanosin entstandenen Nukleotide den höchsten Anteil am Adenin- bzw. Guaninnukleotid-Pool; ausgewachsene Oozyten bauten dagegen aufgenommenes Guanosin nicht mehr zu Adenin- bzw. zu Guaninnukleotiden um.
- ⇒ Der Anteil des exogenen Inosins an den Purinnukleotiden der RNA war ebenfalls bei den ganz jungen Oozyten am höchsten: Nach 48 h bestanden die Purinnukleotide der RNA bei ganz jungen Oozyten (60 µm Ø) zu 1 % und bei bei jungen und schnell wachsenden Oozyten zu höchstens 0.06 % aus umgebautem, exogenem Inosin.
- ⇒ Nach Inkubation mit ¹⁴C-Guanosin waren in der RNA nur die Guaninnukleotide **nicht** aber die Adennukleotide radioaktiv markiert: Der relative Anteil der aus exogenem Guanosin entstandenen Purinnukleotide an den RNA-Nukleotiden war mit 0,6 % bzw. 0,5 % bei den ganz jungen Oozyten (60 µm Ø) und bei den ausgewachsenen Oozyten (176 µm Ø) am höchsten.
- ⇒ Die Purinnukleotide der DNA bestanden bei schnell wachsenden Oozyten (146 µm Ø) zu 0,4 % aus umgebautem, exogenem Inosin. In der DNA der Oozyten konnte das aufgenommene Guanosin, im Gegensatz zur RNA, in den Adenin- und in den Guaninnukleotiden nachgewiesen werden (siehe **Tabelle 4**) - die Purinnukleotide der DNA bestanden in **allen untersuchten Reifungsstadien** nach 48 h zu weniger als 0.2 % aus umgebautem, exogenem Guanosin.
- ⇒ Nur **schnell wachsende Oozyten** (146 µm Ø) konvertierten exogenes Inosin zu Guanosin - nach 48 h bestand der Guanosinpool allerdings nur zu 2.5 % aus konvertiertem, exogenem Inosin. Exogenes Guanosin wurde dagegen in Oozyten **aller Reifungsstadien** zu Inosin konvertiert - der Inosinpool bestand bei jungen Oozyten (60-100 µm Ø) immerhin zu 16-20 % und bei den größeren Oozyten (140-176 µm Ø) zu etwa 10 % aus konvertiertem, exogenem Guanosin.
- ⇒ Exogenes Inosin und exogenes Guanosin wurden während des gesamten Oozytenwachstums in zunehmendem Maße in das Lipid und in viel geringerem Maße auch in das Protein der Oozyten eingebaut.

2.4.3 Stoffwechselbilanz exogener Nukleoside in heranwachsenden Oozyten

Bei vielen verschiedenen Zelltypen kennt man die Reaktionswege, die zur Verwertung oder zum Abbau von Purinnukleosiden führen; diese Reaktionswege sind nicht sehr komplex und bei allen untersuchten Zelltypen im Wesentlichen gleich (Rudolph, 1994). Allerdings gibt es Unterschiede in dem Ausmaß mit dem die Reaktionswege in den verschiedenen biologischen Systemen besprochen werden (Johnson et al, 1980 a-c). Anhand der markierten Metabolite die nach Inkubation mit ¹⁴C-Inosin bzw. ¹⁴C-Guanosin auftreten und aufgrund der Kenntnisse

über den Purinmetabolismus bei anderen Zellen war es möglich, die Reaktionswege der Purinnukleoside auch bei den Oozyten von *Nereis virens* zu rekonstruieren und auf die dafür notwendigen Enzyme zu schließen. Um festzustellen welche Metabolite nach Inkubation mit ^{14}C -Inosin bzw. ^{14}C -Guanosin markiert waren, wurden die mittels HPLC charakterisierten Nucleosidmetabolite im Radioaktivitätszähler gemessen. Die **Abb. 56** und **Abb. 57** zeigen die so ermittelten Reaktionswege für Inosin bzw. für Guanosin im Purinstoffwechsel der Oozyten. Hierbei interessiert aber auch das Ausmaß mit dem die exogenen Purinnukleoside zu ihren Metaboliten umgewandelt wurden und, ob das Ausmaß dieser Metabolisierung vielleicht mit dem Reifungsstadium der Oozyten im Zusammenhang steht. Dazu wurden die Stoffwechselbilanzen der aufgenommenen Purinnukleoside (Prozentangaben oberhalb der Reaktionspfeile in **Abb. 56** und **Abb. 57**), bei Oozyten unterschiedlicher Reifungsstadien berechnet. Die Berechnung der Stoffwechselbilanzen wird in der Legende der **Abb. 56** beschrieben.

In der **Abb. 56** fällt zunächst auf, dass das **aufgenommene Inosin** im Laufe des Oozytenwachstums zu einem sehr großen Teil, dh zu 73, 94, und 82 % als freies, unmetabolisiertes Inosin in den Oozyten verblieben war. Da zu keinem Zeitpunkt des Oozytenwachstums die klassischen Abbauprodukte des Inosins - Hypoxanthin, Xanthin oder Harnsäure - nachweisbar waren kann man davon ausgehen, dass der metabolisierte Anteil des exogenen Inosins im Stoffwechsel der Oozyten zu 100 % anabolisiert worden ist (siehe **Abb. 56**): **Exogenes Inosin** wurde im Purinstoffwechsel der Oozyten zu Adenin- bzw. Guaninnukleotiden umgebaut; diese Nucleotide wurden von den Oozyten offensichtlich auch für die Synthese von Nucleinsäuren verwendet. Vermutlich wurde exogenes Inosin in Form von Adennukleotiden auch in das Lipid bzw. in das Protein eingebaut. Das relative Ausmaß mit dem diese Reaktionswege in Oozyten unterschiedlicher Reifungsstadien beschriftet wurden soll im Folgenden besprochen werden.

Die erste Reaktion auf dem sogenannten **Purin-Salvage-Weg** ist eine Phosphorylierung des Inosins mit Hilfe einer 5'-Kinase; das resultierende Inosinmonophosphat (IMP) ist Ausgangspunkt für die Bildung von Adennukleotiden und - über die Zwischenform XMP - für die Bildung von Guaninnukleotiden. Tatsächlich konnten IMP und XMP mittels HPLC nachgewiesen werden, eine Markierung dieser Nucleotide war allerdings aufgrund ihrer durchweg geringen Konzentration in den Zellen nicht meßbar. Da das exogene Inosin aber im Laufe des Oozytenwachstums mit steigender Tendenz (39, 41 und 75 %) in die Adenin- und mit leicht abnehmender Tendenz (56, 59 und 23 %) in die Guaninnucleotide gelangt war muss man folgern, dass sie aus IMP bzw. XMP entstanden sind. Adenin- bzw. Guaninnucleotide können zu Adenosin bzw. zu Guanosin abgebaut werden: Da markiertes Adenosin in keinem Reifungsstadium gefunden wurde kann man davon ausgehen, dass Adennucleotide nicht zu Adenosin abgebaut worden waren; ein Abbau von exogenem Inosin über die Guaninnucleotide zu Guanosin war nur bei schnell wachsenden Oozyten (140 μm \varnothing) nachzuweisen, fast 5 % des exogenen Inosins wurden auf diesem Weg zu Guanosin konvertiert.

Adenin- bzw. Guaninnucleotide dienten den Oozyten aber auch als Bausteine für die Nucleinsäuresynthese, da die entsprechenden Nucleotide der Nucleinsäuren in vielen Fällen markiert waren: Immerhin 30 % des exogenen Inosins wurden bei den ganz jungen Oozyten (60 μm \varnothing) in Form von Guaninnucleotiden in die RNA eingebaut; bei Oozyten zu Beginn der schnellen Wachstumsphase (100-115 μm \varnothing) waren es dagegen nur noch 7 % und bei schnell wachsenden Oozyten nur noch knapp 5 %.

Erst bei etwas größeren Oozyten (100 μm \varnothing) und bei schnell wachsenden Oozyten (140 μm \varnothing) gelangten knapp 4 bzw. 1 % des exogenen Inosins auch als Adeninnukleotide in die RNA. Man sieht, dass nach Inkubation mit ^{14}C -Inosin auch die Inosinnukleotide der RNA markiert waren: Etwa 3 % des exogenen Inosins waren als Inosinnukleotide in die RNA junger Oozyten (60-100 μm \varnothing) gelangt; bei schnell wachsenden Oozyten waren die Inosinnukleotide der RNA dagegen nicht markiert. Von den beiden untersuchten Reifungsstadien gelangten nur bei den schnell wachsenden Oozyten (140 μm \varnothing) 9 % des exogenen Inosins auch als Guaninnukleotide und fast 5 % als Adeninnukleotide in die DNA. In allen untersuchten Reifungsstadien war nach der Inkubation mit ^{14}C -Inosin immer auch die Lipidfraktion radioaktiv markiert. Das ^{14}C -Inosin gelangte vermutlich über die Adeninnukleotide in die Lipidfraktion der Oozyten. Dabei fällt auf, dass das Ausmaß, mit dem exogenes Inosin in die Lipidfraktion der Oozyten gelangt war, von knapp 1 bzw. 7 % bei jungen Oozyten (60-100 μm \varnothing) auf immerhin 15 % bei schnell wachsenden Oozyten zugenommen hatte.

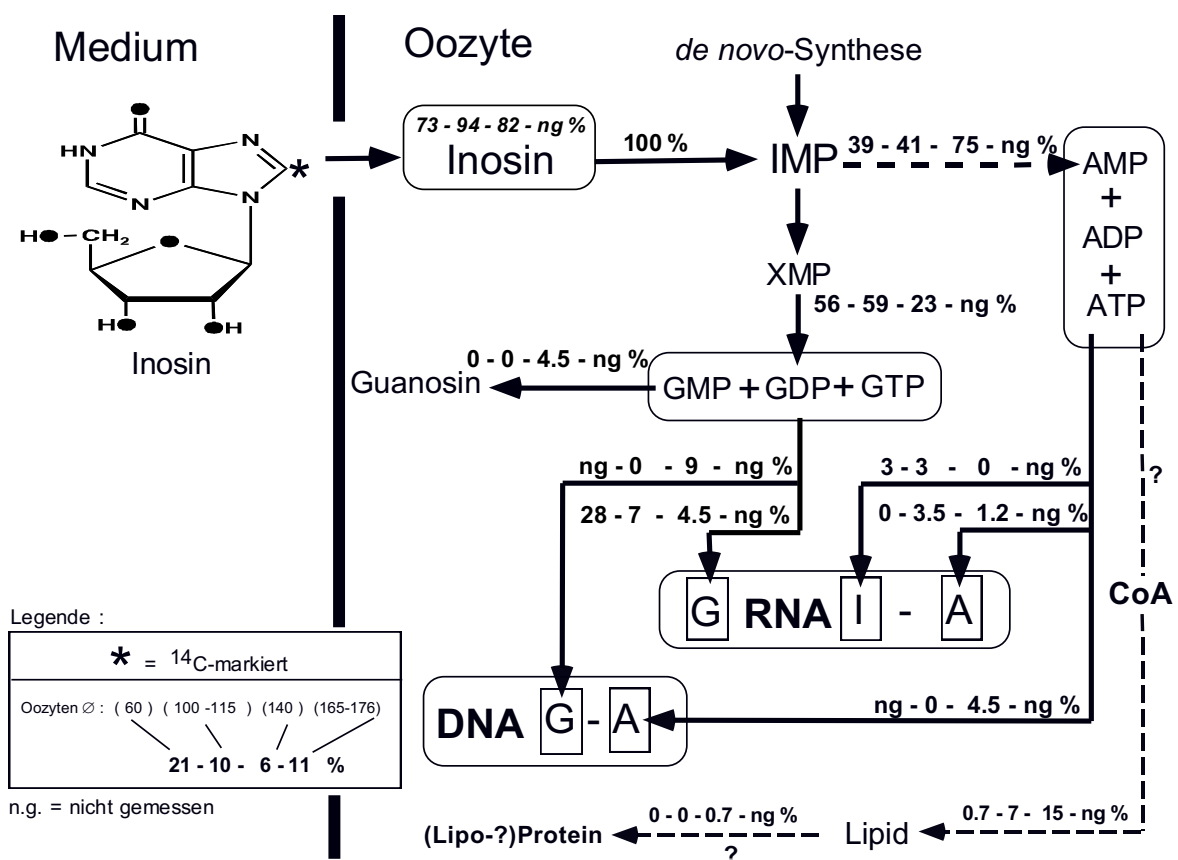


Abb. 56: Weg des aufgenommenen ^{14}C -Inosins im Purin-Stoffwechsel der Oozyten von *Nereis virens*. Es wurden jeweils Oozyten eines Tieres 48 h mit ^{14}C -Inosin inkubiert. Die Gesamtmenge des metabolisierten Inosins (0.141; 0.048 und 0.11 $\mu\text{mol}/\text{ml}$ ZV - siehe letzte Zeile in **Tabelle 4**) wurde in den drei untersuchten Reifungsstadien gleich 100 gesetzt; dann wurden die relativen Anteile der einzelnen Metabolite an dieser Gesamtmetabolitmenge berechnet. Dadurch erhält man die Stoffwechselbilanz dh, dass Ausmaß mit dem die exogenen Purinnukleoside zu den Metaboliten umgewandelt wurden. Addiert man alle Stoffwechselbilanzen, angefangen vom letzten Metaboliten, am Ende eines Reaktionsweges, bis zum ersten Metaboliten am Beginn eines Reaktionsweges so kann man, nach Burrige (1977), den Fluß des exogenen Inosin bzw. Guanosin entlang der Stoffwechselwege bestimmen (siehe Prozentangaben oberhalb der Reaktionspfeile). Die kursiv dargestellten Prozentangaben

oberhalb des intrazellulären Inosins geben den Anteil des exogenen Inosins an, dass in unmetabolisierter Form in den Oozyten verblieben war. Beachte, dass die unterschiedlich phosphorylierten Adenin- bzw. Guaninnukleotide jeweils zusammengefaßt wurden. Nach Inkubation mit ^{14}C -Inosin waren auch die Inosinnukleotide der RNA markiert; die Inosinnukleotide sind wahrscheinlich durch nachträgliche Desaminierung von Adeninnukleotiden am fertigen Polynukleotidstrang entstanden (siehe Harbers, 1975). Bedeutung der Prozentangaben: 1.Zahl: ganz junge Oozyten ($60\ \mu\text{m}\ \varnothing$); 2.Zahl: Oozyten ($100\text{-}115\ \mu\text{m}\ \varnothing$); 3.Zahl: Oozyten in der schnellen Wachstumsphase ($140\ \mu\text{m}\ \varnothing$) und 4. Zahl: ausgewachsene Oozyten ($165\text{-}176\ \mu\text{m}\ \varnothing$). Für ausgewachsene Oozyten liegen keine Ergebnisse über die Bilanz des ^{14}C -Inosins vor. Abkürzungen: **A**, Adenosin; **I**, Inosin; **G**, Guanosin. Ein wenn auch sehr geringer Teil des ^{14}C -Inosins wurde auch in der Proteinfraction gefunden, in welcher Form, kann nicht zweifelsfrei beantwortet werden, möglicherweise besteht ein Zusammenhang zwischen Fettsynthese und der Bildung von Lipo-Proteinen.

In der **Abb. 57** fällt als erstes auf, dass auch das **aufgenommene Guanosin** in den Oozyten aller untersuchten Reifungsstadien, zu 46, 67, 58 und 84 % als freies, unmetabolisiertes Guanosin vorzufinden war. Da zu keinem Zeitpunkt der Keimzellreifung die bekannten Abbauprodukte des Guanosins - Guanin oder Xanthin - nachweisbar waren, ist davon auszugehen, dass der metabolisierte Anteil des exogenen Guanosins im Stoffwechsel der Oozyten zu 100 % anabolisiert worden ist (siehe **Abb. 57**): **Exogenes Guanosin** wird im Purinstoffwechsel der Oozyten zu Adenin- und Guaninnukleotiden umgebaut. Die Guaninnukleotide werden offensichtlich für die RNA- und DNA-Synthese verwendet, während die aus Guanosin entstandenen Adeninnukleotide erstaunlicherweise zu keinem Zeitpunkt für die RNA- sondern **nur** für die DNA-Synthese Verwendung fanden. Exogenes Guanosin wurde außerdem zu Inosin konvertiert und vermutlich in Form von Adeninnukleotiden auch in das Lipid bzw. in das Protein eingebaut. Das relative Ausmaß mit dem diese Reaktionswege, in den Oozyten unterschiedlicher Reifungsstadien, beschriftet wurden soll im Folgenden besprochen werden. Die erste Reaktion auf dem Weg des sogenannten Purin-“Salvage“-Weg ist eine Phosphorylierung des Guanosins mit Hilfe einer 5'-Kinase; das daraus resultierende Guanosinmonophosphat (GMP) kann mit Hilfe anderer Kinasen (Mono- bzw. Diphosphatkinasen) zu GDP bzw. GTP umgewandelt werden. Ausgehend von den Guaninnukleotiden können sich die Reaktionswege prinzipiell in mehrere Richtungen verzweigen. Nur wenn eine Zelle über die GMP-Reduktase verfügt, kann sie GMP zu IMP umbauen. Tatsächlich war das IMP ausgewachsener Oozyten nach Inkubation mit ^{14}C -Guanosin markiert. In allen anderen Reifungsstadien war eine Markierung des IMP selbst zwar nicht nachzuweisen, dafür waren die Adeninnukleotide und das Inosin markiert - beide können nur aus IMP entstanden sein. Auf dem Weg über GMP und IMP wurde in jungen Oozyten ($60\ \mu\text{m}\ \varnothing$) sogar die Hälfte (!) des exogenen Guanosins zu Inosin konvertiert; bei größeren, bei schnell wachsenden und bei ausgewachsenen Oozyten wurde exogenes Guanosin mit abnehmender Tendenz, dh, mit 32, 13 und 20 % zu Inosin konvertiert. Gleichzeitig wurde exogenes Guanosin, auf demselben Weg, mit steigender Tendenz, dh, mit 20, 19, 30 und 41 % zu Adeninnukleotiden umgebaut. Wenn man das relative Ausmaß, mit dem exogenes Guanosin zu Inosin und zu Adeninnukleotiden metabolisiert wurde, addiert, kann man schließen, dass in den untersuchten Reifungsstadien immerhin zwischen 42 und 70 % des exogenen Guanosins zu IMP umgebaut worden sein muss.

Die aus exogenem Guanosin entstandenen Guanin- bzw. Adeninnukleotide dienten den Oozyten auch als Bausteine für die Nukleinsäuresynthese: 14 % des exogenen Guanosins wurden bei den ganz jungen Oozyten ($60\ \mu\text{m}\ \varnothing$) in Form von Guaninnukleotiden in die RNA

eingebaut; bei Oozyten zu Beginn der schnellen Wachstumsphase (100-115 μm \varnothing) und bei bei schnell wachsenden Oozyten (140 μm \varnothing) waren es 21 bzw. 13 % und bei ausgewachsenen Oozyten waren es sogar 30 % (!). In die DNA heranwachsender Oozyten (100-140 μm \varnothing) gelangten dagegen nur wenige Prozent des exogenen Guanosins in Form von Guaninnukleotiden; erst ausgewachsene Oozyten nutzen 13 % des exogenen Guanosins zur Bildung von Guanosinbausteinen. Die aus exogenem Guanosin entstandenen Adeninnukleotide wurden erstaunlicherweise zu keinem Zeitpunkt für die RNA-, sondern **nur** für die DNA-Synthese verwendet: Bei Oozyten zu Beginn der schnellen Wachstumsphase (100-115 μm \varnothing) gelangte noch kein exogenes Guanosin in Form von Adeninnukleotiden in die DNA; bei schnell wachsenden Oozyten (140 μm \varnothing) waren es sogar 13 % und bei ausgewachsenen Oozyten nicht einmal mehr 1 %.

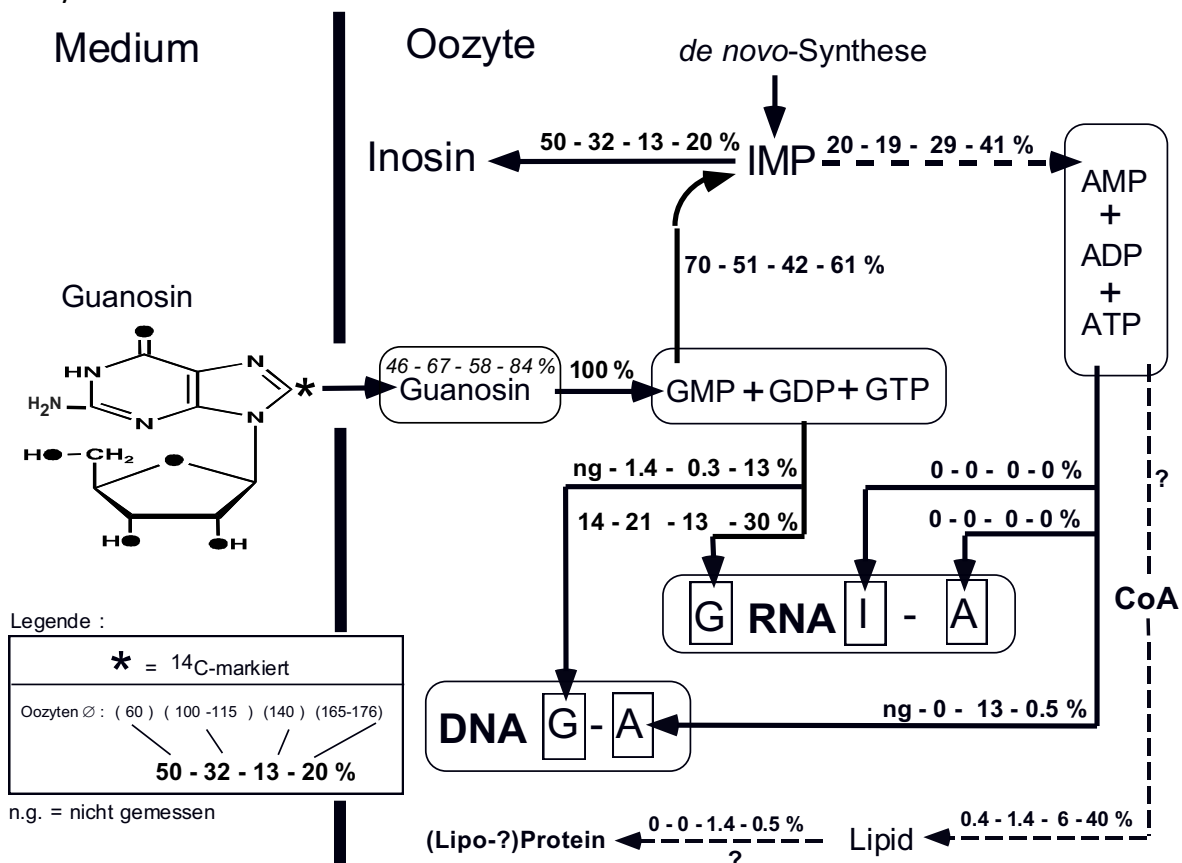


Abb. 57: Weg des aufgenommenen ¹⁴C-Guanosin im Purin-Stoffwechsel der Oozyten von *Nereis virens*. Es wurden jeweils Oozyten eines Tieres 48 h mit ¹⁴C-Guanosin inkubiert. Die Gesamtmenge des Guanosin-Metabolite (0.352; 0.142; 0.15 und 0.1 $\mu\text{mol/ml}$ ZV - siehe **Tabelle 4**) wurde in den vier untersuchten Reifungsstadien gleich 100 gesetzt; die Stoffwechselbilanzen des aufgenommenen Guanosins (siehe Prozentangaben oberhalb der Reaktionspfeile) wurden, wie in der Legende der **Abb. 56** beschrieben berechnet. Die Inosinnukleotide der RNA sind wahrscheinlich durch nachträgliche Desaminierung von Adeninnukleotiden am fertigen Polynukleotidstrang entstanden (siehe Harbers, 1975). Die kursiv dargestellten Prozentangaben oberhalb des Guanosins geben das Ausmaß an mit dem exogenes Guanosin in unmetabolisierter Form in den Oozyten verblieben war. Abkürzungen und Bedeutung der Prozentangaben siehe Legende zur **Abb. 56**.

Auch nach der Inkubation mit ^{14}C -Guanosin war in allen untersuchten Reifungsstadien die Lipidfraktion radioaktiv markiert. Das ^{14}C -Guanosin gelangte vermutlich in Form von Adeninnukleotide in die Lipidfraktion der Oozyten. Es fällt auf, dass das Ausmaß mit dem exogenes Guanosin in die Lipidfraktion eingebaut wurde, von geringen 0,4 % bzw. 1,4 % bei jungen Oozyten (60-100 μm \emptyset) auf 6 % bei schnell wachsenden und auf immerhin 40 % (!) bei ausgewachsenen Oozyten angestiegen war. Ein wenn auch sehr geringer Teil des ^{14}C -Guanosin wurde auch in der Proteinfraction gefunden; in welcher Form das Guanosin in die Proteinfraction gelangt ist, kann nicht sicher beantwortet werden, möglicherweise besteht aber ein Zusammenhang zwischen Fettsynthese und der Bildung von Lipoproteinen.

Über die **Stoffwechselbilanz** des exogenen Inosins bzw. Guanosins in Oozyten von *Nereis virens* läßt sich zusammenfassend folgendes sagen:

- ⇒ Aufgenommenes Inosin verblieb in etwas größerem Ausmaß, dh, zu 70-82 % im Cytoplasma heranwachsender Oozyten, **ohne** metabolisiert zu werden, als Guanosin (40-58 %); der andere Teil der aufgenommenen Purinnukleoside wurde im Stoffwechsel zu 100 % anabolisiert.
- ⇒ Oozyten von *Nereis virens* nutzen exogene Purinnukleoside auf dem **Salvage-Weg** zur Synthese von Adenin- und Guaninnukleotiden.
- ⇒ Die aus **exogenem Inosin bzw. Guanosin** gebildeten Guanin- und Adeninnukleotide dienten den Oozyten als Bausteine für die Nukleinsäuresynthese: Sehr junge Oozyten (60 μm \emptyset) bauten sogar 30 % des **exogenen Inosins** als Guanosinbausteine in die RNA ein. Exogenes Inosin gelangte vor allem bei jungen Oozyten (60-100 μm \emptyset) auch zu 3 bzw. 8 % als Adenin- und Inosinnukleotid in die RNA. Von den beiden untersuchten Reifungsstadien bauten nur schnell wachsenden Oozyten (140 μm \emptyset) exogenes Inosin als Guanosin- bzw. Adenosinbausteine zu 9 bzw. 5 % in die DNA ein. **Exogenes Guanosin** wurde erst durch ausgewachsene Oozyten (176 μm \emptyset) in größerem Ausmaß, dh zu 13 %, als Guanosinbaustein in die DNA eingebaut. Die aus exogenem Guanosin entstandenen Adeninnukleotide wurden zu keinem Zeitpunkt für die RNA- sondern **nur** für die DNA-Synthese verwendet.
- ⇒ Die Oozyten von *Nereis virens* konvertierten Inosin zu Guanosin und *vice versa*: Inosin wurde nur im Stoffwechsel schnell wachsender Oozyten zu etwa 5 % zu Guanosin konvertiert. Guanosin wurde dagegen bei ganz jungen Oozyten sogar zu 50 % (!) und in allen anderen Reifungsstadien zu wenigstens 13 % zu Inosin konvertiert; dies zeigt, dass die Oozyten über eine **GMP-Reduktase** verfügen.
- ⇒ Nach der Inkubation mit ^{14}C -Inosin bzw. ^{14}C -Guanosin war in **allen** untersuchten Reifungsstadien der Oozyten auch die Lipidfraktion radioaktiv markiert - die exogenen Purinnukleoside gelangten vermutlich über die Adeninnukleotide in die Lipidfraktion der Oozyten. Dabei fällt auf, dass das relative Ausmaß mit dem die Purine in das Lipid gelangt waren, im Lauf des Oozytenwachstums dramatisch zugenommen hatte.
- ⇒ Die Befunde haben klar gezeigt, dass das relative Ausmaß mit dem die verschiedenen Wege des Purinstoffwechsels in Oozyten von *Nereis virens* beschritten wurden signifikant vom Reifungsstadium der Oozyten abhängig war.

2.4.4 Einbau radioaktiv markierter Nukleoside in DNA, RNA und Lipid männlicher Keimzellen

Durch die Verwendung von radioaktiv markiertem Inosin bzw. Guanosin konnte der Weg dieser Nukleoside über die säurelösliche Fraktion bis in die RNA, die DNA und bis in das Lipid verfolgt werden (siehe **Abb. 58 a.-c.**). Dabei waren auch bei den Keimzellen männlicher Tiere deutliche Unterschiede im Markierungsmuster zu erkennen. In der **Abb. 58 a.+b** ist das Ausmaß dieser Markierung in den einzelnen Fraktionen als Prozentwert von der in den Keimzellen nach 24 h gemessenen **Gesamtaktivität** angegeben. Der zumeist überwiegende Teil des aufgenommenen Inosins bzw. Guanosin war nach 24 h in der säurelöslichen Fraktion verblieben: Die säurelösliche Fraktion enthielt je nach Reifungsstadium zwischen 55 und 98 % des aufgenommenen ^{14}C -Inosins und zwischen 55 % und 95 % des aufgenommenen ^{14}C -Guanosins.

Spermatogonien I. (Spg I) vom August bauten 8 % des aufgenommenen ^{14}C -Inosins in die RNA ein (siehe **Abb. 58 a.**). Bei Spermatogonien II (Spg II) im Oktober war der Einbau von ^{14}C -Inosin in die RNA mit 22 % fast dreimal so hoch. Bei späten Spg II vom November bzw. Dezember wurden dagegen nur noch knapp 5 % des aufgenommenen Inosins in die RNA eingebaut. Tetraden (Dezember) und frühe Spermien (Januar) bauten nur noch etwa 4 - 9 % des Inosins in die RNA ein und bei späten Spermien (April) gelangten weniger als 2 % Inosin in die RNA. Der Einbau von ^{14}C -Guanosin in die RNA männlicher Keimzellen zeigte ähnliche Tendenzen wie der Einbau von ^{14}C -Inosin (**Abb. 58 b.**). Guanosin wurde in Spg I. allerdings schon zu mehr als 20 % in die RNA eingebaut. Diese hohe Einbaurate blieb bei Spg II. im Oktober mit 23 % nahezu unverändert; im weiteren Verlauf der Keimzellreifung nahmen die Einbauraten für ^{14}C -Guanosin beständig ab: Bei späten Spg II. vom Dezember, bei Tetraden und frühen Spermien gingen die Einbauraten auf 16, 10 bzw. 5 % zurück; späte Spermien im April bauten gerade noch 2 % des ^{14}C -Guanosins in die RNA ein.

Der Einbau von ^{14}C -Inosin in die DNA männlicher Keimzellen entsprach tendenziell dem Einbau dieser Nukleoside in die RNA. Spg I. bauten weniger als 1 % ^{14}C -Inosin in die DNA ein; nach Differenzierung der Spg I zu Spg II stieg der Anteil des in die DNA eingebauten ^{14}C -Inosins auf 24 % an. Bei allen nachfolgenden Keimzellstadien, dh auch schon bei späten Spg II (Dezember) gelangten schließlich wieder weniger als 7 % des aufgenommenen ^{14}C -Inosins in die DNA; bei späten Spermien war mit 0,3 % fast kein Einbau von ^{14}C -Inosin in die DNA mehr festzustellen. Der Einbau von ^{14}C -Guanosin in die DNA entsprach im Prinzip dem Einbau von ^{14}C -Inosin in die DNA: bei Spg II war der Einbau von ^{14}C -Guanosin mit 22 % ebenfalls angestiegen; im Gegensatz zum Einbau von ^{14}C -Inosin bauten späte Spermien (April) noch fast 3 % ^{14}C -Guanosin in die DNA ein. Männliche Keimzellen bauten im Gegensatz zu den Oozyten ^{14}C -Inosin (0,3-0,6 %) und ^{14}C -Guanosin (0,3-0,7 %) nur in geringem Ausmaß in die Lipidfraktion ein. ^{14}C -Inosin und ^{14}C -Guanosin wurden im Verlauf der Keimzellreifung auch in die Proteinfraction von Oozyten eingebaut, der Einbau lag allerdings immer deutlich unter 1 %.

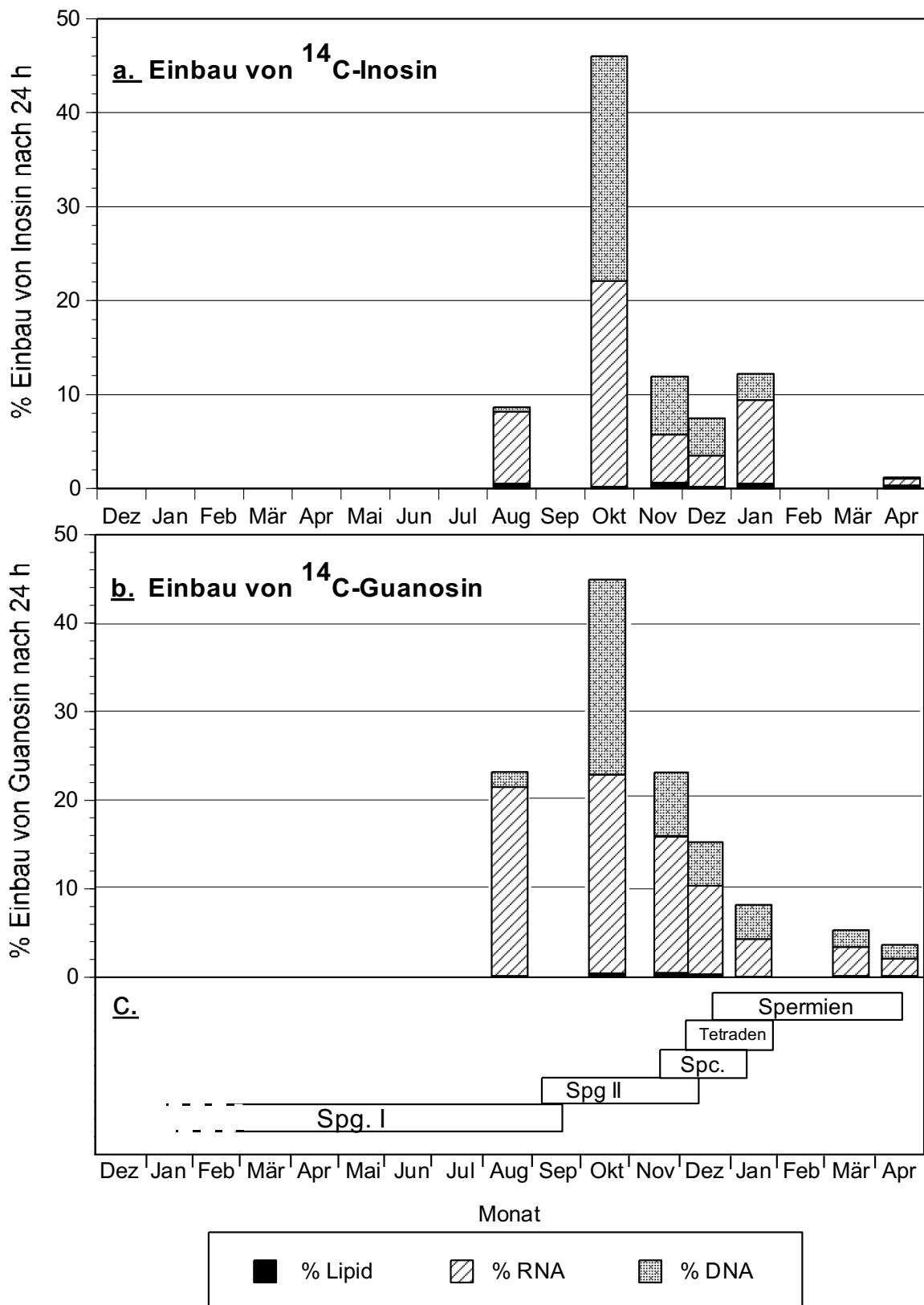


Abb. 58 (a - c): Einbau von ^{14}C -Inosin (a) bzw. ^{14}C -Guanosin (b) in die Nukleinsäuren, in Lipid und Protein männlicher Keimzellen verschiedener Reifungsstadien nach 24 h. Die Ordinate gibt den Einbau in % vom insgesamt inkorporierten ^{14}C -Nukleosid an; (c.) Jahreszeitliche Verteilung männlicher Keimzellstadien in heranreifenden Tieren. Die Stadien überlappen sich etwas, so das mehr als ein Reifungsstadium in einem Tier vorhanden sein kann.

2.4.5 Anteil exogener Nukleoside am Nukleosidstoffwechsel männlicher Keimzellen

Auch die männlichen Keimzellen wurden 2 bis 96 h in einem Medium inkubiert, das neben 60 μM nicht-markiertem Inosin bzw. Guanosin auch ^{14}C -markiertes Inosin bzw. Guanosin enthielt. Die so inkubierten Keimzellen wurden anschließend in die säurelösliche-, die RNA- und DNA-Fraktion aufgetrennt. Um die Bedeutung der exogenen Purinnukleoside für den Nukleosidstoffwechsel männlicher Keimzellen zu bestimmen, wurden die Anteile der exogenen Nukleoside z.B am Pool freier Nukleoside oder an den Purinmetaboliten berechnet. Dies geschah in derselben Weise wie bei den Oozyten (siehe **Kapitel 2.4.2**). **Tabelle 5** zeigt die absoluten und die relativen Anteile exogener Purinnukleoside und der aus exogenen Purinnukleosiden entstandenen Metabolite (**Exogen**) an den intrazellulären Gehalten der Purinnukleoside und Purinmetabolite (**Gesamt**) in männlichen Keimzellen unterschiedlicher Reifungsstadien (alle Angaben in $\mu\text{mol/ml ZV}$). Außerdem wurde die Aufnahme und das Schicksal von ^{14}C -Guanosin in Residualkörpern fast reifer männlicher Tiere untersucht. Der zeitliche Verlauf der Aufnahme von Inosin bzw. Guanosin und deren Umbau zu den entsprechenden Nukleotiden wird exemplarisch nur bei den frühen Spermien (vom Januar) besprochen.

Der **Tabelle 5** (linke Tabellenhälfte) ist zu entnehmen, dass auch männliche Keimzellen freies, dh nicht-metabolisiertes Inosin enthielten. Ein Teil dieses Inosinpools war nach Inkubation mit ^{14}C -Inosin offensichtlich exogener Herkunft: Inkubiert man Spg I vom August mit ^{14}C -Inosin so bestand der Inosinpool nach 48 h immerhin zu 60 % aus exogenem Inosin, inkubiert man dagegen Spg II, vom Oktober, auf dieselbe Weise so waren es nur noch 3 % und bei den Spermien, vom Jan-April, bestand der Inosinpool nach 48 stündiger Inkubation zu 35 bzw. 65 % aus exogenem Inosin. Die **Abb. 59 a** zeigt die Aufnahme von Inosin in den Inosinpool früher Spermien (Jan.): Die Konzentration des intrazellulären Inosins war durch die Aufnahme von Inosin im Verlauf von 96 h nicht angestiegen. In diesem Zeitraum hatte also ein beständiger turn-over von Inosin in der Zelle stattgefunden. Nach 96 h blieb die Aufnahme von exogenem Inosin gleich; mit anderen Worten Aufnahme und Metabolisierung von Inosin waren nach 96 h im Gleichgewicht (in **Tabelle 5** mit **s.t** = steady state bezeichnet). Zu diesem Zeitpunkt bestand der Inosinpool der Spermien etwa zur Hälfte aus exogenem Inosin die andere Hälfte muss also endogener Herkunft sein. Ob das endogene Inosin durch *de novo* Synthese entstanden ist oder ob die Zelle nur gespeicherte Nukleotide zu Inosin abgebaut hat kann anhand der Ergebnisse nicht festgestellt werden.

Die **Tabelle 5** zeigt, dass auch männliche Keimzellen Inosin zu Adenin- und Guaninnukleotiden umgebaut haben. Der Gesamtgehalt an Adeninukleotiden hatte beim Übergang vom Spg I zum Spg II-Stadium geradezu dramatisch von etwa 13 auf 1,2 $\mu\text{mol/ml ZV}$ abgenommen; bei den Spermien (Jan. - April) wurde dieser niedrige Adeninukleotid-Gehalt beibehalten - der Anteil der aus exogenem Inosin entstandenen Adeninukleotide am Adeninukleotid-Pool war mit 0,4 % in Spg I am niedrigsten und mit 8 % in Spg II am höchsten; in frühen Spermien bestanden noch 2 % der Adeninukleotide aus konvertiertem, exogenem Inosin; fast reife Spermien (April) bauten schließlich kein exogenes Inosin mehr zu Adeninukleotiden um.

		¹⁴ C-Inosin				¹⁴ C-Guanosin					
		Reifungs- stadium	Spg I (Aug.)	Spg II (Okt.)	Sperm (Jan.)	Sperm (Apr.)	Spg I (Aug.)	Spg II (Okt.)	Sperm (Jan.)	Sperm (Apr.)	Resid.- körper
Inosin	Gesamt	0.2	0.6	0.24	0.26	0.25	0.022	0.2	0.2	0.15	
	Exogen	0.12	0.02	0.09 st	0.17 st	0	0.006	0	0	0	
	%	60	3	38	65	0	27	0	0	0	
Adenin- nukleotide	Gesamt	12.7	1.2	0.57	0.86	13	2	1.3	2	0.33	
	Exogen	0.05	0.1 st	0.01 st	0	0.006	0	0	0	0	
	%	0.4	8	2	0	0.005	0	0	0	0	
Guanin- nukleotide	Gesamt	0.13	0.16	0.14	0.14	0.4	0.6	0.43	0.35	0.02	
	Exogen	0.02	0.03 lin	0.004 st	0.0023	0.2	0.03 st	0.07 st	0.08 st	0.01	
	%	15	19	3	1.6	50	5	16	23	50	
Guanosin	Gesamt	0.2	0.11	0.04	0.03	0.44	0.13	0.1	0.15	185	
	Exogen	0	0.02	0	0	0.1	0.015 st	0.03 st	0.03 lin	1	
	%	0	18	0	0	23	11.5	30	20	0.5	
RNA											
Adenosin	Gesamt	1.6	1.5	0.05	0.007	0.4	0.5	0.08	0.007	?	
	Exogen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Guanosin	Gesamt	4.7	3.5	0.08	0.04	1.7	1	0.065	0.04	0.14	
	Exogen	0.01	0.003	0.001	0.0015	0.04	0.003	0.004	0.003	0	
Inosin	Gesamt	1.1	0.43	0.02	0.04	0.5	0.04	0.04	0.1	4.2	
	Exogen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
DNA	Gesamt	7.4	5.4	0.15	0.09	2.6	1.5	0.2	0.15	4.34	
	Exogen	0.01	0.003	0.001	0.0015	0.04	0.03	0.004	0.005	0	
	%	0.1	0.06	0.7	1.7	1.5	2	2.1	2	0	
Adenin	Gesamt		12.7	9			22.6	2.5			
	Exogen		0.005	0			0	0			
	Guanin	Gesamt		12	10			9.4	19		
		Exogen		0.005	0			0.07	0.003		
	DNA	Gesamt		25	19			32	22		
		Exogen		0.01	0			0.07	0.003		
%		n.g.	0.04	0	n.g.	n.g.	0.2	0.02	n.g.	n.g.	
Lipid	Einbau	0.0013	0.0008	0.0003	0.0007	0	0.0002	0.0002	0.0003	0.001	
Lipo Protein	Einbau	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Exogene Nukleoside in allen Metaboliten	µmol/ml ZV	0.08	0.16	0.015	0.0045	0.25	0.11	0.08	0.0833	0.011	

Tabelle 5: Absolute und relative Anteile exogener Purinnukleoside und der aus exogenen Purinnukleosiden entstandenen Metabolite (**Exogen**) an den intrazellulären Gehalten der Purinnukleoside und Purinmetabolite (**Gesamt**) nach 48 stündiger Inkubation mit ¹⁴C-Inosin bzw. ¹⁴C-Guanosin in der säurelöslichen, in der RNA- und DNA-Fraktion männlicher Keimzellen unterschiedlicher Reifungsstadien (Angaben in µmol/ml ZV). Die relativen Angaben sind grau unterlegt. Die Gesamtmengen von Lipid und Protein wurden nicht bestimmt. Pro Reifungsstadium wurden Keimzellen eines Tieres mit ¹⁴C-markiertem Inosin bzw. ¹⁴C-Guanosin inkubiert. Abkürzungen: Spg I (Aug.) und Spg II (Okt.), Spermatogonien I + II; Sperm (Jan.), frühe Spermien; Sperm (Apr.), späte Spermien; Resid.körper, Residualkörper fast reifer Tiere vom März. s.t., „steady state“; lin., lineare Aufnahme; n.g., nicht gemessen.

Die **Abb. 59 b** zeigt den zeitabhängigen Umbau von exogenem Inosin zu Adeninnukleotiden bei frühen Spermien (Jan.):

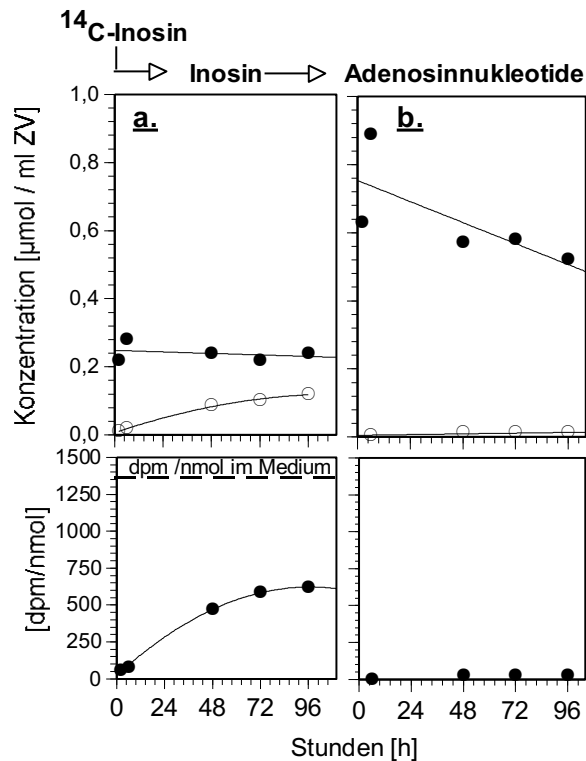


Abb. 59 (a+b): (a) Aufnahme von ^{14}C -Inosin (○) durch frühe Spermien (Jan.) und (b) Umbau des aufgenommenen Inosins zu Adeninnukleotiden (○) bei einem standardisierten Inosinangebot von $60\ \mu\text{M}$: die obere Diagrammreihe zeigt außerdem jeweils die mittels HPLC gemessene Gesamtmenge des Inosins (●) und der Adeninnukleotide (●); die untere Diagrammreihe gibt die spezifische Aktivität des Inosinpools, des Inosins im Medium, und des Adeninnukleotidpools an.

Nach 48 h veränderte sich die Umbaurate kaum mehr dh, dass die Bildung von Adeninnukleotiden und deren weitere Metabolisierung zu diesem Zeitpunkt bereits im Gleichgewicht war - erkennbar ist dies auch daran, dass sich die spezifische Aktivität der Adeninnukleotide nach 48 h kaum mehr geändert hat. Zu diesem Zeitpunkt bestand der Adeninnukleotidpool, wie gesagt, nur zu 2 % aus konvertiertem, exogenem Inosin. Über 98 % der Adeninnukleotide waren demnach endogenen Ursprungs; die endogenen Adeninnukleotide können durch *de novo*-Synthese oder durch die Konvertierung anderer Nukleotide entstanden sein. Der Gesamtgehalt an Guaninnukleotiden hatte sich während der Entwicklung der männlichen Keimzellen kaum verändert - der Anteil der aus exogenem Inosin gebildeten Guaninnukleotide am Guaninnukleotid-Pool war bei den Spg I und Spg II mit 15 bzw. 19 % am höchsten und bei den Spermien (Jan.-Apr.) mit 3 - 1.6 % am geringsten. Dieser Befund zeigt auch, dass exogenes Inosin einen deutlich höheren Anteil an der Bildung von Guaninnukleotiden als an der Bildung von Adeninnukleotiden in männlichen Keimzellen aller Reifungsstadien hatte.

Der **Tabelle 5** kann man außerdem entnehmen, dass die männlichen Keimzellen exogenes Inosin zu Guanosin konvertiert haben, solch eine Konvertierung war allerdings nur bei Spg II nachzuweisen - der Guanosinpool der Spg II bestand nach 48 h sogar zu 18 % aus konvertiertem, exogenem Inosin.

Die **Tabelle 5** zeigt weiter, dass auch männliche Keimzellen exogenes Inosin in die Nucleinsäuren eingebaut haben: In der RNA waren nach Inkubation mit ^{14}C -Inosin allerdings nur die Guaninnukleotide und nicht die Adeninnukleotide markiert: Der Anteil der aus exogenem Inosin gebildeten Guaninnukleotide an den Guaninnukleotiden der RNA betrug bei Spg I, Spg II und frühen Spermien nie mehr als 0,1 % und war erstaunlicherweise mit fast 2 %

bei den späten Spermien (April) am höchsten. Der zeitliche Verlauf des Einbaus von exogenem Inosin in die RNA wurde nur bei frühen Spermien (Jan.) untersucht; dabei hat sich gezeigt, dass dieser Einbau auch nach 48 h noch weiter ansteigt (Daten nicht gezeigt).

In der DNA von Spg II und frühen Spermien waren nach Inkubation mit ^{14}C -Inosin sowohl die Adenin- als auch die Guaninnukleotide markiert: Beide Purinnukleoside bestanden bei Spg II allerdings nur zu 0,04 % aus konvertiertem, exogenem Inosin, bei frühen Spermien wurde exogenes Inosin nicht zur Synthese der DNA verwendet. Exogenes Inosin wurde während der Entwicklung der Keimzellen nur in sehr geringem Maß auch in das Lipid der Keimzellen eingebaut; in das Protein wurde dagegen überhaupt kein exogenes Inosin eingebaut.

Die rechte Tabellenhälfte der **Tabelle 5** zeigt, dass der Guanosinpool der Spermien nach 48 stündiger Inkubation mit ^{14}C -Guanosin etwa zu 30 % aus exogenem Guanosin bestand, die restlichen 70 % müssen demnach endogener Herkunft sein. Ob das endogene Guanosin durch *de novo* Synthese entstanden ist, oder ob die Zelle gespeicherte Nukleotide zu Guanosin abgebaut hat kann anhand der Ergebnisse nicht festgestellt werden.

Die **Tabelle 5** zeigt auch, dass männliche Keimzellen, im Gegensatz zu den Oozyten, exogenes Guanosin fast nur für die Bildung von Guaninnukleotiden genutzt haben. Ein Umbau von aufgenommenem Guanosin zu Adeninnukleotiden fand dagegen, in sehr geringem Ausmaß, nur bei Spg I (August) statt. Der Gesamtgehalt an Guaninnukleotiden hatte sich während der Keimzellreifung kaum verändert: Inkubiert man Spg I (vom August) mit ^{14}C -Guanosin so sieht man, dass nach 48 h immerhin die Hälfte (!) der Guaninnukleotide aus konvertiertem, exogenem Guanosin bestand, inkubiert man dagegen Spg II (Oktober) auf dieselbe Weise so waren es nur noch 5 % und der Guaninnukleotidpool von Spermien (vom Jan. bzw. April) bestand nach 48 h Inkubation zu 16 bzw. 23 % aus konvertierten, exogenen Guanosins. Die **Abb. 60 b** zeigt, den Umbau von exogenem Guanosin zu Guaninnukleotiden bei frühen Spermien (Jan.): Bereits nach 24 h veränderte sich die Umbaurate kaum mehr dh, dass die Bildung von Guaninnukleotiden und deren weitere Metabolisierung nach 24 h im Gleichgewicht war - erkennbar ist dies auch daran, dass sich die spezifische Aktivität der Guaninnukleotide nach 24 bzw. 48 h nicht mehr geändert hat. Der Anteil des exogenen Guanosin am Guaninnukleotidpool belief sich zu diesem Zeitpunkt, wie gesagt, auf 16 %. Über 80 % der Guaninnukleotide waren demnach endogenen Ursprungs. Ein Teil davon wurde sicherlich durch die Wiederverwertung des gleichzeitig aufgenommenen Inosins gebildet (siehe oben). Der andere Teil muss endogen entstanden sein. Durch den Vergleich der spezifischen Aktivität des Guaninnukleotid-Pools mit der spezifischen Aktivität des Guanosinpools kann man bestimmen welcher Anteil der Guaninnukleotide aus dem Guanosinpool, also aus dem Gemisch von exogenem und endogenem Guanosin entstanden ist: Man sieht in **Abb. 60 b**, dass die spezifische Aktivität des Guaninnukleotid-Pools zu diesem Zeitpunkt etwa 1/3 bis 1/2 so hoch war wie die spezifische Aktivität des Guanosinpools (siehe **Abb. 60 a**); das bedeutet, dass etwas weniger als die Hälfte der Guaninnukleotide aus dem Guanosinpool entstanden sind.

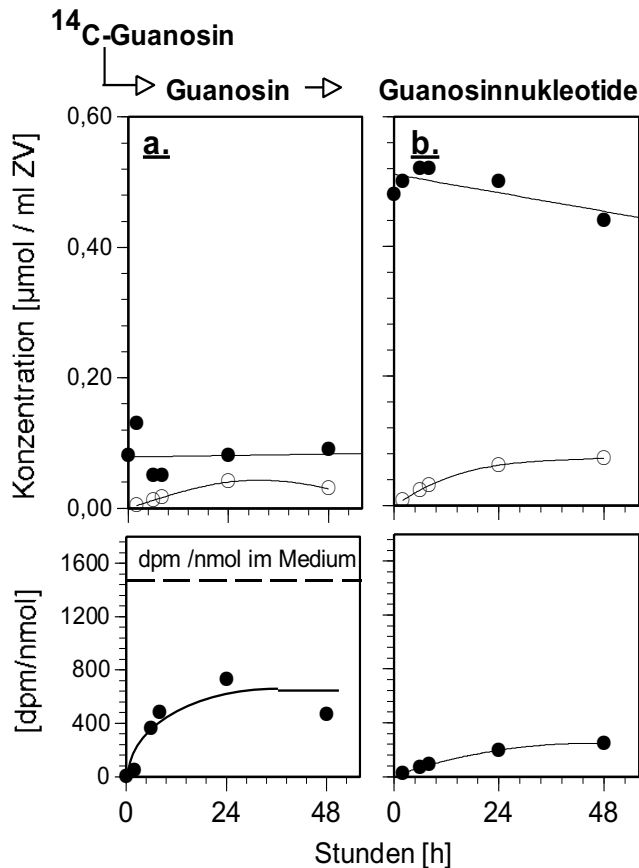


Abb. 60 (a+b) : (a) Aufnahme von ^{14}C -Guanosin (\circ) durch frühe Spermien (Jan.) und (b) Umbau des aufgenommenen Guanosins zu Guaninnucleotiden (\circ) bei einem standardisierten Inosinangebot von $60 \mu\text{M}$: die obere Diagrammreihe zeigt außerdem jeweils die mittels HPLC gemessene Gesamtmenge des Guanosins (\bullet) und der Guaninnucleotide (\bullet); die untere Diagrammreihe gibt die spezifische Aktivität des Guanosinpools, des Inosins im Medium und des Guaninnucleotidpools an.

Die **Tabelle 5** zeigt auch, dass nur Spg II aufgenommenes Guanosin zu Inosin konvertiert haben; der Inosinpool der Spg II bestand nach 48 h sogar zu 27 % aus konvertiertem, exogenem Guanosin. Die **Tabelle 5** zeigt außerdem, dass exogenes Guanosin auch in die Nucleinsäuren männlicher Keimzellen eingebaut wurde: Nach Inkubation mit ^{14}C -Guanosin waren, wie schon nach Inkubation mit ^{14}C -Inosin (siehe oben), nur die Guaninnucleotide nicht aber die Adeninnucleotide der RNA markiert: Nach 48 h bestanden die Guaninnucleotide in den Keimzellen aller Reifungsstadien etwa zu 2 % aus konvertiertem, exogenem Guanosin. Der zeitliche Verlauf des Einbaus von exogenem Guanosin in die RNA wurde nur bei frühen Spermien (Jan.) untersucht; dabei hat sich gezeigt, dass dieser Einbau nach 48 h gleich blieb (Daten nicht gezeigt).

In der DNA waren nach Inkubation mit ^{14}C -Guanosin ebenfalls nur die Guaninnucleotide radioaktiv markiert: die Guaninnucleotide der DNA bestanden bei Spg I nach 48 h allerdings nur zu 0,2 % und bei Spg II nur zu 0,02 % aus konvertiertem, exogenem Inosin.

Exogenes Guanosin wurde während der Reifung der männlichen Keimzellen in sehr geringem Maß auch in das Lipid der Keimzellen eingebaut; im Protein war dagegen kein exogenes Guanosin nachzuweisen.

Vermutlich während der Differenzierung der Spermatidentetraden zu Spermientetraden werden die sogenannten Residualkörper abgeschnürt. Die freigewordenen Residualkörper kann man ab Februar/März in großer Zahl neben den Spermien im Cölom der Tiere finden. Man sieht in **Tabelle 5**, dass die Residualkörper dieselben Purinnucleoside und Purinmetabolite wie die Keimzellen enthielten. Dabei fällt auf, dass sie über große Mengen an freiem Guanosin und an RNA verfügten. Die Residualkörper wurden ebenfalls 48 h mit ^{14}C -Guanosin inkubiert: Nach 48 h war von dem aufgenommenen Guanosin $1 \mu\text{mol/ml ZV}$ als

freies, dh unmetabolisiertes Guanosin in den Residualkörpern verblieben - das entspricht dem 30-fachen dessen was im selben Zeitraum an exogenem Guanosin z.B. in den Spermien zu finden war, dennoch machte diese Menge kaum mehr als 0,5 % des gesamten Guanosins in den Residualkörpern aus. Die **Tabelle 5** zeigt außerdem, dass in den Residualkörpern exogenes Guanosin zu Guaninnukleotiden metabolisiert wurde: Die Residualkörper enthielten zwar nur 0,02 $\mu\text{mol/ml}$ ZV an Guaninnukleotiden, davon bestand aber nach 48 h gut die **Hälfte (!)** aus exogenem Guanosin - die dafür nötigen Kinasen müssen also in den Residualkörpern noch aktiv gewesen sein. Eine Konvertierung des exogenen Guanosins zu Inosin oder ein Umbau zu Adeninnukleotiden hatte dagegen auch in den Residualkörpern nicht stattgefunden. Ein Einbau in die RNA war nicht nachzuweisen, damit kann ausgeschlossen werden, dass die Residualkörper noch RNA synthetisieren können.

Über die Bedeutung des exogenen Inosins bzw. Guanosins für den Nukleosid-Metabolismus männlicher Keimzellen von *Nereis virens* läßt sich zusammengefaßt folgendes sagen:

- ⇒ Zumindest für frühe Spermien (Januar) konnte gezeigt werden, dass in den Keimzellen ein beständiger turn-over von Nukleosiden bzw. Nukleotiden stattgefunden hat. Außerdem konnte gezeigt werden, dass dieser turn-over nach 48 bzw. 72 h im Gleichgewicht war.
- ⇒ Die Untersuchungen haben außerdem gezeigt, dass in den Keimzellen in Abhängigkeit vom Reifungsstadium jeweils nur ein Teil der intrazellulären Purinnukleoside bzw. Purinmetabolite aus exogenen Purinnukleosiden entstanden war, der andere Teil muss durch *de novo* Synthese und/oder durch die Konvertierung vorhandener Nukleotide entstanden sein.
- ⇒ Auch in männlichen Keimzellen war ein Teil des aufgenommenen Inosins bzw. Guanosins in unmetabolisierter Form im Cytoplasma verblieben: Der Inosinpool bestand nach 48 h bei Spg I immerhin zu 60 % und bei Spermien (Jan-April) zu 35 bzw. 65 %, bei Spg II aber nur zu 3 % aus exogenem Inosin. Der Guanosinpool männlicher Keimzellen bestand in den unterschiedlichen Reifungsstadien dagegen nach 48 h wenigstens zu 12 % und höchstens zu 30 % aus exogenem Guanosin.
- ⇒ Es konnte außerdem gezeigt werden, dass männliche Keimzellen exogenes Inosin zu Adenin- und Guaninnukleotiden umbauen. Exogenes Guanosin wurde sogar fast nur für die Bildung von Guaninnukleotiden verwendet: Bei Spg I bestand nach 48 h sogar die Hälfte des Guaninnukleotid-Pools aus exogenem Guanosin.
- ⇒ Erstaunlicherweise konvertierten nur Spg II exogenes Inosin zu Guanosin und *vice versa*: Nach Inkubation mit Inosin bestand der Guanosinpool der Spg II nach 48 h zu fast 20 % aus konvertiertem, exogenem Inosin. Nach Inkubation mit Guanosin bestand der Inosinpool sogar zu 27 % aus konvertiertem, exogenem Guanosin.
- ⇒ Exogenes Inosin und Guanosin gelangten auch in die Nukleinsäuren männlicher Keimzellen, sie wurden dort aber bevorzugt für die Bildung von Guanosinbausteinen verwendet: Nach 48 stündiger Inkubation mit ^{14}C -Inosin bestanden die RNA-Nukleotide von Spg I - II zu maximal 0.1 % und bei Spermien (Jan.-Apr.) zu knapp 1 - 2 % aus exogenem Inosin. Der Anteil des zu Nukleotiden konvertierten exogenen Guanosins an den RNA-Nukleotiden war dagegen nicht erkennbar vom Reifungsstadium abhängig und betrug in allen Stadien etwa 2 %. Nur in der DNA von Spg I waren nach Inkubation mit ^{14}C -Inosin neben den Guanin- auch die Adeninnukleotide markiert - die Purinnukleotide der DNA bestanden nach 48 h nur zu 0,04 % aus umgebautem, exogenem Guanosin. Nach Inkubation mit ^{14}C -Guanosin bestanden die Nukleotide der DNA in den Spg I etwa zu 0,2 % und in den Spg II nur zu 0,02 % aus umgebautem, exogenem Guanosin.

- ⇒ Exogenes Inosin und exogenes Guanosin wurden nur in sehr geringem Ausmaß in das Lipid männlicher Keimzellen eingebaut; ein Einbau in das Protein war dagegen nie nachzuweisen.
- ⇒ Die Inkubation von Residualkörpern mit ^{14}C -Guanosin hat gezeigt, dass der überwiegende Teil des exogenen Guanosin in unmetabolisierter Form in den Residualkörpern verblieben war; dabei stellte das in 48 h aufgenommene exogene Guanosin nur 0.5 % des enorm großen Guanosinpools (185 $\mu\text{mol/ml}$ ZV) dar. Ein Teil des exogenen Guanosin wurde von den Residualkörpern offensichtlich zu Guaninnukleotiden umgebaut; die Guaninnukleotide bestanden nach 48 h immerhin zur Hälfte (!) aus umgebautem, exogenem Guanosin. Ein Umbau von exogenem Guanosin zu anderen Metaboliten fand offensichtlich nicht statt.

2.4.6 Stoffwechselbilanz exogener Nucleoside in männlichen Keimzellen

Auch bei den männlichen Keimzellen konnten anhand der markierten Metabolite, die nach Inkubation mit ^{14}C -Inosin bzw. ^{14}C -Guanosin auftraten und aufgrund der Kenntnisse über den Purinmetabolismus bei anderen Zellen, die Reaktionswege der Purinnucleoside rekonstruiert werden. Die **Abb. 61** und **Abb. 62** zeigen die so ermittelten Reaktionswege für Inosin bzw. für Guanosin im Purinstoffwechsel männlicher Keimzellen. Hierbei interessiert aber auch das Ausmaß, mit dem die exogenen Nucleoside zu den einzelnen Metaboliten umgewandelt wurden und ob das Ausmaß dieser Metabolisierungen vielleicht mit dem Reifungsstadium der Keimzellen im Zusammenhang steht. Dazu wurden die Stoffwechselbilanzen der exogenen Purinnucleoside berechnet (Prozentangaben oberhalb der Reaktionspfeile in **Abb. 61** und **Abb. 62**). Zur Berechnung der Stoffwechselbilanz siehe Legende der **Abb. 56**.

Man sieht in der **Abb. 61**, dass das **aufgenommene Inosin** im Laufe der Keimzellreifung zu sehr unterschiedlichen Anteilen dh zu 60, 11, 85 und 97 % als freies, unmetabolisiertes Inosin in den männlichen Keimzellen verblieben war (kursive Prozentangaben). Da zu keinem Zeitpunkt der Keimzellreifung die bekannten Abbauprodukte des Inosins - Hypoxanthin, Xanthin oder Harnsäure - nachweisbar waren kann man davon ausgehen, dass der metabolisierte Anteil des aufgenommenen Inosins im Stoffwechsel männlicher Keimzellen zu 100 % anabolisiert worden ist (siehe **Abb. 61**): **Exogenes Inosin** wurde im Purinstoffwechsel männlicher Keimzellen zu Adenin- bzw. Guaninnucleotiden umgebaut; vor allem die Guaninnucleotide wurden offensichtlich auch für die Synthese von Nucleinsäuren verwendet. Vermutlich wurde exogenes Inosin in Form von Adennucleotiden auch in das Lipid bzw. in das Protein eingebaut. Das relative Ausmaß mit dem die einzelnen Reaktionswege zu unterschiedlichen Reifungsstadien beschriftet wurden soll im Folgenden genauer besprochen werden.

Die erste Reaktion des sogenannten **Purin-Salvage-Weges** ist eine Phosphorylierung des Inosins mit Hilfe einer 5'-Kinase; das resultierende Inosinmonophosphat (IMP) ist Ausgangspunkt für die Bildung von Adennucleotiden und - über die Zwischenform XMP - für die Bildung von Guaninnucleotiden. Tatsächlich konnten IMP und XMP mit Hilfe der HPLC nachgewiesen werden, eine Markierung dieser Nucleotide war allerdings, aufgrund ihrer durchweg geringen Konzentration in den Zellen nicht oder nur selten meßbar. Das mag daran liegen, dass die Konzentrationen von Nucleotidmono- und Diphosphaten in tierischen Zellen typischerweise niedriger als die von Triphosphaten sind (Rudolph, 1994). Da das Inosin aber im Laufe der Keimzellreifung zu 64, 66, 69, 15 % zu Adenin- und mit 38, 36, 27, 84 % zu Guaninnucleotiden umgebaut wurde, muss man folgern, dass sie aus IMP bzw. XMP entstanden sind. Dabei fällt auf, dass späte Spermien (Apr.) exogenes Inosin hauptsächlich zu Guaninnucleotiden umgebaut haben.

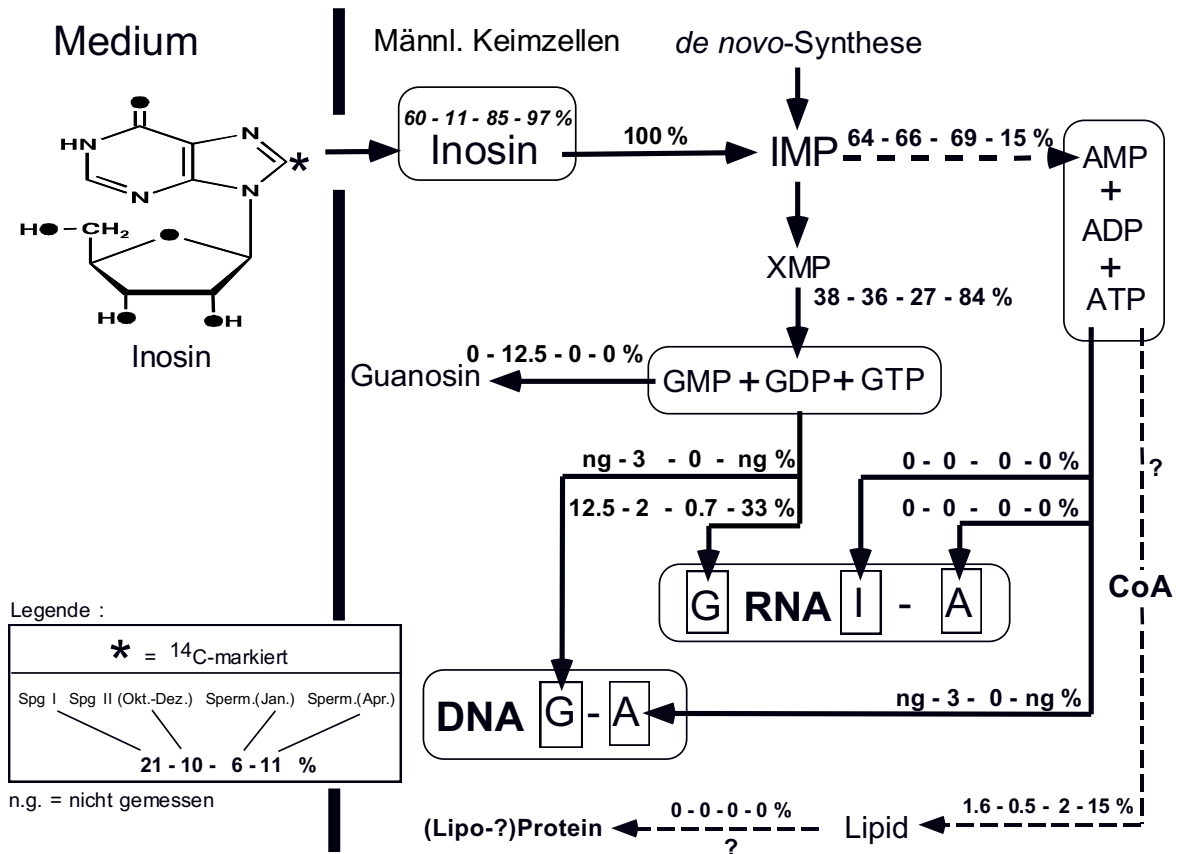


Abb. 61 : Weg des aufgenommenen ¹⁴C-Inosins im Purin-Stoffwechsel männlicher Keimzellen von *Nereis virens*. Es wurden jeweils Keimzellen eines Tieres 48 h mit ¹⁴C-Inosin inkubiert. Die Gesamtmenge des **metabolisierten** Inosins (**0.08; 0.16; 0.015** und **0.0045** μmol/ml ZV - siehe **Tabelle 5**) wurde in den vier untersuchten Reifungsstadien gleich 100 gesetzt; die Stoffwechselbilanzen des aufgenommenen Inosins (siehe Prozentangaben oberhalb der Reaktionspfeile) wurden, wie in der Legende der **Abb. 56** beschrieben, berechnet. Die kursiv dargestellten Prozentangaben oberhalb des Inosins geben das Ausmaß an, mit dem aufgenommenes Inosin in unmetabolisierter Form in den Keimzellen verblieben war. Bedeutung der Prozentangaben: **Spg I** (1.Zahl), **Spg II** (2.Zahl), **frühe Spermien** (3.Zahl) und **späte Spermien** (4.Zahl). Abkürzungen siehe Legende der **Abb. 56**.

Adenin- bzw. Guaninnukleotide können zu Adenosin bzw. zu Guanosin abgebaut werden: Adenosin war aber in keinem Reifungsstadium markiert, ein Abbau von Adeninnukleotiden zu Adenosin hat demnach nicht stattgefunden. Ein Abbau von exogenem Inosin, über die Guaninnukleotide, zu Guanosin war erstaunlicherweise nur bei Spg II nachzuweisen, fast 13 % des exogenen Inosins wurden auf diesem Weg zu Guanosin konvertiert. Adenin- bzw. Guaninnukleotide dienten den männlichen Keimzellen schließlich aber auch als Bausteine für die Nukleinsäuresynthese. Dabei fällt auf, dass in keinem Reifungsstadium exogenes Inosin nach Konversion in Form von Adeninnukleotiden, sondern nur in Form von Guaninnukleotiden in die RNA eingebaut wurde: Spg I bauten knapp 13 % des exogenen Inosins in Form von Guaninnukleotiden in die RNA ein; bei Spg II waren es dagegen nur noch 2 % und bei frühen Spermien (Jan.) nur noch knapp 1 %; bei späten Spermien (Apr.) gelangten erstaunlicherweise auf diesem Weg sogar 33 % (!) des exogenen Inosins in die RNA. Exogenes Inosin gelangte dagegen in Form von Guanin- **und** Adeninnukleotiden in die DNA: Spg II bauten 3 % des exogenen Inosins als Guaninnukleotide und fast 3 % als Adeninnukleotide in die DNA ein. Bei

Spg I und späten Spermien wurde der Einbau von exogenem Inosin in die DNA nicht untersucht.

In allen untersuchten Reifungsstadien war nach der Inkubation mit ^{14}C -Inosin immer auch die Lipidfraktion radioaktiv markiert. Dabei fällt auf, dass das Ausmaß, mit dem exogenes Inosin in die Lipidfraktion gelangt war, von knapp 2 % bei Spg I und frühen Spermien auf 15% bei späten Spermien (April) zugenommen hatte. In der Proteinfraction war kein Einbau von ^{14}C -Inosin nachweisbar.

In der **Abb. 62** sieht man, dass **exogenes Guanosin**, im Gegensatz zum exogenen Inosin, im Laufe der Keimzellreifung zu einem vergleichsweise geringen Teil, dh zu 12 % bis maximal 27 % als freies, unmetabolisiertes Guanosin in männlichen Keimzellen verblieben war (kursive Prozentangaben). Da zu keinem Zeitpunkt der Keimzellreifung ein Abbau von exogenem Guanosin zu Guanin oder Xanthin nachweisbar war kann man davon ausgehen, dass der andere Teil des aufgenommenen Guanosins zu 100 % anabolisiert wurde (siehe **Abb. 62**): **Exogenes Guanosin** wurde im Purinstoffwechsel männlicher Keimzellen zu Adenin- und Guaninnukleotiden umgebaut. Die Guaninnukleotide wurden offensichtlich für die RNA- und DNA-Synthese verwendet, während die Adeninnukleotide weder für die RNA- noch für die DNA-Synthese Verwendung fanden. Exogenes Guanosin wurde außerdem zu Inosin konvertiert und vermutlich in Form von Adeninnukleotiden auch in das Lipid, nicht aber in das Protein eingebaut. Das Ausmaß mit dem die einzelnen Reaktionswege zu unterschiedlichen Reifungsstadien beschriftet wurden soll im Folgenden, ausgehend vom Guanosin, genauer besprochen werden.

Die erste Reaktion auf dem sogenannten **Purin-Salvage-Weg** ist eine Phosphorylierung des Guanosins mit Hilfe einer 5'-Kinase; das daraus resultierende Guanosinmonophosphat (GMP) kann mit Hilfe anderer Kinasen (Mono- bzw. Diphosphatkinasen) zu GDP bzw. GTP umgewandelt werden. Ausgehend von den Guaninnukleotiden können sich die Reaktionswege prinzipiell in mehrere Richtungen verzweigen. Wie bereits bei den Oozyten erwähnt, kann eine Zelle GMP nur dann zu IMP umbauen, wenn sie über eine GMP-Reduktase verfügt. In den Zellen der meisten Reifungsstadien war nach Inkubation mit ^{14}C -Guanosin eine Markierung des IMP zwar nicht nachzuweisen, dafür waren aber die Adeninnukleotide und in einem Stadium auch das Inosin markiert - beide können nach gegenwärtigem Wissensstand nur aus IMP entstanden sein. In Spg II wurde exogenes Guanosin auf dem Weg über GMP und IMP zu fast 6 % zu Inosin konvertiert; in allen anderen Stadien wurde dieser Weg dagegen nicht beschriftet. Exogenes Guanosin wurde zwar auf dem Weg über GMP und IMP in allen Reifungsstadien zu Adeninnukleotiden umgebaut, das Ausmaß dieses Umbaus war mit 2.4 % bei Spg I und mit maximal 0.4 % bei den nachfolgenden Reifungsstadien aber sehr gering. Wenn man das relative Ausmaß, mit dem exogenes Guanosin zu Inosin und zu Adeninnukleotiden metabolisiert wurde, addiert, kann man schließen, dass im Verlauf der Keimzellreifung nie mehr als 6 % des exogenen Guanosins zu IMP umgebaut worden ist.

Die aus exogenem Guanosin entstandenen Guanin- bzw. Adeninnukleotide dienen den männlichen Keimzellen auch als Bausteine für die Nukleinsäuresynthese: Immerhin 16 % des exogenen Guanosins wurden bei Spg I in Form von Guaninnukleotiden in die RNA eingebaut; bei allen nachfolgenden Reifungsstadien waren es höchstens 5 %. In Form von Guaninnukleotiden gelangten dagegen sogar 64 bzw. 38 % des exogenen Guanosins in die DNA von Spg II und frühen Spermien (Jan.).

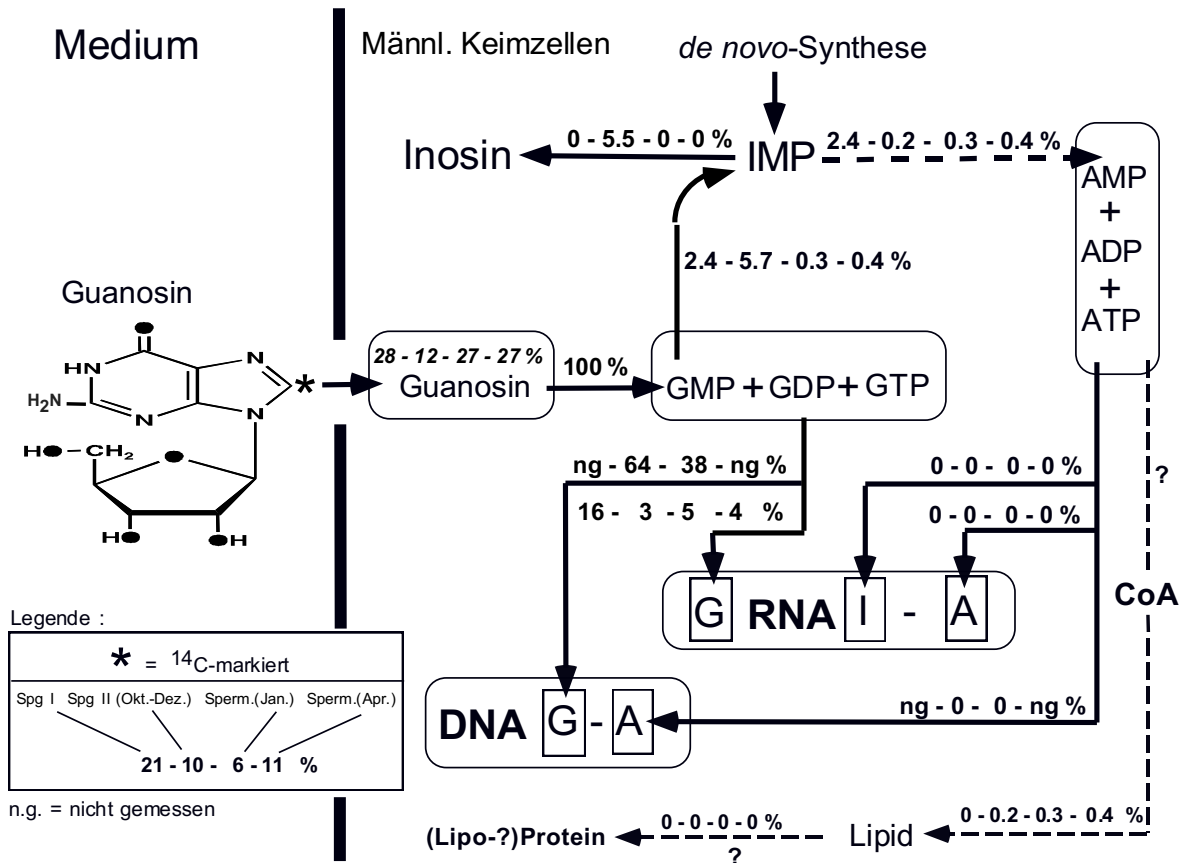


Abb. 62 : Weg des aufgenommenen ¹⁴C-Guanosins im Purin-Stoffwechsel männlicher Keimzellen von *Nereis virens*. Es wurden jeweils Keimzellen eines Tieres 48 h mit ¹⁴C-Guanosin inkubiert. Die Gesamtmenge des metabolisierten Guanosins (**0.25; 0.11; 0.08** und **0.0833** μmol/ml ZV - siehe **Tabelle 5**) wurde in den vier untersuchten Reifungsstadien gleich 100 gesetzt; die Stoffwechselbilanzen des aufgenommenen Guanosins (siehe Prozentangaben oberhalb der Reaktionspfeile) wurden, wie in der Legende der **Abb. 56** beschrieben, berechnet. Die kursiv dargestellten Prozentangaben oberhalb des Guanosins geben das Ausmaß an, mit dem aufgenommenes Guanosin in unmetabolisierter Form in den Keimzellen verblieben war. Bedeutung der Prozentangaben siehe Legende der **Abb. 61**. Abkürzungen siehe Legende der **Abb. 56**.

Die aus exogenem Guanosen entstandenen Adeninnukleotide wurden erstaunlicherweise weder für die RNA- noch für die DNA-Synthese verwendet. Auch nach der Inkubation mit ¹⁴C-Guanosin war in allen untersuchten Reifungsstadien, mit Ausnahme der Spg I, die Lipidfraktion radioaktiv markiert. Das ¹⁴C-Guanosin gelangte vermutlich über die Adeninnukleotide in die Lipidfraktion der Oozyten. Das relative Ausmaß, mit dem das exogene Guanosen in das Lipid gelangte, war aber mit maximal 0.4 % sehr gering. In der Proteinfraktion war kein Einbau von ¹⁴C-Guanosin nachweisbar.

Über die Stoffwechselbilanz des exogenen Inosins bzw. Guanosins in männlichen Keimzellen von *Nereis virens* läßt sich zusammengefaßt folgendes sagen:

- ⇒ Aufgenommenes Inosin verblieb zumeist in deutlich größerem Ausmaß, dh zu 60, 11, 85 und 97 % **unmetabolisiert** im Cytoplasma heranreifender männlicher Keimzellen, als Guanosin (12-27 %); der metabolisierte Anteil der aufgenommenen Purinnukleoside wurde im Stoffwechsel männlicher Keimzellen zu 100 % anabolisiert.
- ⇒ Männliche Keimzellen von *Nereis virens* nutzen exogene Purinnukleoside auf dem Salvage-Weg zur Synthese von Adenin- und Guaninnukleotiden.
- ⇒ Die aus **exogenem Inosin** gebildeten Guanin- und Adeninnukleotide dienten den männlichen Keimzellen als Bausteine für die Nukleinsäuresynthese: Vor allem Spg I und späte Spermien (Apr.) bauten konvertiertes exogenes Inosin in größerem Umfang, dh zu 13 bzw. 33 %, als Guaninnukleotid in die RNA ein. Exogenes Inosin gelangte als Guaninnukleotid zu 3 % auch in die DNA von Spg II; die Guaninnukleotide in der DNA früher Spermien waren nicht markiert. Die aus exogenem Inosin entstandenen Adeninnukleotide wurden zu keinem Zeitpunkt der Spermatogenese für die RNA- sondern nur für die DNA-Synthese verwendet: Bei Spg II wurden 3 % des exogenen Inosins als Adeninnukleotid in die DNA eingebaut; die Adeninnukleotide in der DNA früher Spermien waren nicht markiert. Von den aus **exogenem Guanosin** gebildeten Nukleotiden dienten den männlichen Keimzellen erstaunlicherweise nur die Guaninnukleotide als Bausteine für die Nukleinsäuresynthese: Spg I bauten exogenes Guanosin immerhin zu 16 % in die RNA ein; bei allen nachfolgenden Spermatogenesestadien waren es höchstens 5 %. Exogenes Guanosin gelangte auf diesem Weg sogar zu 64 % bzw. 38 % in die DNA von Spg II bzw. von frühen Spermien.
- ⇒ Im Stoffwechsel männlicher Keimzellen wurde exogenes Inosin nur in geringem Maße zu Guanosin konvertiert und *vice versa*; auffallend ist, dass diese Interkonversion nur in Spg II nachzuweisen war; dies spricht zwar für das Vorhandensein einer GMP-Reduktase läßt aber vermuten, dass diese nicht in allen Spermatogenesestadien aktiv war.
- ⇒ Nach der Inkubation mit ¹⁴C-Inosin bzw. Guanosin war in allen untersuchten Spermatogenesestadien die Lipidfraktion radioaktiv markiert - die exogenen Purine gelangten vermutlich über die Adeninnukleotide in die Lipidfraktion der Keimzellen. In späten Spermien waren sogar 15 % des exogenen Inosins in Form von Adeninnukleotiden in das Lipid gelangt. Die Proteinfraction war nach Inkubation mit radioaktiven Nukleosiden nicht markiert.
- ⇒ Die Befunde haben klar gezeigt, dass das Ausmaß, mit dem die verschiedenen Wege des Purinstoffwechsels besritten wurden, oft signifikant vom Spermatogenesestadium abhing.

3 Diskussion

3.1 Sekretion von Nucleosiden durch Elaeozyten von *Nereis virens*

Es konnte gezeigt werden, dass Elaeozyten *in vitro* Nucleoside sezernieren (siehe **Kapitel: 2.1.**). Der Befund, dass man dieselben Nucleoside auch in der Cöloflüssigkeit findet impliziert, dass sie dies auch *in vivo* tun. Dabei bleibt offen, ob es für die in der Cöloflüssigkeit gefundenen Nucleoside noch andere Quellen gibt. Schon die Elaeozyten geschlechtlich indifferenten Tiere, sogenannter I-Tiere, sezernierten Nucleoside. Nach dem Eintritt der Tiere in die Geschlechtsreife sezernierten die Elaeozyten Nucleoside mit geschlechts- und reifungsstadienspezifischer Rate: Männliche Elaeozyten sezernierten bereits zu Beginn große Mengen an Nucleosiden, wobei die Sekretionsraten für Inosin bzw. Guanosin bis zum Ende der Geschlechtsreife etwa gleich blieben, während die Sekretionsraten der Desoxynucleoside erstaunlicherweise erst gegen Ende der Geschlechtsreife stark angestiegen waren. Elaeozyten weiblicher Tiere sezernierten dagegen nur am Anfang größere Mengen Nucleoside. Die Sekretionsraten männlicher Elaeozyten lagen in jedem Fall um ein Vielfaches über denen der weiblichen.

Es gibt in der Literatur eine unüberschaubare Zahl von Untersuchungen zur Aufnahme von Nucleosiden durch verschiedene Zellen; Untersuchungen zum Nucleosidflux gibt es dagegen vergleichsweise wenig. Einige Beispiele zur Sekretion von Nucleosiden durch verschiedene Zellen sind in **Tabelle 6** aufgeführt.

Art	sezernierte Nucleoside	extrazell. Konzentration [μM]	Abgabe durch:	Aufnahme durch:	Literaturangabe
<i>Nereis virens</i> (Cöloflüssigkeit)	Ino, Gua, dIno, dGua	1 - 1000 1- 5	Elaeozyten	Keimzellen	Geier, Diplomarbeit 1992
Maus (Follikelflüssigkeit)	Hypoxanthin , Ade, Ino	?	Follikelzellen	Oozyten	Downs et al, 1986
Mensch (Samenflüssigkeit)	Ino, Gua	19 -20	?	Keimzellen ?	Fabiani, et al 1995
Ratte (Samenflüssigkeit ?)	Thymidin	?	Sertoli-Zellen	Keimzellen	Lamp et al, 1994
Schwein (Blutplasma)	Inosin, Hypoxanthin	2 - 11	Hepatozyten	Erythrozyten	Zeidler et al, 1985

Tabelle 6: Sekretion von Nucleosiden durch Zellen verschiedener Tierarten in Körperflüssigkeiten. (**Ino** = Inosin; **Gua** = Guanosin; **dIno** und **dGua** = Desoxyinosin bzw. -guanosin; **Ade** = Adenosin.

Bei Wirbeltieren ist die Leber ein wichtiges Organ für die Synthese und Sekretion von Nukleosiden; die Nukleoside werden über die Blutbahn transportiert und von den Zellen aufgenommen; dies ist vor allem für solche Zellen von Bedeutung die wie z.B. die Erythrozyten Nukleoside nicht *de novo* synthetisieren können. Zeidler et al (1985) haben gezeigt, dass die Leber des Miniaturschweins bis zu 0,024 $\mu\text{mol/g}$ pro Minute Inosin sezerniert. Das entspricht dem 7 – 400-fachen dessen was dieselbe Menge an *Nereis*-Elaeozyten beiderlei Geschlechts pro Minute sezerniert. Auch die Follikelzellen der Säuger sezernieren Nukleoside. Follikelzellen geben aber nur einen kleinen Teil der Nukleoside in die Follikelflüssigkeit ab, der größte Teil wird wahrscheinlich direkt über **Gap junctions** zu den Oozyten transportiert. Bei vielen Säugern wurde sogar gefunden, dass Oozyten Purin- bzw. Pyrimidinnukleoside wahrscheinlich **nur** in enger Verbindung zu Follikelzellen aufnehmen können (Downs, 1986). Männlichen Keimzellen der Säuger werden durch Sertolizellen mit Nährstoffen versorgt. Sertoli-Zellen der Ratte sezernieren Thymidin, welches vermutlich von den Keimzellen aufgenommen wird (Lamp et al, 1994). Aber auch bei der Schnecke *Biomphalaria glabrata* gibt es Sertoli Zellen von denen man annimmt, dass sie Nährstoffe an die Keimzellen liefern (de Jong-Brink et al, 1977).

Die Versorgung heranwachsender Oozyten mit Nährstoffen durch „akzessorische“ Zellen ist aber auch bei Spiraliern, zu denen *Nereis virens* gehört, durchaus nichts Ungewöhnliches (siehe Schroeder et al, 1975; Cowden, 1976). Je nach Entstehungsort unterscheidet man **Nährzellen**, die wie die Oozyten der Keimbahn entstammen und die **Follikelzellen**, die somatischen Ursprungs sind. Bei dem Anneliden *Ophryotrocha labronica* werden die Nährzellen zusammen mit den Oozyten in das Cölom entlassen; je eine Nährzelle bildet mit einer Oozyte den sogenannten **Nährzell-Oozyten Komplex**. Die Nährzelle versorgt die Oozyten über eine Cytoplasma-Brücke mit Metaboliten und Organellen (Emanuelsson, 1985). Die Oozyten von *Loligo brevis* sind dagegen mit einer Schicht somatischer Follikelzellen umgeben (Cowden, 1976). Keine dieser beiden Strategien trifft auf die *Nereis*-Oozyten zu. *Nereis*-Oozyten sind weder mit einer Nährzelle assoziiert noch von einer permanenten Schicht somatischer Zellen umgeben. Man findet allerdings, dass *Nereis*-Oozyten *in vivo* oft mit den normalerweise frei im Cölom flottierenden Elaeozyten besetzt sind. Hierbei handelt es sich aber nur um eine sehr lockere Assoziation von Elaeozyten und Oozyten. Allein die räumliche Nähe der Elaeozyten zu den Keimzellen könnte dazu beitragen, dass der Stofftransport optimiert wird. Eine strenge Form der metabolischen Koppelung, wie bei dem Oozyten-Follikelkomplex mancher Säuger, gibt es bei *Nereis*-Oozyten sicherlich nicht. Dies ergibt sich aus der direkten Beobachtung und aus dem Befund, dass die *Nereis*-Oozyten auch in Abwesenheit der Elaeozyten sehr effektiv Nukleoside aufnehmen (siehe **Kapitel 2.2**). Die Elaeozyten der Nereiden stehen nach Beobachtungen von Dhainaut (1966) an *Nereis pelagica* und nach Fischer (pers. Mitt.) an *Platynereis dumerilii* nicht über Gap junctions mit den Oozyten in Verbindung. Männliche Keimzellstadien von *Nereis virens* sind dagegen nie mit Elaeozyten assoziiert.

Nach Cowden (1976) finden sich bei Spiraliern eine unüberschaubare Vielzahl verschiedener Strategien zur Versorgung von Oozyten durch „akzessorische“ Zellen. Über die Versorgung männlicher Spiraler-Keimzellen durch akzessorische Zellen ist dagegen meines Wissens bisher nichts bekannt.

Schon Dales (1961) hat vermutet, dass Cölomzellen, zu denen die hier besprochenen Elaeozyten gehören, durch Phagozytose Reservestoffe akkumulieren, die sie dann an heranwachsende Keimzellen weitergeben. *Nereis*-Elaeozyten sind tatsächlich phagozytotisch sehr aktive Zellen: Vor allem gegen Ende der Geschlechtsreifung ingestieren sie Muskeltrümmer, sogenannte Sarkolyten, die oft mehr als doppelt so lang sind wie sie selbst

(siehe Geier, Diplomarbeit 1992; Geier in Fischer und Hoeger 1993). Dementsprechend konnten in den Elaeozyten, im Vergleich zu anderen Geweben, mit Ausnahme des Verdauungstraktes, hohe hydrolytische Aktivitäten nachgewiesen werden (Hoeger, 1991). Von phagozytotisch aktiven Zellen ist bekannt, dass sie mit einer zusätzlichen Menge Nukleotiden beladen sind, derer sie sich irgendwie entledigen müssen (Berlin et al, 1975). Auch *Nereis*-Elaeozyten verfügen bereits zu Beginn der Geschlechtsreifung über extrem hohe Mengen an Adeninnukleotiden (Hoeger et al, 1996), dies kann zu diesem Zeitpunkt aber noch nicht durch die Phagozytose von Sarkolyten erklärt werden, da größere Mengen an Sarkolyten erst gegen Ende der Geschlechtsreifung in der Cölomflüssigkeit zu finden sind. Möglicherweise haben die Elaeozyten die großen Mengen an Adeninnukleotiden bereits bei ihrer Entstehung mitbekommen, doch ist darüber bisher nichts bekannt.

In den Elaeozyten konnte ein Zusammenhang zwischen dem Abbau der gespeicherten Adeninnukleotide und dem Anstieg der Inosin bzw. Guanosinmenge festgestellt werden - daraus kann man schließen, dass die Elaeozyten die Nukleotide zu den entsprechenden Nukleosiden abgebaut haben (Hoeger et al, 1996). Auch die für den Abbau von Nukleotiden zu Nukleosiden benötigten Nukleotidasen konnten in den Elaeozyten nachgewiesen werden (Märker, pers. Mitt.). Wie solche Abbau-Prozesse in der Zelle reguliert werden, ist bisher allerdings kaum verstanden. Ein Abbau von Adeninnukleotiden zu den typischen Endprodukten des Nukleotidstoffwechsels (Hypoxanthin, Xanthin und Harnsäure) konnte dagegen in *Nereis*-Elaeozyten nicht nachgewiesen werden (Hoeger et al, 1996).

Elaeozyten aus I-Tieren und aus Männchen synthetisieren verstärkt Inosin bzw. Guanosin; dies ergibt sich, wenn man den Quotienten aus der nach 3 Tagen in das Kulturmedium sezernierten Nukleosidmenge und der Nukleosidmenge in den Elaeozyten zu Beginn der Kultur bildet. Nach all dem, was wir bis jetzt über den Nukleotidstoffwechsel der Elaeozyten wissen, ist diese „Neubildung“ wahrscheinlich überwiegend auf den Abbau des Adeninnukleotid-Vorrats und weniger auf *de novo* Synthese zurückzuführen. Eine *de novo* Synthese von Purinen konnte nämlich zumindest in Elaeozyten von I-Tieren und von mittelreifen Weibchen nicht oder nur in sehr geringem Ausmaß nachgewiesen werden (Märker, pers. Mitt.).

Da Elaeozyten ihren Vorrat an Adeninnukleotiden sehr wahrscheinlich zu Nukleosiden abbauen, kann man vermuten, dass die Unterschiede im Nukleosid-Sekretionsmuster der Elaeozyten männlicher und weiblicher Tiere möglicherweise auf ihren unterschiedlichen Gehalt an Adeninnukleotiden zurückzuführen sind: Elaeozyten weiblicher Tiere verlieren den Großteil ihres Vorrates an Adeninnukleotiden kurz nachdem die ersten Oozyten in der Cölomflüssigkeit auftauchen; dies könnte erklären, weshalb die *in vitro*-Sekretionsraten weiblicher Elaeozyten nur noch in frühen Stadien hoch und im weiteren Verlauf der Geschlechtsreifung durchweg gering sind. Elaeozyten männlicher Tiere behalten dagegen die hohen Konzentrationen an Adeninnukleotiden fast bis zum Ende der Gametogenese bei (Hoeger, et al, 1996) und sezernieren Nukleoside in mehr oder weniger unverändertem Ausmaß.

Es konnte also gezeigt werden, dass das Ausmaß mit dem Elaeozyten in Kultur Nukleoside sezernieren vom Geschlecht und vom Reifungsstadium der Tiere abhängig ist. Die Sekretion von Nukleosiden *in vitro* war allerdings bei Elaeozyten aus Tieren **aller Reifungsstadien** beiderlei Geschlechts nach wenigen Tagen zum Stillstand gekommen. Hierbei handelt es sich nicht, wie man vielleicht auch annehmen könnte, um eine Gleichgewichtseinstellung, da keine Abnehmer, dh zB Keimzellen, in Kultur vorhanden waren und auch kein Abbau sezernierter Nukleoside im Kulturmedium nachweisbar war. Worauf könnte das Erlöschen der Sekretion in Kultur zurückzuführen sein? Man nimmt an, dass die Sekretion wie die

Aufnahme von Nucleosiden durch erleichterte Diffusion vermittelt wird. Bei Myocyten sind Adenosinefflux wie Adenin-Aufnahme sättigbare Prozesse für die man K_m und V_{max} berechnen kann. Die Identität der Werte für K_m und V_{max} bei Efflux und Aufnahme deutet darauf hin, dass es sich um ein symmetrisches Transportsystem, wie etwa das der erleichterten Diffusion handelt (Conant, 1994; Plagemann et al, 1974). Für die Keimzellen von *Nereis virens* gibt es deutliche Hinweise, dass sie Nucleoside überwiegend durch erleichterte Diffusion transportieren (siehe **Kapitel 2.3 bzw. 3.3**). Ob dies auch für Elaeozyten zutrifft, kann noch nicht gesagt werden, weil die dafür nötigen Messungen noch fehlen. Es kann also nicht gesagt werden, ob die Netto-Sekretion von Nucleosiden durch Elaeozyten *in vitro* dann erlischt, wenn sich ein Konzentrationsgleichgewicht zwischen Cytosol und Medium eingestellt hat zumal die Möglichkeit besteht, dass Elaeozyten Nucleoside in ihrer Vakuole oder anderen Cytosol-Kompartimenten speichern können (Hoeger et al, 1992; Hoeger et al, 1995). Das Erlöschen der Nucleosidsekretion in Kultur könnte natürlich auch auf ein verringertes Nährstoffangebot im Medium und auf allgemeine Mangelbedingungen zurückzuführen sein.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass *Nereis*-Elaeozyten im Gegensatz zu den meisten phagozytotisch aktiven Zellen (Berlin et al, 1975; Plagemann et al, 1988), die zeitweise sehr großen intrazellulären Nucleotidgehalte erstaunlicherweise nicht zu typischen Endprodukten des Nucleotidstoffwechsels abbauen. Dagegen sezernieren sie Purinnucleoside *in vitro* und wohl auch *in vivo* in stadien- und geschlechtspezifischer Weise. Dies impliziert, dass die Elaeozyten von *Nereis virens* neben anderen Funktionen bei der Geschlechtsreifung auch noch die Bereitstellung von Nucleosiden für die sich differenzierenden Keimzellen übernehmen. Deshalb wurde überprüft, ob *Nereis*-Keimzellen Nucleoside aufnehmen (siehe **Kapitel 2.2**) und, ob sie diese verstoffwechseln können (siehe **Kapitel 2.4**).

3.2 Aufnahme von Nucleosiden durch Keimzellen von *Nereis virens*

Im **Kapitel 2.1** konnte gezeigt werden, dass kultivierte Elaeozyten von *Nereis virens* Inosin, Guanosin, sowie deren Desoxynucleoside in das Medium abgeben. Dieselben Nucleoside treten auch in der Cölomflüssigkeit, also dem natürlichen Medium der Gametozyten auf, und zwar in Abhängigkeit vom **Geschlecht** bzw. vom **Reifungsstadium** der Tiere. Da bekanntermaßen viele Zellen exogene Nucleoside z.B. für die RNA- und DNA-Synthese nutzen war es naheliegend zu untersuchen, ob auch die *Nereis*-Keimzellen Nucleoside aufnehmen. Unter dem Begriff Keimzellen verstehen wir nur diejenigen Zellen, die einen Keim bilden können, im Folgenden werden aber auch die Stadien, die letztendlich zur Bildung der Keimzellen führen, als solche bezeichnet.

Für die Untersuchung der Nucleosidaufnahme ist es von großem Vorteil, dass die frei im Cölom flottierenden *Nereis*-Keimzellen beiderlei Geschlechts leicht zu isolieren und mit gutem Erfolg über einen Zeitraum von mehreren Tagen oder sogar Wochen in Kultur zu halten sind (zur Kultur von *Nereis*-Oozyten siehe auch Heacox et al, 1983). Vor allem bei männlichen Keimzellen höherer Tiere (Amphibien und Säugern) wird das Studium der Nucleosidaufnahme dagegen dadurch erschwert, dass die Keimzellen nicht immer leicht von den somatischen Zellen zu trennen sind. Hinzu kommt, dass die so isolierten Keimzellen höherer Tiere *in vitro* oft nicht lange überleben. Die Keimzellen mariner Anneliden stellen damit ein geradezu

ideales System dar, um Transportvorgänge vom Soma, dh in diesem Fall den Elaeozyten, zu den Keimzellen *in vitro* zu untersuchen.

Nereis-Keimzellen beiderlei Geschlechts wurden dazu je nach Reifungsstadium zwischen 1 und 8 h im physiologischen Konzentrationsbereich von 1-500 μM mit ^{14}C -Inosin und ^{14}C -Guanosin inkubiert. Dabei hat sich gezeigt, dass Keimzellen beiderlei Geschlechts Inosin bzw. Guanosin aufnehmen; die Aufnahmeraten von Guanosin lagen dabei in allen Reifungsstadien deutlich unter denen von Inosin. Dies korreliert mit der Beobachtung, dass die Guanosinkonzentrationen in den Keimzellen ebenfalls durchweg viel geringer sind als die Inosinkonzentrationen (siehe **Tabelle 7**). An dieser Stelle darf nicht unerwähnt bleiben, dass spezifische Untersuchungen zum Nucleosidtransport (siehe **Kapitel 2.3**) außerdem gezeigt haben, dass bei den männlichen Keimzellen (Spermatogonien II) eine ganz erhebliche **Rückdiffusion** aufgenommener Nucleoside in das Medium stattfindet. Bei Oozyten war dagegen nur eine sehr geringe Rückdiffusion zu beobachten. Bei den Daten zur Nucleosidaufnahme durch *Nereis*-Keimzellen handelt es sich demnach immer um die **Nettosumme aus Ein- und Ausstrom**.

Die Inkubation von *Nereis*-Keimzellen beiderlei Geschlechts in Abhängigkeit von der Zeit hat gezeigt, dass die Konzentration aufgenommenen Inosins- bzw. Guanosins bereits nach 1-2 h der Angebotskonzentration im Medium entsprach. Dennoch nahmen die Keimzellen der meisten Stadien Inosin bzw. Guanosin weit über diesen Zeitraum hinaus auf: Bei einem Angebot von 100 $\mu\text{Mol/l}$ dieser Nucleoside war die Aufnahme für alle untersuchten Reifungsstadien und Geschlechter über mindestens 4 h linear. Das heißt, dass die Keimzellen Nucleoside akkumuliert haben. Traut (1994) hat Konzentrationen von Nucleosiden im Plasma bzw. im Serum mit intrazellulären Nucleosidkonzentrationen bei einer Vielzahl von Säugerzellen miteinander verglichen und daraus geschlossen, dass die meisten Säugerzellen Nucleoside anreichern können. Dabei hat sich auch gezeigt, dass einige Nucleoside, wie das Inosin, offensichtlich besonders stark akkumuliert werden (bis zu 0,2 mM). Auch die zu den Inosin bzw. Guanosinkonzentrationen in den *Nereis*-Keimzellen vergleichsweise geringen Nucleosidkonzentrationen in der Cölomflüssigkeit von *Nereis virens* weisen deutlich darauf hin, dass *Nereis*-Keimzellen Inosin bzw. Guanosin akkumulieren (siehe **Tabelle 7**). Bei den Keimzellen von *Nereis virens* sind die Konzentrationen des Inosins bzw. Guanosins allerdings weit höher als bei den meisten Säugerzellen (Traut, 1994). Es fällt auf, dass männliche *Nereis*-Keimzellen im Vergleich zu den Oozyten Nucleoside weit weniger stark akkumulieren; dies steht möglicherweise mit den etwas höheren Nucleosidkonzentrationen in der Cölomflüssigkeit und/oder mit der, bei männlichen Keimzellen, stärkeren Rückdiffusion von Nucleosiden im Zusammenhang.

Substanz	extrazellulär Cölomflüssigkeit [µM]	intrazellulär Keimzelle [µM]
Oozyten		
Inosin	5 - 10 (20)*	1600 - 5000
Guanosin	1 - 20	300 - 1300
Männl. Keimzellen		
Inosin	10 - 100 (1000)*	110 - 2600
Guanosin	0,2 - 100	100 - 300

Tabelle 7: Vergleich extrazellulärer mit intrazellulären Nucleosidkonzentrationen im Verlauf der Keimzellreifung. Angabe der Nucleosidgehalte in den Oozyten nach Rebscher (pers. Mitt.). Messungen in der Cölomflüssigkeit siehe Geier und Hoeger, 1993. Bei den mit einem * markierten Konzentrationsangaben handelt es sich um Werte reifer Tiere.

Die Akkumulation von Nucleosiden könnte darauf hindeuten, dass die *Nereis*-Keimzellen über aktive Transportsysteme zur Aufnahme exogener Nucleoside verfügen. Die Untersuchungen zum Nucleosidtransport in **Kapitel 2.3** und **3.3** zeigen jedoch, dass Oozyten nicht und Spermatogonien wenn überhaupt, nur zu einem sehr geringen Anteil Nucleoside durch aktiven Transport aufnehmen. Plagemann et al (1974) haben gezeigt, dass eine Akkumulation von Nucleosiden aber auch in Abwesenheit aktiver Transportsysteme möglich, ist wenn die aufgenommenen Nucleoside sofort durch entsprechende Kinasen phosphoryliert werden. Phosphorylierte Nucleoside können die Zelle nicht mehr verlassen und werden somit angereichert. *Nereis*-Keimzellen reichern Nucleoside wohl nur zum geringen Teil durch Phosphorylierung an, da man in den Keimzellen vergleichsweise geringe Konzentrationen von Nucleotiden und hohe Konzentrationen freier Nucleoside findet. Da Oozyten im Gegensatz zu männlichen Keimzellen aufgenommenes Inosin jedoch erstaunlicherweise kaum mehr in das Medium abgeben (siehe **Kapitel 2.3.1**), müssen sie noch über einen anderen Mechanismus verfügen, der den Ausstrom dieser für die Zelle wahrscheinlich sehr kostbaren Nucleoside sehr effektiv verhindert. Eine Speicherung der Nucleoside in speziellen Kompartimenten der Oozyten ist dabei nicht auszuschließen, aber noch nicht untersucht. Bei diesen Kompartimenten kann es sich um membranbegrenzte Kompartimente, wie z.B um Mitochondrien handeln. Ziegler et al. (1990) konnten große Mengen von Purinnucleosiden und -nucleotiden in den Mitochondrien von Leberzellen der Ratte nachweisen. Sie postulierten, dass Mitochondrien ein Transportsystem für Inosin besitzen. Es gibt außerdem einige Beispiele in der Literatur, die für eine Kompartimentierung durch die vorläufige Bindung an intrazelluläre Komplexe in der Zelle sprechen; manche Autoren vermuten, dass von Zellen des Hamsterovars aufgenommenes Adenosin vorübergehend an eine intrazelluläre S-adenosyl-Homocysteinhydrolase gebunden sein könnte (Kessel et al, 1968; Wohlhueter und Plagemann, 1983). Bei den Keimzellen von *Nereis virens* ist die Konzentration freier Nucleoside, wie gezeigt, allerdings weit höher als bei den meisten Säugetierzellen; solch hohe intrazelluläre Konzentrationen freier Nucleoside lassen sich nur schwer durch die Bindung an irgendwelche intrazellulären Komplexe erklären.

Ein Vergleich des Aufnahmeverhaltens von *Nereis*-Keimzellen für die Nucleoside Inosin zeigt eine **Abhängigkeit vom Geschlecht und vom Reifungsstadium**. Oozyten nehmen im Mittel etwa viermal soviel Inosin und etwa zweieinhalbmal soviel Guanosin pro Gewichtseinheit auf wie männliche Keimzellen.

Bietet man Inosin- bzw. Guanosin bei **physiologischen Konzentrationen**, dh bei jeweils 20 µM an, und berechnet die Aufnahme pro Oozyte (Abbildung nicht gezeigt), so sieht man, dass mit

dem Eintritt der Oozyten in die **schnelle Wachstumsphase** und der damit verbundenen starken Volumenzunahme um das achtfache (Heil, 1995) auch die Aufnahme um das bis zu 20 fache (!) angestiegen war. Bei fast reifen Oozyten waren die Aufnahmeraten nicht mehr angestiegen. Eine solche positive Korrelation von Oozytendurchmesser und Aufnahme läßt vermuten, dass der Anstieg der Aufnahme ausschließlich an die Zunahme der Oozytenoberfläche gekoppelt ist. Die Zunahme der Oozytenoberfläche könnte den Anteil der Nukleoside die durch, **carrierunabhängige Aufnahme** dh durch **einfache Diffusion** in die Zelle gelangt sind erhöht haben. Meine Untersuchungen zum Nukleosidtransport bei *Nereis*-Oozyten zeigen aber, dass einfache Diffusion für die Nukleosidaufnahme durch Oozyten vor allem im physiologischen Konzentrationsbereich nur eine sehr untergeordnete Rolle spielt (siehe **Kapitel 2.3**). In der vorliegenden Arbeit konnte außerdem gezeigt werden, dass die Nukleosidaufnahme während der schnellen Wachstumsphase auch dann zunimmt, wenn man die Aufnahme auf eine **Einheits-Oberfläche** bezieht. Gegen Ende der schnellen Wachstumsphase und bei fast ausgewachsenen *Nereis*-Oozyten nimmt die Aufnahme pro Oberflächeneinheit schließlich wieder stark ab. Einen ähnlichen Verlauf der H³-Uridin-Aufnahme pro Oberflächeneinheit konnte Lee (1984) bei den Oozyten von *Schizobranchia insignis* zeigen. Er führt die Verringerung der Uridin-Aufnahme, auf starke morphologische Veränderungen der Oozytenmembran im Verlauf der Oogenese zurück. Die Befunde bei *Nereis virens* zeigen also, dass die Aufnahmerate von Nukleosiden bei Oozyten nicht an die Zunahme der Oozytenoberfläche gekoppelt und, dass die gesteigerte Aufnahme bei heranwachsenden Oozyten eher auf eine größere Zahl von Transport-Carriern in der Membran und/oder auf einen erhöhten Stoffwechsel der Oozyten zurückzuführen ist.

Wenn man die Nukleosidaufnahme im Verlauf der Oozytenreifung auf ein **Einheits-Oozytenvolumen** bezieht so findet man, im Gegensatz zur Projektion der Aufnahme auf eine Einheits-Oberfläche, über die letzten Monate der Entwicklung verteilt drei distinkte, unterschiedlich hohe Aufnahmemaxima für Inosin bzw. Guanosin: Zwei relativ niedrige Maxima bei ganz jungen und fast reifen Oozyten und ein großes Maximum der Aufnahme bei Oozyten in der schnellen Wachstumsphase. Der starke Anstieg der Aufnahme während der schnellen Wachstumsphase könnte auf einen erhöhten Nukleosid-Bedarf der Oozyten für die Synthese von Nukleinsäuren beruhen (siehe dazu auch das **Kapitel 3.4**). Auch bei einer Reihe von Säugerzellen vermutet man, dass die Aufnahme von Nukleosiden sehr wahrscheinlich von dem Ausmaß abhängt mit dem transportierten Substanzen in der Zelle metabolisiert werden. Vergleichende Untersuchungen zur Nukleosidaufnahme im Verlauf des Keimzellwachstums gibt es meines Wissens nicht. Bei einigen anderen Zellen wie bei Retikulozyten vom Schaf und vom Schwein konnte aber z.B. gezeigt werden, dass sich die Transportraten für Nukleoside im Verlauf ihrer Differenzierung zu Erythrozyten ebenfalls verändert (Plagemann et al, 1988).

Dem Anstieg der Nukleosidaufnahme durch schnell wachsende Oozyten geht, wie *in vitro* gezeigt werden konnte, eine Phase verstärkter Nukleosidsekretion durch Elaeozyten voran (siehe **Kapitel .2.1**). Es ist zu vermuten, dass Elaeozyten auch *in vivo* bereits ausreichende Mengen von Nukleosiden in der Cölomflüssigkeit bereitstellen bevor die Oozyten einen erhöhten Bedarf entwickeln.

Bei den Männchen nahmen vor allem die mitotisch noch sehr aktiven Spermatogonienstadien größere Mengen von Inosin bzw. Guanosin auf; so dass man ebenfalls einen Zusammenhang von Nukleosidaufnahme und Nukleinsäuresynthese vermuten kann. Beim Übergang vom Spg I zum Spg II Stadium kommt es zu einem starken Anstieg der Zellzahl. Späte Spermatogonien bzw. Spermatozytenballen kurz vor dem Eintritt in die Meiose verringerten vor allem die Aufnahme von Inosin bei einem Angebot von 100 µM um etwa das 15-fache gegenüber den

mitotisch noch aktiven Stadien. Erstaunlicherweise nahmen aber auch die frühen Spermien vom Januar wieder vermehrt Nucleoside auf.

In der **Tabelle 8** werden die V_{\max} -Werte der Inosin- bzw. Guanosinaufnahme bei Keimzellen von *Nereis virens* mit V_{\max} -Werten anderer Zellen verglichen. Die V_{\max} -Werte für Inosin von Säugerzellen liegen fast immer um ein Vielfaches über denen von *Nereis*-Keimzellen, was sicherlich nicht zuletzt auch damit zusammenhängt, dass die Nucleosidaufnahme durch Säugerzellen meistens bei einer höheren Temperatur gemessen wurde. Die meisten Zellen nehmen Nucleoside vorwiegend durch carriervermittelten Transport auf (siehe auch **Kapitel 3.4**). Bei einer Aufnahme, die im wesentlichen carriervermittelt ist, hängt die Aufnahmerate nicht zuletzt sehr stark von der Temperatur ab, bei der die Aufnahme gemessen wird (Plagemann und Erbe, 1972); deshalb sind in der **Tabelle 8** jeweils auch die Temperaturwerte angegeben. Nur die Inosinaufnahmeraten schnell wachsender Oozyten reichen an die Aufnahmeraten einiger Einzeller heran bzw. übertreffen diese sogar. *Nereis*-Keimzellen nehmen Guanin mit höherer Rate auf als alle in der Tabelle aufgeführten Zellen. Im **Kapitel 3.4** wurden auch die K_m -Werte der Nucleosidaufnahme verschiedener Zellen mit denen von *Nereis*-Keimzellen miteinander verglichen.

Untersucht man die Nucleosidaufnahme bei unterschiedlichen Angebotskonzentrationen so findet man auch, dass sich nicht nur die absolute Menge an aufgenommenen Nucleosiden, sondern auch die **Aufnahmecharakteristik** im Verlauf der Geschlechtsreifung bei Keimzellen beiderlei Geschlechts drastisch ändert: Bei Oozyten war die konzentrationsabhängige Aufnahme dieser Nucleoside in den meisten Fällen sättigbar und entsprach einer Michaelis-Menten Kinetik; dies weist darauf hin, dass es sich um eine carriervermittelte Aufnahme handelt. In einigen Fällen zeigten vor allem männliche Keimzellen eine biphasische Nucleosid-Aufnahme die aus einem sättigbaren und einem linearen Anteil zusammengesetzt war. In anderen Fällen war die Aufnahme bei allen untersuchten Konzentrationen linear proportional zum Angebot.

Nucleosid	V _{max} [μmol/g x 1h]	V _{max} [nmol/mg Protein x 1h]	Temp [C°]	Zellart	Referenz
Inosin	0.05 - 2.6	2 - 100	12	<i>Nereis</i> -Oozyten	Plagemann, 1971 Plagemann et al, 1981 Jarvis et al, 1980 Foret et al, 1982 Pickard, 1980 dto dto
	0.02 - 0.71	1.6 - 2	12	<i>Nereis</i> -Spg-Stadien	
			37	Hepatoma-Zellen	
	22		25	Hepatoma-Zellen; S49 Lymphoma Zellen	
	58		25	Erythrozyten (Schwein)	
	72		25	MB22 (Marines Bakterium)	
		90	22	<i>Micrococcus sodonenis</i> *	
		21 9,6	11 37	dto * bei 100 μM <i>Plasmodium berghei</i>	
Guanosin	0.06 - 0.14	2.3 - 5.4	12	<i>Nereis</i> -Oozyten	Geisbuhler et al, 1987 Wu et al, 1994 Page et al, 1975 Patil, 1997 Hammond, 1992 Foret et al, 1982 Williams et al, 1991 Williams et al, 1991 Scholtisek, 1968
	0.025 - 0.17	1 - 1.3	12	<i>Nereis</i> -Spg-Stadien	
	13		37 ?	Myocyten (Ratte)	
	18		37	Gehirnzellen (Kaninchen)**	
	20		37	<i>Hymenolepis diminuta</i>	
	23		37	Darm-Epithelzellen (Ratte)	
	33		22	Ehrlich Tumorzellen	
	78		25	MB 22 (Marines Bakterium)	
		90	22	Nierenepithelzellen ** (Rind)	
		30	22 ?	Nierenepithelzellen (Ratte) **	
		17	37	Fibroblasten (Huhn)	

Tabelle 8: Vergleich der V_{max}-Werte unterschiedlicher Zelltypen. Bei den männlichen Keimzellen von *Nereis virens* war es nicht für jedes Reifungsstadium möglich einen V_{max}-Wert zu ermitteln. Die mit * markierten Zellen nehmen Nucleoside nur durch einfache Diffusion auf, deshalb wurde die Aufnahmerate angegeben, die man bei einem Nucleosidangebot von 100 bzw. 300 μM finden kann; diese Konzentration entspricht näherungsweise der Angebotskonzentration bei der *Nereis*-Keimzellen Nucleoside mit maximaler Aufnahmegeschwindigkeit aufnehmen. Die mit ** markierten Zellen besitzen ein Na⁺-abhängiges Aufnahmesystem.

Die K_m-Werte für die Aufnahme von Inosin durch Oozyten bewegten sich bis zum Ende der schnellen Wachstumsphase in einem relativ engen Bereich von 50 - 100 μM. Dies deutet

darauf hin, dass sich das verantwortliche Transportsystem bis dahin nicht wesentlich verändert hat. Die K_m -Werte für die Aufnahme von Guanosin durch Oozyten streuten zwar bis zum Ende der schnellen Wachstumsphase mit 20 - 200 μM etwas stärker, dennoch kann man vermuten, dass auch das Transportsystem für Guanosin gleichgeblieben ist. Erst bei den fast ausgewachsenen Oozyten wurden auch deutlich höhere K_m -Werte gemessen, weshalb man vermuten kann, dass sich die Natur des Transportsystems bei Oozyten vor allem gegen Ende ihrer Reifung verändert hat. In **Kapitel 2.3.3** wird durch die Anwendung von Transportinhibitoren tatsächlich gezeigt, dass fast ausgewachsene Oozyten ihr Fähigkeit Nucleoside durch carrierabhängigen Transport aufzunehmen fast gänzlich verloren haben.

Bei unterschiedlichen Stadien männlicher Keimzellen war die Aufnahmecharakteristik sehr viel variabler als bei den Oozyten, für manche Spermatogenesestadien konnten deshalb überhaupt keine K_m -Werte mehr bestimmt werden. Dies deutet darauf hin, dass sich die Eigenschaften des Transportsystems männlicher Keimzellen, nicht erst gegen Ende, sondern bereits im Verlauf der Spermatogenese mehrmals drastisch verändern.

Das Angebot von Inosin bzw. Guanosin in der **Cöloflüssigkeit** weiblicher Tiere vermochte das Niveau der Halbsättigung des jeweiligen Aufnahmesystems in keinem Fall zu erreichen. Dies bedeutet, dass die Versorgung der Oozyten mit Inosin bzw. Guanosin immer unterhalb der maximalen Aufnahmekapazität lag; man kann vermuten, dass das Aufnahmesystem sehr empfindlich auf Veränderungen der Nucleosidkonzentration in der Cöloflüssigkeit reagiert. Das Nucleosidangebot im Medium könnte demnach einen limitierenden Faktor vor allem in der Phase des schnellen Wachstums darstellen, wobei nicht ausgeschlossen werden kann das die Oozyten einen zusätzlichen Bedarf an Nucleosiden auch durch *de novo* Synthese abdecken. Für das Alaninaufnahmesystem der *Nereis*-Oozyten konnte ebenfalls gefunden werden, dass es während der schnellen Wachstumsphase nicht durch die Alaninkonzentrationen in der Cöloflüssigkeit gesättigt wird (Mahlein, 1993).

Während der Spermatogenese steigen die Inosinkonzentrationen in der Cöloflüssigkeit stark an und erreichen oder übersteigen ab dem späten Spermatogonien II-Stadium oft die zur Halbsättigung des Inosinaufnahmesystems erforderlichen Konzentrationen. Die Guanosinkonzentrationen in der Cöloflüssigkeit männlicher Tiere stiegen im Verlauf der Keimzellentwicklung zwar ebenfalls an, konnten die Halbsättigung des entsprechenden Aufnahmesystems allerdings nie erreichen. Die Tatsache, dass die Nucleosidaufnahmesysteme mancher Keimzellstadien durch das Angebot an Nucleosiden in der Cöloflüssigkeit nicht oder unzureichend abgesättigt werden gibt keinen eindeutigen Hinweis darauf, ob das Oozytenwachstums durch das Angebot an exogenen Nucleosiden gesteuert werden kann.

Man weiß, dass eine ganze Reihe exogener Faktoren wie Tageslänge, Mondphasen und Temperatur die Geschlechtsreifung von *Nereis virens* zu steuern vermögen. Möglicherweise wird auch das Wachstum der *Nereis*-Keimzellen durch das Zusammenspiel vieler verschiedener endogener Parameter gesteuert. Es ist bekannt, dass die Geschlechtsreifung der Nereiden durch endokrine Signale kontrolliert wird (Hauenschild, 1966; Porchet, 1984); ob die Hormone einen Einfluß auf die Fähigkeit der Elaeozyten zur Nucleosidsekretion oder auf die Aufnahme von Nucleosiden durch Keimzellen haben wurde bislang allerdings nicht untersucht. Sowohl bei Oozyten als auch bei Elaeozyten von *Nereis diversicolor* scheinen Hirnhormone die Synthese von Lipiden zu stimulieren und die Abgabe von Triglyceriden durch Elaeozyten anzuregen (Dhainaut und Taki, 1988).

Es konnte somit gezeigt werden, dass nicht nur die Sekretion von Nucleosiden durch die Elaeozyten, sondern auch die Aufnahmebereitschaft der Keimzellen für exogene Nucleoside eng mit dem Reifungsstadium der Tiere zusammenhängt. Die Daten sprechen dafür, dass das

Nucleosidangebot in der Cöloflüssigkeit zumindest bei weiblichen Tieren einen limitierenden Einfluß auf das Oozytenwachstum hat. Dies bedeutet nicht notwendigerweise, dass die Zellen auf die Aufnahme exogener Nucleoside angewiesen sind, da eine Vielzahl von Zellen Nucleoside aufnehmen können (Berlin und Oliver, 1975). Die Rolle exogener Nucleoside für den Purinstoffwechsel der *Nereis*-Keimzellen wurde im **Kapitel 3.4** näher untersucht.

All living cells are faced by two problems which are clearly antagonistic: They must retain their integrity, constraining their component molecules within a definite space, but, on the other hand, require a continuous or periodic interchange of numerous substances with their surroundings.

Hans H. Ussing

3.3 Nukleosidtransportsysteme bei Keimzellen von *Nereis virens*

Dass bestimmte Zellen Nukleoside aufzunehmen können, zeigte bereits im Jahr 1960 Whittam bei Erythrozyten des Menschen. Zwei Jahre später wurde erstmals nachgewiesen, dass Säuger-Erythrozyten Purinnukleoside auf zwei verschiedenen Wegen transportieren können. Der eine Transportweg erreicht bei niedrigem Substratangebot eine Sättigung und lässt sich mit Hilfe der Michaelis-Menten Kinetik charakterisieren, weshalb man vermutet hat, dass es sich dabei um erleichterte Diffusion handelt. Bei hohen Angebotskonzentrationen ist die Aufnahme dagegen nicht sättigbar; für diese nicht-sättigbare Aufnahme machte man schon damals einfache Diffusion verantwortlich. (Lassen und Overgaard, 1962). Seither wurde der Transport von Nukleosiden bei Säugerzellen und bei Bakterien vielfach untersucht.

Bei Invertebraten gibt es dagegen vergleichsweise wenig Untersuchungen über den Transport von Nukleosiden. 1965 gelang es McInnis et al., ein Carrier-vermitteltes Transportsystem für Purin- und Pyrimidinnukleoside auch bei einem Invertebraten nachzuweisen; bei dem Cestoden *Hymenolepis diminuta* werden Nukleoside ebenfalls durch sättigbaren und nicht-sättigbaren Transport aufgenommen (MacInnis, 1965). Eier des Seeigels *Strongylocentrotus* nehmen Nukleoside dagegen nur über ein Na⁺-abhängiges System auf, das aber erst durch die Besamung aktiviert werden muss (Schneider und Whitten, 1987).

Zwar gibt es zahlreiche autoradiographische Untersuchungen über das Schicksal aufgenommener Nukleoside in Oozyten verschiedener Polychaetenarten, so z.B. bei *Pectinaria* (Tweedell, 1966), *Nereis grubei* (Gould und Schroeder, 1969) sowie bei *Nereis diversicolor* und *Nereis pelagica* (D.h.ainaut, 1984). Dabei handelt es sich aber vornehmlich um Inkubationen mit radioaktiv markiertem Uridin und Thymidin. Eingehendere Untersuchungen zur Aufnahme von Nukleosiden durch Oozyten eines Polychaeten findet man z.B. bei Lee et al (1984). Er hat die Aufnahme von ³H-Uridin durch Oozyten von *Schizobranchia insignis* in Abhängigkeit vom Oozytendurchmesser untersucht. Die von anderen Autoren verwendeten Nukleoside Uridin und Thymidin sind allerdings in der Cöloflüssigkeit des von mir untersuchten Anneliden *Nereis virens* nicht nachweisbar, und für die oben angeführten anderen Polychaeten-Arten scheinen die natürlicherweise verfügbaren Nukleoside nicht untersucht worden zu sein. **Untersuchungen zur Aufnahmekinetik physiologisch relevanter Nukleoside sind somit meines Wissens an Keimzellen von Polychaeten noch nie angestellt worden.**

Für das Verständnis der nachfolgenden Ausführungen ist es wichtig, die Begriffe Transport, und Aufnahme klar zu definieren. Transport umfasst nur die Ereignisse, die notwendig sind damit ein Substrat die Zellmembran passieren kann. Transport besteht demnach aus drei Schritten: Bindung des Substrates, Transfer des Substrates durch die Membran und die Freigabe des Substrates in das Zellinnere. Die sich daran anschließende Anreicherung des chemisch unveränderten Substrats sowie seiner Metabolite in der Zelle wird als Aufnahme bezeichnet. Nukleoside können nach ihrer Aufnahme von den meisten Zellen sofort

phosphoryliert werden. Dabei ist festzuhalten, dass bei den meisten Zellen (mit Ausnahme der Bakterien) die Phosphorylierung getrennt vom Transport erfolgt.

Im Folgenden soll einführend besprochen werden, welche unterschiedlichen Transportmechanismen es gibt und welche Kenntnis man über das Vorkommen dieser Mechanismen hat. Danach wird, anhand meiner Experimente mit Transportinhibitoren, diskutiert über welche Transportmechanismen die Keimzellen von *Nereis virens* verfügen.

Die Lipid-Doppelmembran von Zellen ist aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften normalerweise nur für kleine, ungeladene Moleküle permeabel. Vor allem bei hohen Substratkonzentrationen können viele Substanzen aber dennoch auch durch einfache Diffusion in die Zellen gelangen (Hauschka, 1973; Pickard 1980). Doch scheint die einfache Diffusion für die meisten Zellen keine physiologisch bedeutsame Rolle zu spielen (Plagemann und Erbe, 1972). Erst spezielle Carrierproteine ermöglichen den effektiven Transport größerer und vor allem hydrophiler Moleküle (z.B. Nukleoside) auch und gerade bei sehr geringem Substratangebot. Die erleichterte Diffusion stellt einen solchen passiven, durch Carrier vermittelten Einstrom von Substanzen in die Zellen dar. Der Begriff der erleichterten Diffusion wurde 1954 das erste Mal von Danielli geprägt und hat seine Gültigkeit bis heute nicht verloren. Die Bindung eines Substrats an einen Transportcarrier und seine Ablösung gleicht den Vorgängen die zur Bindung und zur Ablösung eines Substrats von einem Enzym führen und kann deshalb ebenfalls durch die Michaelis-Menten-Gleichung beschrieben werden (Berlin und Oliver, 1975; Bisswanger, 1994). Ein Einstrom ist nur solange zu beobachten, bis sich ein Gleichgewicht zwischen den Substratkonzentrationen außerhalb und innerhalb der Zelle eingestellt hat. Ist das Gleichgewicht erreicht, so kann es auch wieder zu einem Ausstrom des Substrats aus der Zelle durch denselben Carrier kommen (bidirektionaler Carrier). Der erleichterten Diffusion von Nukleosiden kann eine intrazelluläre Phosphorylierung der aufgenommenen Nukleoside nachgeschaltet sein; dadurch werden die Nukleoside am Verlassen der Zelle gehindert und Nukleosidmetabolite werden, wie bei einem aktiven Transportsystem, gegenüber dem Außenmedium angereichert (Plagemann et al, 1988).

Neben der erleichterten und der einfachen Diffusion, die beide einen passiven Transport darstellen, gibt es auch aktive Nukleosid-Transportsysteme. Hierzu zählt man zum einen den gekoppelten Transport und zum anderen die Gruppen-Translokation. Die Aufnahme von Zuckern bzw. Aminosäuren durch tierische Zellen wird typischerweise durch gekoppelte Transportsysteme bewerkstelligt. Bei einem solchen Co-Transport ermöglicht der gleichzeitige Einstrom (=Symport) einer zweiten Substanz, z.B. Na^+ , Ca^{2+} oder H^+ den Transport des eigentlichen Substrats in die Zelle auch entgegen eines Konzentrationsgradienten (Hauschka, 1973). Akkumulativer, Na^+ -abhängiger Nukleosidtransport konnte vor allem bei einigen spezialisierten Epithelzellen der Niere (Franco et al, 1990) und des Darmes (Huang et al, 1993), bei Zellen des Gehirns (Wu et al, 1994) sowie bei Makrophagen (Plagemann und Aran, 1990) nachgewiesen werden. Bei den Oozyten von *Nereis virens* konnte gezeigt werden, dass Einstrom von Aminosäuren bzw. Glukose ebenfalls Na^+ -gekoppelt ist (Mahlein, 1996; Rebscher, persönl. Mitteilung). Ein Einstrom über das Gleichgewicht hinaus ist auch möglich, wenn gleichzeitig ein zweites Substrat über denselben Carrier nach außen gelangt. Dieses Phänomen bezeichnet man als „Counterflow“ oder als Antiport (Berlin und Oliver, 1975; Alberts, 1989).

Aktiver Transport von Nukleosiden durch Gruppen-Translokation wurde zwar auch bei verschiedenen Säugerzellen so, z.B. bei Fibroblasten vermutet (Cohen et al, 1977), ein sicherer Nachweis der Gruppen-Translokation war meines Wissens bisher nur bei *E.coli* und einigen

anderen Einzellern möglich. Bei *E.coli* wird Adenosin durch eine membrangebundene Phosphorylase gespalten; die freie Base wird anschließend durch die Membran transportiert und im Inneren der Zelle mit Hilfe einer Phosphoribosyltransferase zu AMP umgebaut (Hochstadt, 1972). Gruppen-Translokation wurde auch für die Aufnahme von Nukleosiden durch *Plasmodium berghei* postuliert (Hansen, 1980). Einen Überblick über die Eigenschaften der einzelnen Nukleosid-**Transportsysteme** gibt die **Tabelle 9**.

Prozess	Energie-abhängig ?	Carrier-vermittelt ?	Akkumulation ?	Sättigbar ?	Metaboli-sierung des Substrats ?
Passiv :					
Einfache Diffusion	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein
Erleichterte Diffusion (vier Subtypen)	Nein	Ja	Nein	Ja	Nein
Aktiv :					
Ionen-Gekoppelter Transport (Na ⁺ -abhängige Subtypen N1 - N4)	Ja	Ja	Ja	Ja	Nein
Gruppentranslokation	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja

Tabelle 9: Nukleosid-Transportsysteme in der Membran tierischer Zellen (verändert nach Hauschka, 1973)

3.3.1 Aufnahme von Nukleosiden durch Keimzellen von *Nereis virens*

Die Inkubationsversuche an mittelgroßen Oozyten bzw. an Spg II zeigten, dass diese Zellen *in vitro* Inosin bzw. Guanosin aufnehmen können. Bei steigender Angebotskonzentration dieser Nukleoside zeigen die Aufnahmeverläufe eine Sättigung, allerdings in manchen Fällen vermischt mit einer nicht-sättigbaren Aufnahmekomponente. Eine sättigbare Aufnahme die durch eine Michaelis-Menten Kinetik beschrieben werden kann, lässt, wie bereits erwähnt, immer auf eine carrier- bzw. rezeptorvermittelte Aufnahme schließen. Dementsprechend ließen sich für die Aufnahme von Inosin und Guanosin apparente Werte für V_{max} und K_m bestimmen.

Inkubationen über einen längeren Zeitraum (>6h) hatten gezeigt, dass Keimzellen beiderlei Geschlechts Inosin und Guanosin gegenüber dem Medium anreichern konnten (siehe hierzu auch **Kapitel 2.2.2 und 2.2.7**). Mit anderen Worten: die intrazelluläre Nukleosid-Konzentration überstieg die extrazelluläre Angebotskonzentration nach 6 h wenigstens um das anderthalb, bis dreifache.

Fast reife Oozyten akkumulierten nach 6 h in Kultur ebenfalls etwa das zwei bis dreifache und Spermien sogar mehr als das dreißigfache der im Medium angebotenen Inosinkonzentration. Die Aufnahme von Guanosin durch reife Oozyten bzw. Spermien war dagegen nur sehr bedingt akkumulativ. Die Ursache für die Akkumulation von Nukleosiden könnte ein aktives,

ionengetriebenes Transportsystem sein. Aber auch wenn Nukleoside durch erleichterte Diffusion in die Zelle gelangen kann es zur Akkumulation von Nukleosidmetaboliten in der Zelle kommen, wenn die Nukleoside unmittelbar nach ihrer Aufnahme phosphoryliert werden. Dieser für die Aufnahme von Nukleosiden oft beschriebene Vorgang wird von Plagemann et al (1974) als „Trapping“ beschrieben, da phosphorylierte Nukleoside die Zellmembran nicht mehr passieren können. Intrazelluläre Phosphorylierung von Nukleosiden kann also bei Vorliegen von erleichterter Diffusion einen aktiven Transport vortäuschen (Sandermann, 1983). Die Aufnahme von Nukleosiden gemäß einer normalen Michaelis-Menten Kinetik und der Anreicherungseffekt der Aufnahme reichen demnach nicht aus, um die Art des verantwortlichen Transportsystems zu definieren. Der Nukleosid-Transport wurde deshalb bei Keimzellen von *Nereis virens* unter Einsatz einer Reihe von Transport- bzw. Stoffwechsellinhibitoren untersucht, um die Art des Nukleosidtransportes zu charakterisieren.

3.3.2 Aufnahme von Nukleosiden durch Oozyten nach ATP-Verarmung

Viele Zellarten phosphorylieren Nukleoside sofort nach dem Eintritt in die Zellen mit Hilfe ATP-abhängiger Kinasen, dadurch werden freie Nukleoside beständig dem Gleichgewicht entzogen und der Transportprozess kann, bei einer gegebenen Substratkonzentration, mit maximaler Rate aufrechterhalten werden (Plagemann und Richey, 1974). Man hat diese Art der Aufnahme deshalb auch als „kinaseabhängige Anreicherung“ bezeichnet. Bei anderen Zellen liegt der Aufnahme von Nukleosiden ein aktives, d.h. meist Na⁺-getriebenes System zugrunde. Falls Keimzellen von *Nereis virens* Nukleoside mittels ATP-abhängiger Kinasen anreichern und/oder über einen aktiven, ATP-abhängigen Transport von Nukleosiden verfügen, dann sollte die Aufnahme in jedem Fall durch eine Verringerung des intrazellulären ATP-Gehaltes hemmbar sein. Den ATP-Gehalt kann man senken indem man Zellen mit spezifischen Inhibitoren des Energiestoffwechsels, wie z.B. mit KCN, Jodacetat oder Jodacetamid behandelt (Plagemann und Woffendin, 1988).

Ein Gemisch aus je 5 mM KCN, einem Inhibitor der Atmungskette, und Jodacetat (JAC), einem Inhibitor der Glykolyse, im glukosefreiem Medium hatte keinen deutlichen Einfluß auf den ATP-Gehalt der Oozyten und konnte die Inosin- bzw. Guanosinaufnahme bei Oozyten nicht hemmen, sondern führte sogar zu einer gesteigerten Aufnahme. Dieser Befund deckt sich, zumindest was das KCN betrifft, mit den Ergebnissen von Rabien (1990) im Rahmen seiner Dissertation über die Aufnahme von *Nereis*-Vitellin durch Oozyten. Die Aufnahme von *Nereis*-Vitellin durch Oozyten war seinen Angaben zu Folge erst ab einer KCN-Konzentration von über 100 mM, also dem 20-fachen der von mir verwendeten Konzentration deutlich hemmbar. JAC war ebenfalls erst ab einer viel höheren Konzentrationen als der von mir verwendeten wirksam (Rabien, 1990). Auch bei Hepatoma Zellen wurde die Aufnahme von Uridin erst ab einer JAC-Konzentration von 20 mM gehemmt (Plagemann, 1970).

Da das Gemisch aus KCN und JAC die Aufnahme von Inosin bzw. Guanosin nicht hemmt, wurden die Oozyten nachfolgend mit Jodacetamid (JAA) in glukosefreiem Medium vorinkubiert. Für die Aufnahme von Dotterprotein konnte nämlich gezeigt werden, dass sich die Einbaurrate für Vitellin in Oozyten von *Nereis virens* in Gegenwart von nur 0,5 mM JAA um 63 % reduzieren lässt (Rabien, 1990). Die Anwendung von 1 und 5 mM JAA, einem anderen spezifischen Inhibitor der Glykolyse, hatte den ATP-Gehalt der *Nereis*-Oozyten tatsächlich sehr wirkungsvoll reduziert. Die Befunde sprechen dafür, dass die Oozyten von *Nereis virens* ATP überwiegend durch Glykolyse und weniger über die Atmungskette synthetisieren. Die

Erhöhung der JAA-Konzentration im Medium hatte außerdem eine zunehmende Hemmung der Inosin- bzw. Guanosinaufnahme durch *Nereis*-Oozyten zur Folge. Nach Vorinkubation mit 5 mM JAA verblieb eine überwiegend linear-proportionale Abhängigkeit der Aufnahme vom Inosin- bzw. Guanosinangebot; damit konnte ein sättigbarer, ATP-abhängiger Anteil der Aufnahme von einem nicht-sättigbaren Anteil unterschieden werden. Dieser Befund zeigt deutlich, dass Oozyten von *Nereis virens* über mindestens zwei verschiedene Wege zur Aufnahme von Inosin- bzw. Guanosin verfügen müssen; eine ATP-abhängige und gleichzeitig sättigbare, d.h. carriervermittelte Aufnahme und eine nicht-sättigbare Aufnahme welche hauptsächlich im Bereich hoher Konzentrationen wirksam ist. Den Anteil der sättigbaren, ATP-abhängigen Aufnahme erhielt man indem man den Betrag der nicht-sättigbaren Aufnahme von der Kennlinie der Kontrollwerte abzog; somit konnte der prozentuale Anteil der ATP-abhängigen Aufnahme von Inosin bzw. Guanosin an der Gesamtaufnahme ermittelt werden (siehe **Abb. 63**). Die **Abb. 63** (linkes Diagramm) zeigt, dass Inosin im physiologischen Konzentrationsbereich (grau unterlegter Bereich) ganz überwiegend, und zwar zu über 92 %, durch ATP-abhängige, sättigbare Aufnahme in die Oozyten gelangte. Weniger als 8 % des Inosins gelangten demnach durch nicht-sättigbare Aufnahme in die Oozyten mittelreifer Tiere. Guanosin wurde von den Oozyten dagegen bei physiologischen Konzentrationen nur zu etwas mehr als 50 % auf ATP-abhängige Weise aufgenommen; der nicht unerhebliche Rest gelangte erstaunlicherweise durch nicht-sättigbare Aufnahme in die Zellen.

Durch die Inkubation mit JAA konnte gezeigt werden, dass es bei Keimzellen von *Nereis virens* neben der sättigbaren Aufnahme von Nukleosiden eine ATP-unabhängige Aufnahme gibt, die proportional zum Substratangebot ist; man geht davon aus, dass es sich bei einer solchen Kinetik um einfache Diffusion handelt (Plagemann und Richey, 1974).

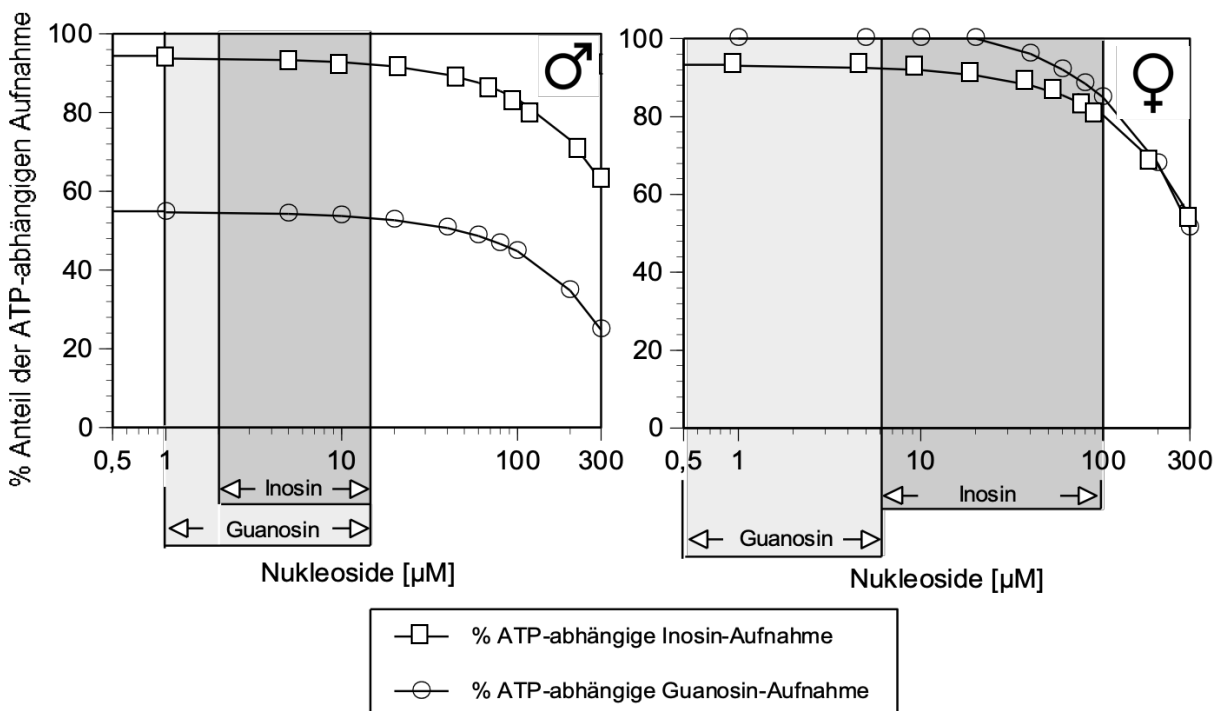


Abb. 63: Prozentualer Anteil der ATP-abhängigen Aufnahme von Inosin und Guanosen bei weiblichen und männlichen Keimzellen. Die Aufnahme, die nicht ATP-abhängig ist wird durch nicht-sättigbare Aufnahme geleistet. Die grau unterlegten Felder in den Diagrammen geben jeweils den Konzentrationsbereich der Nukleoside in der Cöloflüssigkeit wieder.

Aufnahme durch einfache Diffusion wurde nicht nur für Nukleoside, sondern auch schon für Aminosäuren und Zucker beschrieben (Plagemann und Richey, 1974; Jacques, 1962; Winter, 1964). Man vermutet, dass einfache Diffusion keine physiologisch bedeutsame Rolle für die Versorgung von Zellen mit Nukleosiden spielt; allerdings ist zu bedenken, dass mit abnehmender Temperatur der Anteil der einfachen Diffusion an der Gesamtaufnahme zunimmt (Plagemann und Richey, 1974). *In vitro* bei 12 C° Inkubationstemperatur gelangten durch die ATP-unabhängige Aufnahme, im Bereich physiologischer Substratkonzentrationen, nur wenige Prozent an Inosin in mittelgroße Oozyten. Guanosin gelangte dagegen unter denselben Bedingungen in viel stärkerem Maße durch ATP-unabhängige Aufnahme in mittelgroße Oozyten. Oozyten von *Nereis virens* verfügen demnach über wenigstens zwei verschiedene Wege zur Aufnahme von Inosin- bzw. Guanosin. Der eine ist ATP-abhängig und wahrscheinlich carriervermittelt, während es sich bei dem anderen ATP-unabhängigen Weg möglicherweise um einfache Diffusion handelt. Dabei fällt auf, dass Guanosin im Gegensatz zu Inosin im viel stärkerem Maße auch auf dem ATP-unabhängigen Weg in die Oozyten gelangen kann.

3.3.3 Aufnahme von Nukleosiden durch männliche Keimzellen nach ATP-Verarmung

Spermatogonien nehmen die Nukleoside Inosin und Guanosin mit einer konzentrationsabhängigen Kinetik auf; diese zeigt in manchen Fällen einen deutlich biphasischen Verlauf. Die zeigte sich daran, dass die Aufnahme im Bereich niedriger Substratkonzentrationen einer Sättigungskinetik folgte, während sie meist ab einer Konzentration oberhalb von 100 µM Inosin bzw. Guanosin in eine nicht-sättigbare Aufnahme überging. Aufgrund dieser Kinetik war bereits im Vorfeld der Untersuchungen zu vermuten, dass auch Spermatogonien Nukleoside auf zwei verschiedenen Wegen aufnehmen können.

Der Versuch die Nukleosidaufnahme durch Vorinkubation mit JAC, einem Hemmstoff der Glykolyse, zu inhibieren schlug, wie auch schon bei den Oozyten, fehl. JAC bewirkte bei Oozyten eine leichte und bei Spermatogonien sogar eine deutliche Steigerung der Nukleosidaufnahme. Möglicherweise war JAC gar nicht in die Zellen, d.h. an seinen eigentlichen Wirkort, gelangt. Erst die Anwendung von 5 mM JAA verringerte auch bei Spermatogonien II den ATP-Gehalt wirkungsvoll. Nach 60' Vorinkubation mit 5 mM JAA verblieb eine überwiegend linear-proportionale Abhängigkeit der Inosin- bzw. Guanosinaufnahme vom Substratangebot; diese setzte im Fall der Guanosinaufnahme allerdings erst ab einer Substratkonzentration oberhalb von 100 µM Guanosin ein. Aufgrund dieser Befunde konnte auch bei Spermatogonien ein sättigbarer, ATP-abhängiger Anteil der Aufnahme von einem nicht-sättigbaren Anteil unterschieden werden. Diese Befunde zeigten, dass auch die Spermatogonien von *Nereis virens* über mindestens zwei verschiedene Wege zur Aufnahme von Inosin- bzw. Guanosin verfügen müssen: eine ATP-abhängige und gleichzeitig sättigbare, d.h. carriervermittelte Aufnahme und eine nicht sättigbare Aufnahme, welche hauptsächlich im oberen Konzentrationsbereich wirksam ist. Den Anteil der sättigbaren ATP-abhängigen Aufnahme erhielt man indem man den Betrag der nicht-sättigbaren Aufnahme von der Kennlinie der Kontrollwerte abzog. Dadurch war es auch bei Spermatogonien möglich den prozentualen Anteil der ATP-abhängigen Aufnahme von Inosin bzw. Guanosin an der Gesamtaufnahme zu berechnen (siehe **Abb. 63**; rechtes Diagramm). Im

physiologisch relevanten Konzentrationsbereich gelangte Inosin demnach zu über 80 % durch ATP-abhängige Aufnahme in die Spermatogonien; die restliche Aufnahme wurde durch nicht-sättigbare Aufnahme abgedeckt. Guanosin gelangte bei Spermatogonien im physiologischen Konzentrationsbereich dagegen ganz ausschließlich durch ATP-abhängige Aufnahme in die Zellen; die JAA-Behandlung zeigte nämlich, dass die nicht sättigbare Aufnahme erst ab einer Substratkonzentration von 100 μM , also außerhalb der physiologischen Konzentration, wirksam wurde.

3.3.4 Zusammenfassung der Befunde zur ATP-Verarmung der Keimzellen

Die Behandlung der *Nereis*-Keimzellen mit JAA hatte also folgende Befunde ergeben: Mittelgroße Oozyten und Spermatogonien II besitzen ein ATP-abhängiges, carriervermitteltes System zur Aufnahme von Nukleosiden, das vor allem im Bereich niedriger Substratkonzentrationen wirksam ist. Dieser Bereich entspricht den physiologischen Konzentrationen in der Cöloflüssigkeit (siehe auch **Abb. 63**). Bei dem Carrier könnte es sich um einen Transporter für erleichterte Diffusion handeln - die in den Keimzellen nachgewiesene Anreicherung von Nukleosiden könnte in einem solchen Fall durch ATP-abhängige Kinasen geleistet worden sein. Diese Kinasen können, laut den Angaben in der Literatur, aufgenommene Nukleoside sofort phosphorylieren und dadurch dem Gleichgewicht entziehen. Bei dem Carrier könnte es sich aber auch um ein aktives, Na^+ -abhängiges System handeln, das sowohl für den Transport als auch für die Anreicherung verantwortlich ist. Mit Hilfe der JAA-Inkubationen war es nicht möglich, das der ATP-abhängigen Aufnahme zugrundeliegende Transportsystem zu charakterisieren.

Werden Nukleoside überwiegend durch ein carriervermitteltes System aufgenommen, das mit hoher Affinität Nukleoside zu transportieren vermag, so ist eine effektive Versorgung von Zellen mit exogenen Nukleosiden sichergestellt (Foret et al, 1982). Ein carriervermitteltes Transportsystem kann wahrscheinlich auch leichter in die Regulationmechanismen der Zelle integriert werden, da die Transportaktivität eines Carriers durch eine große Zahl von physiologischen Parametern beeinflussbar ist (Berlin und Oliver, 1975). Über den genauen Mechanismus einer solchen Regulation gibt es allerdings bislang nur sehr wenig Untersuchungen. Die Transportkapazität eines Carriers kann an das Wachstum der Zelle gekoppelt sein; außerdem wurde bei Säugerzellen eine direkte Abhängigkeit des Transports vom cAMP-Gehalt der Zellen nachgewiesen (Berlin und Oliver, 1975). Neuere Untersuchungen legen nahe, dass die carriervermittelte Aufnahme von Adenosin bei granulären Neuronen durch G-Proteine moduliert wird (Sweeney, 1997). Hammond (1997) vermutet in diesem Zusammenhang, dass durch G-Protein aktivierte Proteinkinasen neben anderen Proteinen auch Nukleoside-Transportproteine phosphorylieren bzw. aktivieren. G-Proteine können in vielen Fällen durch hormonabhängige Rezeptoren der Zellmembran aktiviert werden (Knippers, 1995). Zurzeit weiß man aber nur sehr wenig über die Regulation von Nukleosidtransportsystemen durch Hormone; zumindest bei Hepatozyten ist bekannt, dass das der Nukleosidtransport durch Glucagon und Insulin kontrolliert wird (Mercader et al, 1996).

Die ATP-unabhängige Aufnahme hatte dagegen im Bereich physiologischer Substratkonzentrationen, für die Aufnahme von Nukleosiden durch Oozyten und Spermatogonien nur eine untergeordnete Bedeutung. Aufgrund der JAA-Versuche kann nicht

zweifelsfrei entschieden werden, ob es sich bei der ATP-unabhängigen Aufnahme um einfache Diffusion und/oder um einen Transporter mit geringer Affinität handelt. Es war aber erstaunlich, dass mittelgroße Oozyten, auch im Bereich physiologischer Substratkonzentrationen, Guanodin fast zur Hälfte auf diesem Weg aufnahmen. Wenn man annimmt, dass einfache Diffusion nicht auf speziellen, membranständigen Strukturen, sprich Carriern, zur Aufnahme von Nukleosiden beruht, dann ist es nur schwer vorstellbar, wie und wodurch solch einen Transport reguliert werden könnte.

Um herauszufinden welches Transportsystem der ATP-abhängigen Aufnahme von Nukleosiden bei den Keimzellen zugrunde liegt wurden weitere Versuche mit spezifischen Inhibitoren der erleichterten Diffusion und des aktiven Transports durchgeführt.

3.3.5 Nachweis der erleichterten Diffusion

Da alle Säugerzellen von wenigen Ausnahmen abgesehen, Nukleoside durch erleichterte Diffusion aufnehmen (Plagemann, 1991), war es naheliegend zu untersuchen, ob Keimzellen von *Nereis virens* Nukleoside durch ein solches System aufnehmen. Die Aufnahme von Inosin- bzw. Guanodin durch Oozyten und Spermatogonien war mit Nitrobenzylthioinosin (NBTI), einem spezifischen Inhibitor der erleichterten Diffusion nicht hemmbar. Nach den Angaben in der Literatur kann NBTI die Nukleosidaufnahme nur dann deutlich hemmen, wenn die Zellen an ihrer Oberfläche über Bindungsstellen mit hoher Affinität für dieses Nukleosidanalogen verfügen. Diese NBTI-Bindungsstellen, bei denen es sich um hydrophobe Gruppen handeln soll, sind wahrscheinlich Teil des Nukleosidtransporters (Plagemann, et al., 1988; Berlin und Oliver, 1975). Da die Aufnahme von Nukleosiden nicht durch NBTI beeinflusst werden kann, muss man davon ausgehen, dass die Transportproteine der Keimzellen von *Nereis virens* nicht oder nur in geringem Maße über hydrophobe Bindungsstellen zu verfügen. Dies ist aber durchaus nichts Ungewöhnliches; auch bei *Crithidia luciliae* (Trypanosomatidea) ist die erleichterte Diffusion von Nukleosiden nicht durch NBTI hemmbar (Hall et al, 1992). Bei verschiedenen Vertebratenzellen gibt es ebenfalls NBTI-resistente und NBTI-sensitive Nukleosidtransporter; die resistenten Subtypen werden als **ei-Transporter** und die sensitiven als **es-Transporter**, d.h. als „**equilibrative insensitive**“ bzw. „**sensitive**“ bezeichnet (Plagemann et al, 1988; Crawford et al, 1990; Hammond, 1997). Ein Nachweis der erleichterten Diffusion von Nukleosiden bei Keimzellen von *Nereis virens* war mit NBTI also nicht möglich.

Da NBTI keinen Einfluß auf die Aufnahme von Nukleosiden bei Keimzellen von *Nereis virens* hatte wurden die Zellen mit PCMB vorinkubiert. Die Vorinkubation der Oozyten mit p-Chloromercuribenzoat (PCMB), einem weiteren spezifischen Inhibitor der erleichterten Diffusion, führte zu einer deutlichen Inhibition der Inosin- bzw. Guanosinaufnahme: es verblieb eine Aufnahme die weitgehend direkt proportional zum Substratangebot war. Der Effekt gleicht dem Einfluß den das JAA auf die Aufnahme von Inosin bzw. Guanodin hatte, weshalb man vermuten kann, dass es sich bei dem durch PCMB gehemmten Anteil um die ATP-abhängige Aufnahme und bei dem verbleibenden, linear-proportionalen Anteil um Aufnahme durch einfache Diffusion handelt. Bei Hepatoma Zellen inhibiert das PCMB ebenfalls nur den sättigbaren, nachweislich auf erleichterte Diffusion beruhenden Transport von Nukleosiden, während der Transport durch einfache Diffusion von PCMB unbeeinflusst blieb (Plagemann und Erbe, 1972).

Bei Spermatogonien war die Aufnahme von Inosin dagegen nicht durch Vorinkubation mit PCMB hemmbar; sie wurde, im Vergleich zur Kontrolle, sogar erheblich gesteigert. Bei manchen Säugerzellen war die Aufnahme von Nukleosiden nach Zugabe anderer Inhibitoren der erleichterten Diffusion (Dipyridamol oder NBTI) im Vergleich zur Kontrolle ebenfalls angestiegen (Plagemann und Aran, 1990; Crawford et al., 1990). Die Autoren konnten zeigen, dass diese Inhibitoren sehr wahrscheinlich die erleichterte Diffusion der Säugerzellen blockieren und dadurch nicht nur den Einstrom, sondern auch den Ausstrom von Nukleosiden verhindern. In der Folge steigt dann die Aufnahme der Nukleoside durch ein ebenfalls vorhandenes Na^+ -abhängiges-System an, das selbst nicht durch DIP hemmbar ist. Die Koexistenz zweier verschiedener Nukleosidtransporter könnte also auch bei *Nereis*-Spermatogonien erklären, warum der Transportinhibitor PCMB zu einer Akkumulation von Inosin geführt hat. Ob Spermatogonien Inosin tatsächlich (auch) durch erleichterte Diffusion aufnehmen, kann also durch die Inkubation mit PCMB nicht direkt, sondern höchstens indirekt postuliert werden.

Im Gegensatz zur Inosinaufnahme wurde die Aufnahme von Guanosin durch Spermatogonien nach Vorinkubation mit PCMB deutlich gehemmt. Nach der Vorbehandlung mit PCMB war die Aufnahme allerdings nicht durchweg linear-proportional zur Angebotskonzentration: die Aufnahme war bis zu einem Angebot von ca. 100 μM Inosin sättigbar und bei Konzentrationen darüber nicht-sättigbar. Möglicherweise war die verwendete Konzentration von 1 mM PCMB zu gering, um den sättigbaren Anteil der Guanosinaufnahme vollständig zu inhibieren.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass ein Nachweis von erleichteter Diffusion mit NBTI, einem Inhibitor der erleichterten Diffusion, bei Keimzellen beiderlei Geschlechts von *Nereis virens* nicht möglich war. PCMB, ebenfalls ein spezifischer Inhibitor der erleichterten Diffusion, führte dagegen bei Oozyten zu einer deutlichen Hemmung der Aufnahme von Inosin bzw. Guanosin; PCMB hat sehr wahrscheinlich den sättigbaren, ATP-abhängigen Anteil der Nukleosidaufnahme gehemmt; was wiederum den Rückschluss zulässt, dass es sich bei dem sättigbaren Anteil der Aufnahme von Purinnukleosiden durch Oozyten um erleichterte Diffusion handelt. Dasselbe scheint auch für die Aufnahme von Guanosin durch Spermatogonien zu gelten. Ob Spermatogonien Inosin auch durch erleichterte Diffusion aufnehmen, konnte durch die Inkubation mit PCMB nicht eindeutig nachgewiesen werden. Vielleicht verfügen die Spermatogonien noch über ein weiteres, möglicherweise, aktives System zur Aufnahme von Inosin, das nicht durch PCMB hemmbar war.

3.3.6 Verfügen *Nereis*-Keimzellen über aktive Nukleosidtransportsysteme?

Säugerzellen nehmen Nukleoside wie bereits erwähnt vorwiegend durch erleichterte Diffusion auf, dies kann auch in Kombination mit einfacher Diffusion geschehen (Plagemann et al., 1988). Erst in den letzten Jahren wurden auch aktive, d.h. Na^+ -abhängige Nukleosidaufnahmesysteme in Kombination mit erleichteter Diffusion bei verschiedenen Zellen der Maus nachgewiesen (Plagemann und Aran, 1990; Plagemann, 1991). Bei Oozyten einer Seeigelart wurde dagegen gezeigt, dass die Aufnahme von Nukleosiden ganz ausschließlich auf einem Na^+ -abhängigem Transportsystem beruht (Schneider und Whitten, 1987). Um zu überprüfen, ob die Oozyten bzw. die Spermatogonien über ein solches aktives Na^+ - oder gar Ca^{2+} -abhängiges Transportsystem für Nukleoside verfügen, wurde die Aufnahme in Gegenwart von Ouabain bzw. Quercetin untersucht. Ouabain ist der klassische Hemmstoff der Na^+/K^+ -ATPase (Tobin and Sen, 1970). Ouabain bindet irreversibel an die K^+ -Bindungsstelle

der ATPase wodurch auch der Na^+ -Ausstrom aus der Zelle zum Erliegen kommt. Der Na^+ -Gradient über der Zellmembran bricht zusammen und ein eventuell vorhandener Symport von Nukleosiden mit Na^+ wird unterbunden. Quercetin blockiert dagegen spezifisch $\text{Ca}^{2+}/\text{K}^+$ -ATPasen und verhindert so ebenfalls einen Cotransport von Nukleosiden mit Ca^{2+} (Lang und Racker, 1974). Zusätzlich wurde die Aufnahme von Nukleosiden durch Oozyten und Spermatogonien in einem Medium getestet, das Na^+ -arm war.

Im Bereich physiologischer Substratkonzentrationen war keine Hemmung der Inosin- bzw. Guanosinaufnahme bei Oozyten durch Ouabain, oder im Na^+ -Mangelmedium zu beobachten. Eine Aufnahme die hauptsächlich durch ein Na^+ -abhängiges System geleistet wird hätte durch einen Mangel an Na^+ -Ionen vor allem im Bereich niedriger Substratkonzentrationen viel stärker gehemmt werden müssen. Nur bei unphysiologisch hohem Substratangebot, oberhalb von $50 \mu\text{M}$ Inosin war eine leichte Hemmung der Inosinaufnahme durch diese Inhibitoren bei Oozyten zu beobachten. *Nereis*-Oozyten scheinen demnach nicht über ein Na^+ -abhängiges Transportsystem zu verfügen. Die Aufnahme von Inosin durch Spermatogonien wurde in Anwesenheit von Ouabain so gut wie gar nicht gehemmt; ein Befund der vordergründig eher gegen das Vorhandensein eines aktiven, Na^+ -abhängigen Systems spricht. Es gibt allerdings Beispiele dafür, dass Ouabain dann die Aufnahme **nicht** sichtbar verringert, wenn der Anteil des Na^+ -abhängigen Transports an der Aufnahme zu gering ist. So führte die Vorinkubation von L1210 Zellen mit 3 mM Ouabain nicht zu einer Verringerung der Nukleosidaufnahme, obwohl die Zellen neben der erleichterten Diffusion nachweislich über ein aktives, Na^+ -abhängiges Transportsystem verfügten (Plagemann und Aran, 1990). Na^+ -armes Medium bewirkte dagegen bei *Nereis*-Spermatogonien auch im niedrigen Konzentrationsbereich für Inosin eine deutliche, wenn auch nicht übermäßige Hemmung der Aufnahme. **Dieser Befund unterstützt dennoch die Vermutung, dass Spermatogonien neben der erleichterten und der einfachen Diffusion auch über ein aktives, Na^+ -abhängiges Transportsystem zur Aufnahme von Inosin verfügen.** Quercetin hatte so gut wie keinen Einfluß auf die Aufnahme von Nukleosiden durch die Keimzellen beiderlei Geschlechts; ein Ca^{2+} -abhängiger Nukleosidtransport kann somit ebenfalls ausgeschlossen werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Oozyten von *Nereis virens* sehr wahrscheinlich kein aktives System zum Transport von Inosin und Guanosin besitzen.

Der Befund, dass bei Oozyten kein aktives System zur Aufnahme von Nukleosiden nachgewiesen werden konnte, unterstützt die Vermutung, dass es sich bei dem ATP-abhängigen Anteil der Aufnahme um erleichterte Diffusion handelt. Es konnte dagegen nicht mit letzter Sicherheit festgestellt werden, ob Spermatogonien zusätzlich über ein Na^+ -abhängiges System zum Transport von Inosin verfügen. Sollte es vorhanden sein, so hat es wahrscheinlich nur einen sehr geringen Anteil an der Aufnahme von Inosin. **Man kann aufgrund dieser Befunde vermuten, dass die Aufnahme von Inosin auch bei *Nereis*-Spermatogonien im Wesentlichen durch erleichterte und durch einfache Diffusion bestritten wird.** Ein möglicher, aktiver Transport von Guanosin durch Spermatogonien wurde nicht untersucht.

3.3.7 Können aufgenommene Nukleoside die Keimzellen wieder verlassen?

Über einen Zeitraum von 24 h in Kultur gaben die mit ^{14}C -Inosin inkubierten Oozyten weniger als 4 % der aufgenommenen Aktivität wieder in das Medium ab. Mit ^{14}C -Inosin inkubierte Spermatogonien gaben dagegen schon nach wenigen Minuten fast die Hälfte der zuvor

aufgenommenen Aktivität wieder in das Medium ab. Die Tatsache, dass Spermatogonien einen Großteil des aufgenommenen Inosins sofort nach der Aufnahme wieder abgaben, bedeutet möglicherweise, dass die Spermatogonien Nukleoside nicht so effektiv speichern können wie die Oozyten.

3.3.8 Zwei verschiedene Nukleoside, ein Transportsystem?

Es konnte gezeigt werden, dass Guanosin die Aufnahme von Inosin durch Oozyten kompetitiv hemmt; bei diesem Hemmtyp konkurriert der Hemmstoff - in diesem Fall das Guanosin - aufgrund seiner Strukturanalogie mit dem Inosin um dessen Bindungsstelle am Transporter. Für die Aufnahme von Inosin in Gegenwart von Guanosin kann eine kompetitive Hemmkonstante K_i berechnet werden; der K_i -Wert gibt Hinweise darauf, ob zwei strukturell verwandte Substrate durch denselben Carrier transportiert werden können (Plagemann und Richey, 1974; Foret und Ahlers, 1982). Der K_i -Wert für die durch Guanosin gehemmte Aufnahme entsprach etwa dem K_m -wert für die Aufnahme von Inosin in Abwesenheit von Guanosin. Mit anderen Worten: beide Nukleoside konnten mit gleich starker Affinität an den Transporter gebunden und von diesem wahrscheinlich auch mit gleicher Effektivität transportiert werden. Die Aufnahme von Inosin durch Spermatogonien wurde durch die Gegenwart von Guanosin ebenfalls kompetitiv gehemmt. Inosin und Guanosin konnten demnach auch bei Spermatogonien an dasselbe Transportprotein binden. Der sehr niedrige K_i -Wert der durch Guanosin gehemmten Inosinaufnahme deutet allerdings darauf hin, dass das Guanosin mit etwas größerer Affinität von dem Transporter gebunden und vielleicht auch transportiert wurde als das Inosin. Möglicherweise verfügen die Spermatogonien noch über einen anderen, durch Guanosin nicht hemmbaren Transporter, der eine höhere Affinität für Inosin besitzt. Um diese Befunde zu untermauern hätte man die Inosinaufnahme bei mehreren verschiedenen Guanosinkonzentrationen untersuchen müssen. Berlin und Oliver (1975) vermuten, dass die verschiedenen Nukleoside alle durch einen Transportertyp in die Zelle gelangen. Bei dem marinen Bakterium MB22 wurde ein gemeinsames Transportsystem für Inosin und Adenosin und ein anderes für Guanosin nachgewiesen (Foret und Ahlers, 1982). In meinen Versuchen verwendete ich zur Hemmung der Inosinaufnahme mit 100 $\mu\text{mol/l}$ Guanosin eine Konzentration, welche die physiologische Konzentration bei Keimzellen beiderlei Geschlechts um das 10-fache übertraf. Bei geringen Konzentrationen in der Cölomflüssigkeit ist zu keiner Zeit der Geschlechtsreife eine massive Hemmung der Inosinaufnahme durch Guanosin zu vermuten. Wahrscheinlicher ist eher eine umgekehrte Hemmung der Guanosinaufnahme durch die stets viel höheren Inosinkonzentrationen, wenn man eine ähnliche Affinität zum Transporter zugrunde legt. Hierzu wurden allerdings keine Untersuchungen gemacht.

3.3.9 Aufnahme von Nukleosiden durch ausgewachsene Keimzellen von *Nereis virens*

Obwohl die fast reifen Keimzellen beiderlei Geschlechts die Synthese von Nucleinsäuren reduzieren, wenn auch nicht gänzlich einstellen siehe Kapitel 2.4.1 und 2.4.4 vermögen sie immer noch Nukleoside aufzunehmen. Bei fast reifen Oozyten und Spermien waren jedoch deutliche Veränderungen in der Aufnahmecharakteristik von Nukleosiden zu beobachten. Der apparente K_m -Wert der Inosin-Aufnahme stieg von ca. 60 auf über 400 μM an. Dies bedeutet, dass im Verlauf des Oozytenwachstums ein Transportsystem an Bedeutung

gewonnen hatte, dass nur eine sehr geringe Affinität für Inosin besaß. Für die Aufnahme von Guanosin durch große Oozyten konnte gar kein K_m -Wert mehr berechnet werden, da die Aufnahme im beobachteten Konzentrationsbereich einer fast linearen Kinetik entsprach. Die Vorinkubation ausgewachsener Oozyten mit Dipyridamol (DIP), einem Hemmstoff der erleichterten Diffusion, führte nicht zu einer Hemmung der Inosin- bzw. Guanosinaufnahme; weshalb man vermuten kann, dass ausgewachsene Oozyten Nukleoside nicht mehr durch erleichterte Diffusion aufnehmen. Es kann aber auch nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei dem Transporter der erleichterten Diffusion um einen Subtyp handelt, der DIP-insensitiv ist. DIP-sensitivität ist nachgewiesenermaßen stark artabhängig (Hammond, 1992).

Auch bei den Spermien hatte sich der K_m -Wert für die Aufnahme von Inosin im Vergleich zu den Spermatogonien erhöht (z.B. von 24 auf 135 μM). Für die Aufnahme von Guanosin durch Spermien war die Aufnahmekinetik linear und eine Berechnung des K_m -Wertes somit nicht mehr möglich. Die Vorbehandlung mit DIP hemmte, wenn auch nur geringfügig, die Inosinaufnahme; dies könnte bedeuten, dass die frühen Spermien im geringen Maß Inosin noch durch erleichterte Diffusion aufnehmen. Aufgrund dieser Befunde kann man vermuten, dass Inosin und Guanosin überwiegend durch einfache Diffusion in die Spermien gelangten. Um so erstaunlicher waren die Befunde nach Behandlung ausgewachsener Oozyten und Spermien mit JAA. Bei Oozyten hatte die JAA-Behandlung vor allem im Bereich physiologischer Substratkonzentrationen eine drastische Steigerung der Inosinaufnahme zur Folge, während die Aufnahme von Guanosin durch JAA nur geringfügig gesteigert wurde. Die Behandlung der Spermien mit JAA hatte im Angebotsbereich bis 100 μM Inosin keinen sichtbaren Einfluß auf die Inosinaufnahme; bei Angebotskonzentrationen über 100 μM stieg die Aufnahme ebenfalls leicht an. Auf die Guanosinaufnahme durch Spermien hatte die JAA-Behandlung dagegen gar keinen sichtbaren Einfluß. Das Phänomen der gesteigerten Aufnahme nach JAA-Behandlung kann nicht erklärt werden. Hammond (1992) beschreibt denselben Effekt auf die Aufnahme von Uridin durch Tumorzellen, konnte aber ebenfalls keine Erklärung dafür liefern.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass sich das Nukleosidtransportsystem ausgewachsener Keimzellen von *Nereis virens* beiderlei Geschlechtes dramatisch verändert. Die Aufnahmekinetiken zeigen, dass ausgewachsenen Keimzellen ihre Fähigkeit, Inosin bzw. Guanosin über das sättigbare, carriervermittelte System aufzunehmen, fast gänzlich verloren haben; Nukleoside gelangen ganz überwiegend auf einem nicht-sättigbaren Weg in die Keimzellen, wobei es sich vermutlich um einfache Diffusion handelt. Das Vorhandensein erleichteter Diffusion bei reifen Keimzellen konnte mit Dipyridamol vielleicht nicht gänzlich ausgeschlossen werden, da es für Dipyridamol sowohl sensitive als auch insensitive Zellen gibt; weitere Versuche mit anderen Inhibitoren wären nötig gewesen. Worauf die Veränderung der Transportcharakteristik bei ausgewachsenen Keimzellen beruht wurde nicht näher untersucht; sie könnte z.B. auf einen Abbau von Carrierproteinen beruhen. Retikulozyten vom Schwein und vom Schaf verlieren während ihrer Reifung zu Erythrozyten nachweislich NBTI-Bindungsstellen auf ihrer Membran; ein Verlust von NBTI-Bindungsstellen ist immer auch gleichbedeutend mit einem Verlust an Nukleosidtransportern (Plagemann et al, 1988).

3.3.10 K_m -Werte der Nukleosidaufnahme bei verschiedenen Zellen

Ein Vergleich der K_m -Werte für die Aufnahme von Nukleosiden kann vielleicht Aufschluß darüber geben, ob es Gemeinsamkeiten zwischen den Nukleosidtransportsystemen von *Nereis*

-Keimzellen und den Zellen anderer Tierstämme gibt. Der K_m -Wert der Nukleosidaufnahme wurde für Säugerzellen in der Regel bei 37 °C bestimmt (siehe **Tabelle 10**), bei dieser Temperatur beträgt der Anteil der einfachen Diffusion an der Aufnahme meist weniger als 5 % (Plagemann et al, 1988). Bei den Keimzellen von *Nereis virens* wurden die K_m -Werte des ATP-abhängigen Systems mit den K_m -Werten der Säugerzellen verglichen, da diese Werte den Anteil der einfachen Diffusion an der Aufnahme nicht mehr enthalten. Man sieht in **Tabelle 10**, dass die K_m -Werte von verschiedenen Vertebratenzellen und *Nereis*-Keimzellen für die Aufnahme von Nukleosiden teilweise sehr gut übereinstimmen. Die ebenfalls in der Tabelle aufgeführten K_m -Werte für die Nukleosidaufnahme durch das marine Bakterium MB22 sind dagegen durchweg viel geringer, als bei den Keimzellen von *Nereis virens*. Dies deutet darauf hin, dass mittelgroße Oozyten und Spermatogonien von *Nereis virens* und Vertebratenzellen über strukturell gleiche oder zumindest ähnliche Systeme zum Transport von Nukleosiden verfügen, während das marine Bakterium MB22 wahrscheinlich über ein völlig anders geartetes Transportsystem verfügt.

Einige Transportproteine, die bei Säugerzellen für die erleichterte Diffusion von Nukleosiden verantwortlich sind, wurden bereits isoliert und näher charakterisiert. Im SDS-Page wandern die meisten dieser Transportproteine in einem Bereich von 45 - 80 kD (Young et al, 1985; Plagemann et al, 1988). Plagemann et al (1988) vermuten, dass die Nukleosidtransporter aufgrund ihres Molekulargewichts und ihrer chemischen Eigenschaften eine ähnliche Struktur wie die Zucker-Transporter haben. Dies wäre nach Plagemann schon deshalb nichts Ungewöhnliches, weil beide Transporter die erleichterte Diffusion von nicht-ionischen, hydrophilen Substanzen ermöglichen.

Nukleosid	K_m [μM]	Temp. [°C]	Zellart	Referenz
Inosin	20	12	Oozyten 140 μM (<i>Nereis virens</i>)	G. Geier
	18	12	Spermatogonien (<i>Nereis virens</i>)	G. Geier
	11	37	Hepatoma-Zellen (Ratte)	Plagemann, 1971
	21	37	Leukozyten (Kaninchen)	Taube und Berlin, 1972
	1,4	25	Marines Bakterium MB 22	Foret und Ahlers, 1982
Guanosin	40	12	Oozyten 140 μM (<i>Nereis virens</i>)	G. Geier
	4,7	12	Spermatogonien (<i>Nereis virens</i>)	G. Geier
	3,6	37	HeLA-Zellen	Mizel und Wilson (1972)
	12	37	Hepatoma-Zellen (Ratte)	Plagemann, 1971
	10	37	Fibroblasten (Huhn)	Scholtisek, 1968
	18	37	Myocyten (Ratte)	Geisbuhler et al, 1987
	110	37	<i>Hymenolepis diminuta</i>	Page et al, 1975
0,7	25	Marines Bakterium MB 22	Foret und Ahlers, 1982	

Tabelle 10: Vergleich der K_m -Werte für die ATP-abhängige Aufnahme von Inosin bzw. Guanosin durch mittelgroße Oozyten und Spermatogonien von *Nereis virens* mit den K_m -Werten für die Aufnahme von Inosin bzw. Guanosin durch verschiedene Vertebratenzellen; durch ein marines Bakterium und durch den Cestoden *Hymenolepis diminuta*. Beachte, dass die K_m -Werte bei verschiedenen Temperaturen bestimmt wurden.

Für den Aufbau des Glukose-Transporters wurde, aufgrund seiner Aminosäuresequenz, ein Modell seiner Anordnung in der Membran vorgeschlagen: Das Transportprotein besteht

demnach aus zwölf die Membran durchspannenden Helices, welche miteinander durch Sequenzen verbunden sind, die abwechselnd im Zellinneren und auf der Zelloberfläche präsentiert werden. Man vermutet, dass sich fünf oder mehr dieser Helices ringförmig zusammenlagern können so, dass in ihrer Mitte eine Art wässrige „Pore“ entsteht (Mueckler, 1994). Es wird vermutet, dass der Transporter im Bereich dieser „Pore“ über Bindungsstellen für Glukose verfügt, die durch Konformationsänderungen, abwechselnd im Zellinneren oder auf der Zelloberfläche präsentiert werden (Stein, 1986). Erst in den letzten Jahren wurde auch die Aminosäuresequenz eines Nukleosidtransporters aus Zellen der Rattenleber bestimmt (Che und Arias, 1995). Dieser Na⁺-abhängige Nukleosidtransporter besteht aus 659 Aminosäuren (72 kD) und verfügt im Gegensatz zu dem Glukosetransporter möglicherweise über vierzehn, die Membran durchspannende Domänen. Die Sequenzen stimmen weitgehend mit einem Pyrimidin-spezifischen Nukleosidtransporter von Zellen der Ratte und mit drei Nukleosidtransportern von Bakterien überein. Die Autoren vermuten deshalb, dass die Nukleosidtransporter von Bakterien und Säugern ihren Ursprung in einem gemeinsamen Vorläufer haben. Bei Säugerzellen geht man zur Zeit davon aus, dass es neben den vier Na⁺-**un**abhängigen Subtypen (NBTI bzw. DIP sensitiv bzw. insensitiv) noch vier verschiedene Na⁺-**ab**hängige Subtypen von Nukleosidtransportern gibt: Das System N1 (**cif**) transportiert spezifisch Purine und Uridin und wurde in Darmepithelzellen nachgewiesen (Huang et al, 1993); N2 (**cit**) transportiert spezifisch Pyrimidinnukleoside und Adenosin; N3 (**cib**) wurde in Gehirnzellen von Kaninchen nachgewiesen und transportiert sowohl Purine als auch Pyrimidine (Wu et al, 1994); N4 wurde in Nierenzellen nachgewiesen und scheint dem Transporter N2 zu entsprechen, kann aber im Gegensatz zu N2 auch Guanosin transportieren (Wu et al, 1994).

3.3.11 Schlußfolgerungen (Nukleosidtransportsysteme)

- ⇒ Mittelreife Oozyten und Spermatogonien II. Ordnung von *Nereis virens* können Inosin und Guanosin auf **sättigbare, ATP-abhängige** und auf eine **nicht-sättigbare, ATP-unabhängige** Weise aufnehmen; wobei die Aufnahme im Bereich physiologischer Substratkonzentrationen ganz überwiegend durch **sättigbare, ATP-abhängige** Aufnahme geleistet wird (siehe dazu auch **Abb. 66**). Bei der sättigbaren Aufnahme handelt es sich vermutlich um kinaseabhängige, **erleichterte Diffusion** und bei der nicht-sättigbaren um **einfache Diffusion**.
- ⇒ Es ist zu vermuten, dass ausgewachsene Keimzellen beiderlei Geschlechtes die Fähigkeit zur Aufnahme von Nukleosiden durch erleichterte Diffusion fast völlig verloren haben; dies könnte auf einen Verlust von Transportproteinen beruhen. Sie nehmen Nukleoside wahrscheinlich nur noch durch einfache Diffusion auf.
- ⇒ Erleichterte Diffusion stellt vor allem im Bereich relativ niedriger physiologischer Substratkonzentrationen ein sehr effizientes System zur Versorgung der Keimzellen mit exogenen Nukleosiden dar; außerdem kann vor allem das Ausmaß der Expression von Carrierproteinen durch eine Vielzahl physiologischer Parameter reguliert werden. Dies ist wahrscheinlich besonders für die Oozyten der schnellen Wachstumsphase und für die sehr teilungsaktiven Spermatogonien von herausragender Bedeutung.
- ⇒ Die Aufnahme von Nukleosiden durch einfache Diffusion hat für mittelgroße Keimzellen, unter Berücksichtigung physiologischer Konzentrationen, wahrscheinlich keine Bedeutung.

Ausnahme: Mittelreife Oozyten nehmen Guanodin zur Hälfte (!) durch einfache Diffusion auf.

- ⇒ Oozyten von *Nereis virens* besitzen kein aktives, Na^+ -oder Ca^{2+} -abhängiges System zum Transport von Inosin und Guanodin.
- ⇒ Spermatogonien besitzen möglicherweise ein zusätzliches Na^+ -abhängiges, aktives System zum Transport von Inosin, das aber nur einen sehr geringen Anteil an der Aufnahme hat.
- ⇒ Die Keimzellen beiderlei Geschlechts reichern aufgenommenes Inosin bzw. Guanodin an. Diese Akkumulation wird wahrscheinlich durch eine schnelle intrazelluläre Phosphorylierung durch Kinasen ermöglicht. Der hohe Anteil freier, d.h. nicht-metabolisierter Nukleoside muss durch andere Prozesse, wie z.B. durch Kompartimentierung, erklärt werden.
- ⇒ Sowohl mittelgroße Oozyten als auch Spermatogonien von *Nereis virens* besitzen vermutlich ein gemeinsames Transportsystem für Inosin und Guanodin. Bei Spermatogonien hat der gemeinsame Transporter von Inosin und Guanodin allerdings eine etwas größere Affinität für Guanodin als für Inosin.
- ⇒ Die kinetischen Eigenschaften der Aufnahme von Nukleosiden bei Keimzellen von *Nereis virens* und bei einigen Säugerzellen sind sehr ähnlich. Dies deutet darauf hin, dass die Keimzellen von *Nereis virens* und die Zellen einiger Vertebraten über gleiche oder zumindest ähnliche Systeme zum Transport von Nukleosiden verfügen.

3.3.12 Modell der Nukleosidaufnahme bei Keimzellen von *Nereis virens*

Die **Abb. 66** fasst die aus den Inhibitionsversuchen gewonnenen Befunde über die Aufnahme von Nukleosiden bei Keimzellen beiderlei Geschlecht von *Nereis virens* noch einmal in einem Modell zusammen.

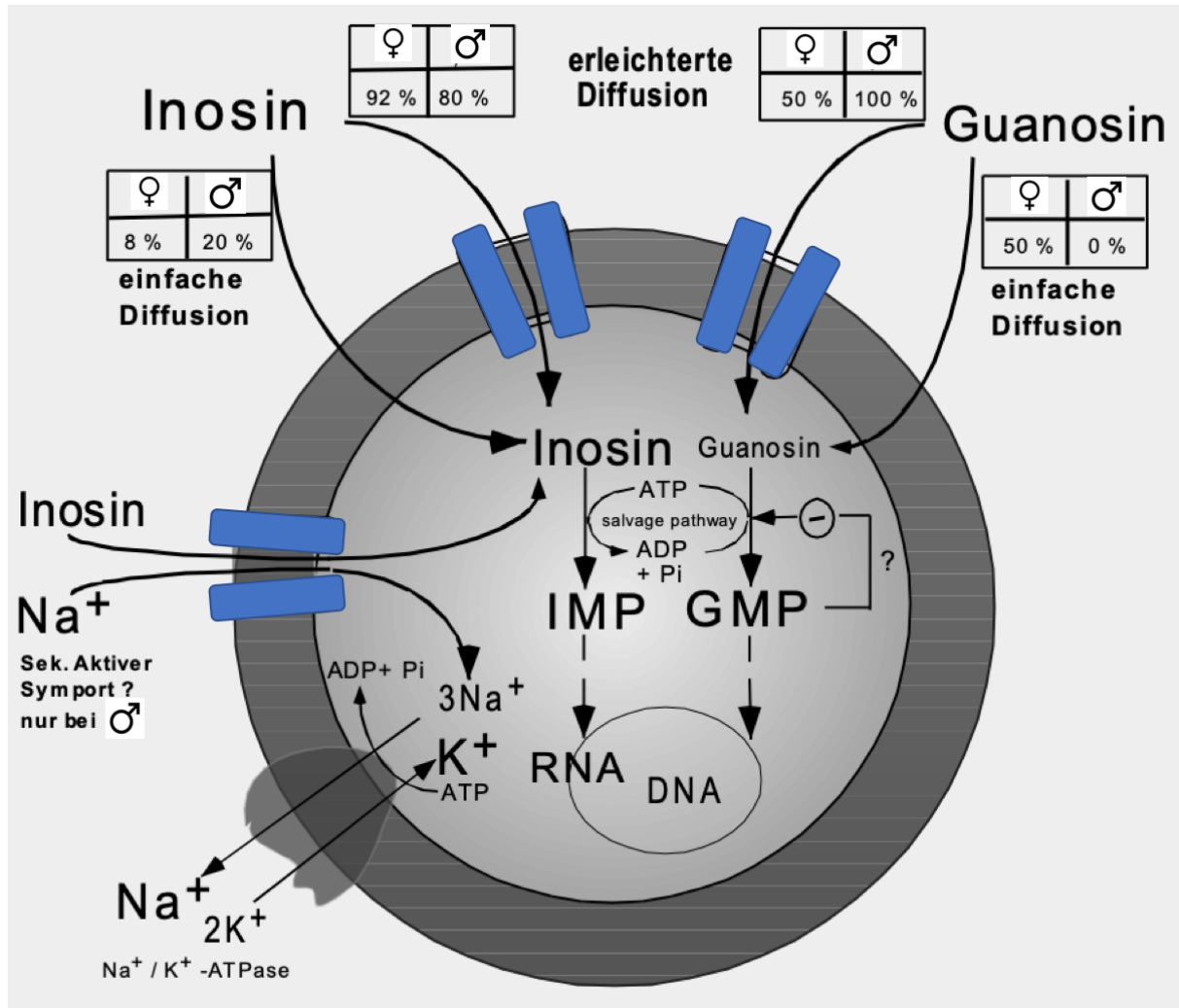


Abb. 64: Das Modell beschreibt die Transportsysteme für Nukleoside bei Keimzellen beiderlei Geschlechts von *Nereis virens* und den prozentualen Anteil der einfachen und der erleichterten Diffusion an der Gesamtaufnahme. Die erleichterte Diffusion wird sehr wahrscheinlich durch Tunnelproteine vermittelt die eine Art „wässrige Pore“ in der Zellmembran bilden. Ein aktives Nukleosid-Transportsystem (Na⁺-Symport über ein Tunnelprotein) liegt möglicherweise bei männlichen Keimzellen vor, es könnte indirekt durch die Na⁺/K⁺-ATPase angetrieben werden (sekundärer aktiver Transport). Im Inneren der Zelle ist die Metabolisierung der aufgenommenen Nukleoside zu Nukleotiden und deren Einbau in die Nucleinsäuren angedeutet.

3.4 Purin-Metabolismus in Keimzellen von *Nereis virens*

Bisher wurde dargestellt mit welcher Aufnahmerate und -kinetik unterschiedliche Reifungsstadien der Keimzellen von *Nereis virens* Nukleoside bei steigender Angebotskonzentrationen aufnehmen. Dann wurde untersucht durch welche Systeme die Nukleoside transportiert werden. Im Folgenden soll unter anderem diskutiert werden, welchen Anteil die aufgenommenen Nukleoside an den Purinen - bzw. Purinmetaboliten der Keimzellen nach einer bestimmten Zeit haben, um der Frage nachzugehen, ob der Purin-Pool auch endogen gespeist wird. Danach werden die Stoffwechselwege aufgenommenener Nukleoside, und das Ausmaß mit dem diese Wege beschriftet wurden, in den Keimzellen beschrieben.

Embryologen haben lange Zeit angenommen, dass sich heranwachsende, bzw. noch nicht befruchtete Oozyten in einem Zustand metabolischer Inhibition befinden. Dieses Dogma ist jedoch seit geraumer Zeit hinlänglich widerlegt. Man weiß heute, dass die Oozyten während ihres Wachstums neben Mitochondrien, Dottergranula und Ribosomen auch große Mengen Nukleinsäuren akkumulieren - all diese Substanzen sind nötig damit sich die befruchteten Oozyten normal entwickeln können (Das, 1976; Davis, 1972). Auch die Spermatogenese stellt einen sehr komplexen Entwicklungsprozess dar. Im Gegensatz zur Oogenese entstehen im Verlauf der Spermatogenese viele verschiedene Keimzellstadien, die sich nicht nur hinsichtlich ihrer Morphologie, sondern auch hinsichtlich ihrer metabolischen Zustände geradezu dramatisch unterscheiden. Vor allem auch während der Spermiogenese kommt es zu einem dramatischen morphologischen Umbau der Keimzellen, in deren Verlauf das meiste Cytoplasma abgeschnürt, ein Akrosom und ein Spermischwanz gebildet und der Kern kondensiert wird.

Die Fähigkeit von Keimzellen beiderlei Geschlechts, exogene Nukleoside in die DNA- bzw. RNA einzubauen, wurde bereits bei einer Vielzahl von Organismen unter anderem auch bei Anneliden, nachgewiesen. Dabei wurden fast ausschließlich H^3 -Uridin bzw. H^3 -Thymidin zum Nachweis der RNA- bzw. DNA-Synthese verwendet. Diese Untersuchungen basieren außerdem zumeist auf autoradiographischen und seltener auf Flüssigszintillationsmessungen. Im vorliegenden Fall wurden den Keimzellen beiderlei Geschlechts mit Inosin bzw. Guanosin erstmals Substanzen angeboten, die *in vivo*, dh in der Cölomflüssigkeit von *Nereis virens* natürlicherweise vorkommen.

Um einen ersten Überblick darüber zu erhalten, in welche Stoffgruppen das aufgenommene ^{14}C -Inosin bzw. Guanosin in den Keimzellen beiderlei Geschlechts gelangt war, wurden die inkubierten Keimzellen in die säurelösliche, in ihre RNA-, DNA-, Lipid- und Proteinfraction aufgetrennt. Der Einbau in diese Fraktionen wurde mit **Flüssigszintillationsmessungen** bestimmt. In *Nereis*-Keimzellen vieler Reifungsstadien war der überwiegende Teil der aufgenommenen Radioaktivität in der säurelöslichen Fraktion verblieben. Wenn man Eizellen des Seeigels mit H^3 -Uridin inkubiert, findet man ebenfalls hauptsächlich die niedermolekulare, dh säurelösliche Fraktion markiert (Piatigorsky und Tyler, 1967). Der geringere Teil des exogenen Inosins bzw. Guanosins wurde in *Nereis*-Keimzellen aller Reifungsstadien in die RNA, die DNA, und auch in das Lipid und in manchen Stadien zu einem sehr viel geringeren Teil auch in das Protein eingebaut. Zwischen den Keimzellen verschiedener Reifungsstadien waren außerdem deutliche Unterschiede im Markierungsmuster zu erkennen.

3.4.1 Einbau exogener Nukleoside in Oozyten

The highly specialized oocyte is faced with the difficult problem of synthesizing and storing large quantities of ova-specific components such as yolk and cortical granules as well as large amounts of normal cellular constituents such as mitochondria, ribosomes, and lysosomes.

J.H. Miller (1973)

Der Einbau exogener Nukleoside in die RNA und in die DNA zeigt, dass Oozyten von *Nereis virens*, wie die von Amphibien und Seeigeln, zur **Autosynthese** von Nukleinsäuren fähig sind. Im Gegensatz dazu bekommen die heranwachsenden Oozyten mancher Insekten (*Drosophila* und Hemiptera) und wahrscheinlich auch die des Polychaeten *Diopatra* ihre Nukleinsäuren von Follikelzellen bzw. spezialisierten Nährzellen über Cytoplasmatische Brücken geliefert (Allen, 1967). Der Einbau exogener Nukleoside in die Nukleinsäuren der **Oozyten** kann aufgrund der Befunde in wenigstens vier verschiedene Phasen unterteilt werden:

Phase I : Junge Oozyten (50 - 60 µm Ø):

Bereits die sehr jungen *Nereis*-Oozyten vom April bauten vergleichsweise viel **Inosin bzw. Guanosin** in die RNA ein, zeigten also eine rege RNA-Synthese. Auch die jungen Oozyten von *Perinereis cultrifera* (Bertout et al, 1981), *Schizobranchia insignis* (Lee und Whiteley, 1984), *Pectinaria gouldii* (Tweedell, 1966) und *Autolytus edwardsi* (Allen, 1967) synthetisieren schon intensiv RNA. Eine lebhaft Ausschleusung von RNA aus dem Kern junger Oozyten konnte auch mehrfach elektronenmikroskopisch bei *Nereis pelagica* (Dhainaut, 1970) und bei *Platynereis dumerilii* (Fischer, 1975) belegt werden.

In welche RNA-Arten die aufgenommenen Nukleoside in *Nereis*-Oozyten vorwiegend eingebaut werden, ist in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht worden. Man weiß jedoch, dass Oozyten ganz überwiegend, dh in manchen Fällen sogar bis zu 90 %, rRNA und in geringeren Mengen auch tRNA und mRNA synthetisieren (Sconzo et al, 1972; Das, 1976). Die Oozyten von *Urechis caupo* synthetisieren von Anbeginn der Oogenese alle rRNA-Untereinheiten im etwa gleichen Ausmaß (Das, 1976). Junge Oozyten des Anneliden *Perinereis cultrifera* synthetisieren dagegen im Vergleich zu älteren *Perinereis*-Oozyten vorwiegend „leichte“ (4S und 5S) und weniger „schwere“ 18S und 28 S rRNA-Moleküle (Bertout et al, 1981). Allen heranwachsenden Oozyten ist dennoch gemeinsam, dass sie ganz früh eine gewisse Grundausstattung aller RNA-Arten nicht nur für die Zeit nach der Befruchtung, sondern auch für die Oogenese benötigen. Inosin bzw. Guanosin wurden von den jungen *Nereis*-Oozyten dagegen zu weniger als 1 % in die DNA eingebaut; von einer nennenswerten DNA-Synthese kann zu diesem Zeitpunkt der Oogenese also nicht die Rede sein. Bei kleinen Oozyten des Polychaeten *Pectinaria gouldii* konnte durch die Inkubation mit H³-Thymidin ebenfalls DNA-Synthese nachgewiesen werden; nach Inkubation mit H³-Thymidin war vor allem das Cytoplasma und weniger der Zellkern markiert (Tweedell, 1966).

Phase II : Junge Oozyten kurz vor Beginn der schnellen Wachstumsphase (80 - 90 µm Ø):

Der Einbau von Inosin bzw. Guanosin in die **RNA** nimmt bei *Nereis*-Oozyten im Juli (90 µm Ø) deutlich ab; die Ursache hierfür kann gegenwärtig nicht genannt werden. Möglicherweise

besteht ein Zusammenhang zu der gleichzeitig etwas verringerten Aufnahme von Inosin- bzw. Guanosin durch Oozyten (siehe **Kapitel 2.2.5**). Bei *Perinereis* konnte gezeigt werden, dass die Synthese der „leichten“ 4 S und 5S RNA's im weiteren Verlauf der Oogenese abnimmt, während die Synthese der schweren 18S und 28 S-RNA deutlich zunimmt. Vielleicht kennzeichnet die Abnahme des Nukleosideinbaus in den *Nereis*-Oozyten eine Übergangsphase in der „leichte“ RNA's kaum noch und „schwere“ noch nicht in vollem Ausmaß synthetisiert werden. Der Einbau exogener Nukleoside in die **DNA** war bei Oozyten kurz vor Beginn der schnellen Wachstumsphase noch sehr gering.

Phase III: Oozyten in der schnellen Wachstumsphase (90 - 160 μm \varnothing):

Der Einbau von Inosin bzw. Guanosin in die RNA nimmt während der schnellen Wachstumsphase der *Nereis*-Oozyten dh vor allem im November bzw. Dezember (90 - 160 μm) wieder zu. Dieser Sachverhalt korreliert mit der Beobachtung, dass der RNA-Gehalt der Oozyten in dieser Zeit etwa um das zehnfache pro Oozyte ansteigt (Daten nicht gezeigt). Ein zweites Maximum des Nukleosideinbaus in die RNA heranwachsender Oozyten wurden in bisherigen autoradiographischen (z.B. bei Bertout et al, 1981) und quantitativ, biochemischen Untersuchungen (siehe Lee, 1984) bei Polychaeten noch nie beobachtet. In den bisherigen Untersuchungen anderer Autoren wurde immer der Einbau der Pyrimidine H^3 -Uridin oder H^3 -Thymidin in die RNA gemessen, während ich die Purine Inosin bzw. Guanosin verwendet habe. Pyrimidinnukleoside werden in den *Nereis*-Oozyten möglicherweise, abhängig vom Reifungsstadium, in anderem Ausmaß verstoffwechselt, als die von mir verwendeten Purinnukleoside. Das zweite Maximum des Inosineinbaus in die RNA der Oozyten von *Nereis virens* könnte aber auch ein spezies-spezifischer Effekt sein.

Bei der Betrachtung der Befunde fällt außerdem auf, dass bereits im August bzw. September, dh zwei Monate vor dem Erreichen des zweiten Maximums des Nukleosideinbaus in die Nukleinsäuren, verstärkt Inosin- bzw. Guanosin aufgenommen werden. (siehe **Kapitel 2.2.5**). Dies deutet darauf hin, dass die Oozyten von *Nereis virens* während der metabolisch sehr aktiven schnellen Wachstumsphase zuvor gespeicherte Nukleoside aufbrauchen.

Der Einbau exogener Nukleoside in die DNA der *Nereis*-Oozyten steigerte sich vor allem im Verlauf der schnellen Wachstumsphase deutlich. Im Vergleich zu den jungen Oozyten bauten schnell wachsende Oozyten bis zu 33-mal mehr Inosin und bis zu 17-mal mehr Guanosin pro Zellvolumen in die DNA ein. Der DNA-Gehalt schnell wachsender Oozyten hatte etwa um das 8-16-fache im Vergleich zu jungen Oozyten zugenommen (Daten nicht gezeigt). Ob es sich bei der in den Oozyten synthetisierten DNA vorwiegend um kernständige, um extrachromosomale oder um mitochondriale DNA handelt, ist nicht untersucht worden. Bei *Xenopus*-Oozyten kommt es jedenfalls auch zu einem starken Anstieg der DNA-Menge (Stark und Wahl, 1984). Diese Anreicherung ist auf die Amplifizierung von RNA codierender DNA (rDNA) zurückzuführen bei der es sich sehr wahrscheinlich um ringförmige, extrachromosomale DNA handelt wie man sie auch in Oozyten von Fischen und vielen Insekten findet (Urich, 1990; Dawid et al, 1970). Von Seeigel- und Froschoozyten ist bekannt, dass sie außerdem große Mengen mitochondrialer DNA enthalten (siehe Piko et al, 1967 und Dawid et al, 1970). In reifen *Urechis*-Oozyten besteht die DNA wahrscheinlich sogar zu 60 % aus mtDNA (Schwartz, 1970).

Phase IV: Ausgewachsene Oozyten (160 - 200 μm \varnothing):

Auch fast ausgewachsene Oozyten von *Nereis virens* synthetisierten noch RNA. Dies scheint so ungewöhnlich nicht zu sein, da Ähnliches auch bei fast ausgewachsenen Oozyten von *Nereis grubei*, *Urechis caupo*, *Pectinaria gouldii* und *Perinereis cultrifera* beobachtet wurde (Gould und Schroeder, 1969; Das, 1976; Tweedell, 1966; Bertout, 1981). Der deutliche niedrigere Einbau exogener Nukleoside in ausgewachsenen *Nereis*-Oozyten deutet allerdings darauf hin, dass sich hier die RNA-Syntheserate im Vergleich zu den schnell wachsenden Oozyten stark verringert. Der RNA-Gehalt bleibt in den *Nereis*-Oozyten nahezu unverändert; in einigen Oozyten konnte aber auch eine Reduzierung des RNA-Gehaltes festgestellt werden (Untersuchungen von Geier und Hoeger; Daten nicht gezeigt). Gleichzeitig verringerten sich die Aufnahmeleistungen für Inosin bzw. Guanosin deutlich (siehe **Kapitel.2.2**). Bei ausgewachsenen Oozyten von *Perinereis* zeigte Bertout (1981) mit anderer Methodik, dass sich die RNA-Syntheserate ebenfalls verringert. Es wird vermutet, dass die fortgesetzte Syntheseaktivität fast reifer Oozyten vielleicht auf den normalen RNA-Turnover der Zellen zurückzuführen ist (Gould und Schroeder, 1969). Ausgewachsene Oozyten eines anderen Polychaeten, *Autolytus*, sollen dagegen gar nicht mehr zur RNA-Synthese fähig sein (Allen, 1967). Warum ausgewachsene, also scheinbar „fertige“ Oozyten mancher Organismen noch RNA synthetisieren und andere nicht ist unklar. In diesem Zusammenhang wird diskutiert ob die Syntheseaktivität ausgewachsener Oozyten vielleicht von dem Meiosestadium abhängt, in dem fast reifen Oozyten verschiedener Organismen bis zu ihrer Befruchtung verharren (Das, 1976).

Der Einbau exogener Nukleoside in die DNA geht bei ausgewachsenen *Nereis*-Oozyten wieder auf weniger als 2 % vom insgesamt eingebauten ^{14}C -Inosin bzw. Guanosin zurück. DNA wird demnach in *Nereis*-Oozyten im Wesentlichen während der schnellen Wachstumsphase synthetisiert; mit dem Ende des Oozytenwachstums ist die Synthese nahezu abgeschlossen. Der DNA-Gehalt ausgewachsener Oozyten hatte sich im Vergleich zu dem DNA-Gehalt schnell wachsender Oozyten kaum verändert (Daten nicht gezeigt). Nach Sidorowa (1983) enthalten ausgewachsene Oozyten von *Nereis virens* gegenüber somatischen Zellen mehr als das 300-fache (!) an DNA, dabei handelt es sich wahrscheinlich zum größten Teil um cytoplasmatische DNA.

Neben dem Einbau in die Nukleinsäuren bauten die Oozyten exogene Nukleoside auch in das Lipid ein. Dieser Einbau war in jungen Oozyten und bis zum Eintritt der Oozyten in die schnelle Wachstumsphase im Oktober noch sehr gering. Mit dem Beginn der schnellen Wachstumsphase steigt die Einbaurate exogener Nukleoside in das Lipid nahezu kontinuierlich an und ist bei ausgewachsenen Oozyten pro gepacktes Zellvolumen immerhin etwa 10 - 13-mal so hoch wie bei den ganz jungen Oozyten. Dies deutet zumindest auf eine rege Lipidsynthese heranwachsender Oozyten hin. Der Einbau exogener Nukleoside in das Lipid könnte neben der Lipidspeicherung zum Teil auch auf einen stark gestiegenen turnover der Membranlipide zurückzuführen sein; es ist hinlänglich bekannt, dass der turnover der Membranlipide vor allem bei wachsenden bzw. sich differenzierenden Zellen stark ansteigt (Homa und Russell, 1991). Pocock et al (1971) konnte in reifen Oozyten von *Nereis virens* größere Mengen an Triglyceriden und Etherglyceriden nachweisen als in allen anderen Geweben unreifer Tiere von *Nereis virens*. Außerdem bauen Oozyten aller Reifungsstadien exogene Nukleoside zu einem sehr geringen Prozentsatz (< 1 %) in Protein ein. Fischer und Dhainaut (1985) und Mahlein (1996) zeigten, dass Oozyten von *Nereis virens* zur Autosynthese von Proteinen fähig sind. In welcher Form die exogenen Nukleoside in das Lipid und das Protein der Oozyten gelangt sein könnte, wird weiter unten diskutiert.

3.4.2 Einbau exogener Nukleoside in männliche Keimzellen

Spermatogenesis is a complex, homonally dependent system of differentiation which adheres to a defined temporal and morphological sequence of events.

M.R. Kalt (1979)

Zum besseren Verständnis der Befunde soll die Spermatogenese bei *Nereis virens* anhand der **Abb. 65** kurz dargestellt werden.

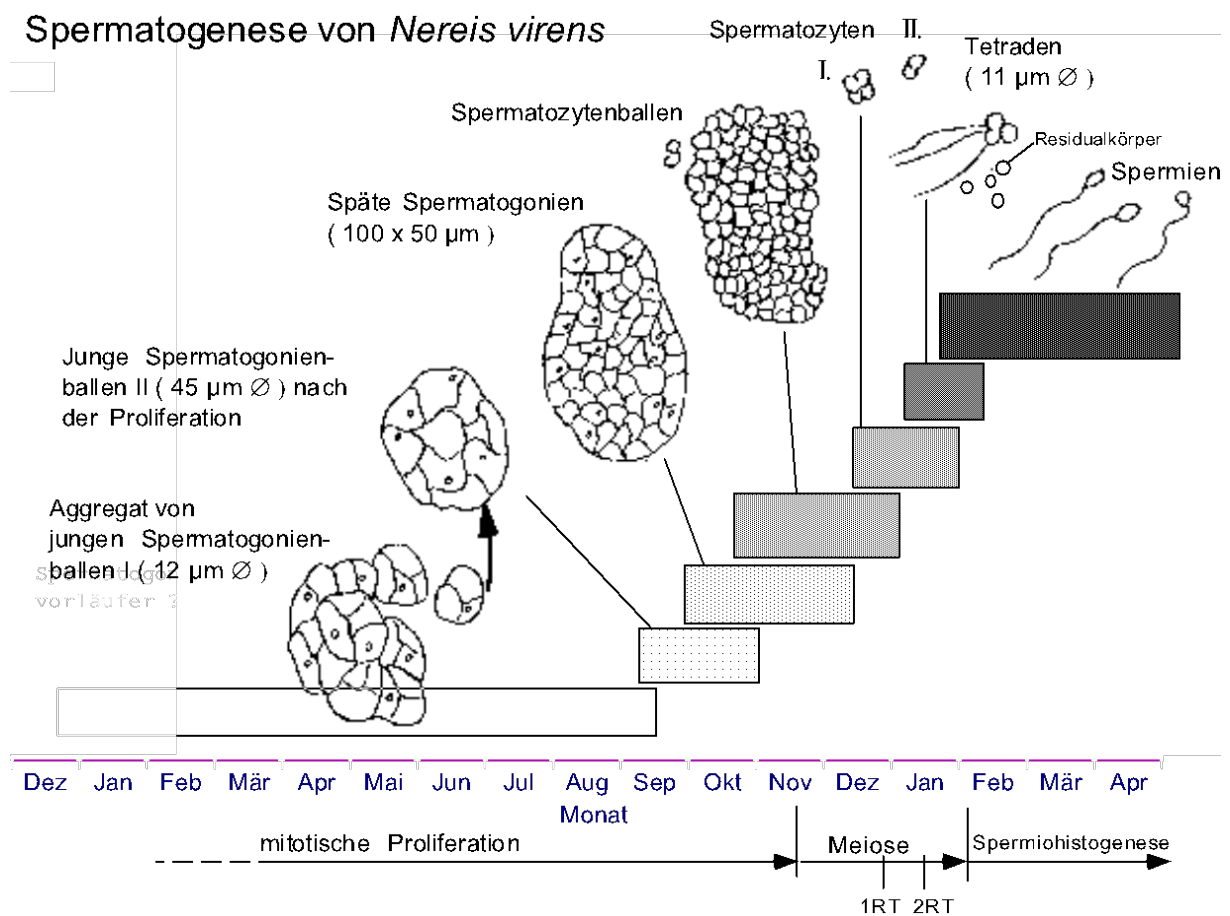


Abb. 65: Zeitliche Abfolge der Spermatogenesestadien bei *Nereis virens* im Verlauf von 14 Monaten: Spg I-Aggregate sind aus dichtgepackten Untereinheiten aufgebaut, die Größe der Untereinheiten nimmt durch mitotische Proliferation zu, bis sich kleinere Spg I-Pakete ablösen und in die nächste Wachstumsphase eintreten wodurch Spg II entstehen. Aus **späten Spg II** bilden sich im weiteren Verlauf der Spermatogenese **Spermatozytenballen**, die sich in der Prophase der Meiose I. befinden; aus den Spermatozytenballen lösen sich einzelne **Spz 1. Ordnung** die sich im Diplotän oder in der Diakinese der Meiose I. befinden. Nach Beendigung der 1. Reifeteilung (RT) entstehen **Spz 2. Ordnung**, diese treten dann in die 2. RT ein. Am Ende der 2. RT entstehen durch Zellbrücken verbundene **Spermatidentetraden**. Vermutlich sind es die späten Spermatidentetraden die Cytoplasma in Form von **Residualkörpern** abschnüren - im weiteren Verlauf differenzieren sich die Spermatiden zu **Spermientetraden**. Die Spermientetraden zerfallen schließlich in einzelne **Spermien**. Die Zuordnung der einzelnen Spermatogenesestadien beruht auf lichtmikroskopischer Begutachtung und orientiert sich an den bei *Nereis virens* und *Platynereis dumerilii* gemachten Untersuchungen (Köhler, 1985; Hanske, 1989; Meisel 1990). Über die Entstehung der Residualkörper im Verlauf der

Spermiogenese siehe Monesi (1964). Beachte in der Graphik, dass sich die verschiedenen Keimzellstadien zeitlich überlappen können.

Der Einbau exogener Nukleoside in die Nukleinsäuren wurde in den folgenden Stadien untersucht:

Spermatogonien I. + II. (Spg I und Spg II)

Vorab muss angemerkt werden, dass nicht untersucht wurde in welcher Zellzyklusphase sich die inkubierten Spermatogoniestadien von *Nereis virens* befunden haben, der Vergleich mit Befunden zur Nukleinsäuresynthese bei Keimzellen anderer Organismen kann deshalb nur eine allererste Näherung darstellen. Um einen zuverlässigen Vergleich anzustellen wäre es außerdem nötig gewesen synchrone Spermatogoniestadien zu gewinnen. Durch die Inkubation mit Inosin bzw. Guanosin konnte aber immerhin gezeigt werden, dass alle Spermatogoniestadien von *Nereis virens* **RNA** synthetisieren. Bei stark proliferierenden Spg II vom August waren die höchsten Einbauraten in die RNA im Verlauf der gesamten Spermatogenese zu verzeichnen, dies korreliert sehr gut mit der beobachteten Verdoppelung des RNA-Gehaltes vom Übergang von Spg I zu Spg II (Daten nicht gezeigt). Bei den Spermatogonien von Säugern gilt es jedenfalls schon lange als gesichert, dass vor allem auch proliferierende Spermatogonien in stärkerem Ausmaß RNA-Synthese betreiben (Fuster et al, 1977). Gillam et al (1979) haben Spermatogonien der Forelle mit radioaktiv markiertem Guanosin inkubiert und ebenfalls gefunden, dass es im Besonderen die Spermatogonien sind, die in größerem Umfang 18S und 28 S rRNAs synthetisieren. Bei späten *Nereis*-Spg II im Dezember waren die Einbauraten in die RNA wie auch der RNA-Gehalt dagegen bereits deutlich zurückgegangen.

Der Einbau exogener Nukleoside in die **DNA** der Spermatogonien I war vergleichsweise gering und erst bei mittelalten Spg II vom Oktober war die Einbaurate enorm angestiegen; bei späten Spg II im Dezember waren die Einbauraten wieder deutlich zurückgegangen. Das proliferierende Spg II von *Nereis virens* in stärkerem Ausmaß DNA synthetisieren ist auch an der Verdoppelung des DNA-Gehalt beim Übergang vom Spg I zum Spg II-Stadium zu erkennen. Beim Übergang vom späten Spg II zum Spermatozyten bzw. Tetradenstadium hatte der DNA-Gehalt dagegen kaum noch zugenommen (Daten nicht gezeigt).

Spermatozyten I + II und Tetraden

Wie in der **Abb. 65** zu sehen war handelt es sich bei den im Dezember inkubierten Stadien um ein Gemisch aus in Meiose befindlichen Spermatozyten und Tetraden. Die Tetraden wurden im Rahmen dieser Arbeit zudem lichtmikroskopisch nicht in die Spermatischen- und Spermientetraden unterschieden. Eine genaue Zuordnung der Einbaurate bzw. der Nukleinsäuresynthese zu einem einzigen Stadium ist aus diesem Grund nicht möglich. Die Spermatozyten bzw. Tetraden (Dezember) bauten im Vergleich zu den späten Spg (auch vom Dezember) etwas weniger exogene Nukleoside in die RNA ein. Dabei fällt auf, dass der RNA-Gehalt der Spermatozyten bzw. Tetraden im Vergleich zu Spg II etwa um das 10-fache abgenommen hatte (Daten nicht gezeigt). Kleene et al (1983) fanden bei der Maus, dass der RNA-Gehalt in den Tetraden ebenfalls etwa um das 10-fache geringer ist als in Spermatozyten. Dieser stark verringerte RNA-Gehalt in den *Nereis*-Keimzellen ist wahrscheinlich bereits auf die Abschnürung des RNA-haltigen Cytoplasmas in Form von **Residualkörpern** zurückzuführen.

Bei *Nereis diversicolor* kommt es nach dem Eintritt der Spermatozyten in die meiotische Prophase zu einer deutlich verringerten RNA-Synthese (Bertout, 1983). Früher ging man davon aus, dass die RNA-Synthese in Spermatozyten gänzlich eingestellt wird. Erst in den siebziger Jahren konnte gezeigt werden, dass die RNA-Synthese in primären Spermatozyten (Spz I) der Maus im Pachytän bis zum frühen Diplotän der Meiose I bestehen bleibt (Gerremia et al, 1977). Bei *Drosophila*-Spermatozyten entwickelt sich das Y-Chromosom während des Diplotän-Stadiums der Meiose I zu einem Lampenbürstenstadium in dem intensiv Männchen-spezifische RNA synthetisiert wird. Die während der Meiose synthetisierten RNAs werden während der Entwicklung der Spermatisen bzw. teilweise bis zum Ende der Spermiogenese auf Vorrat gehalten (Gerremia et al, 1977).

Der Einbau exogener Nukleoside in die DNA der *Nereis*-Spz und Tetraden hatte im Vergleich zu den vorherigen Stadien ebenfalls etwas abgenommen. Dies korreliert gut mit dem Befund dass, der DNA-Gehalt dieser Stadien kaum mehr zugenommen hatte (Daten nicht gezeigt). Es ist nicht sicher, ob meiotische DNA-Synthese generell verbreitet ist. Bei Spermatozyten der Maus war DNA-Synthese während der meiotische Prophase nachweisbar. Es gibt Hinweise darauf, dass diese Synthese auf Reparatur- und/oder auf Rekombinationsvorgänge zurückzuführen ist (Meistrich et al, 1975; Hirose et al. 1989). Bei der Maus konnte während der Meiose außerdem die Synthese mitochondrialer DNA nachgewiesen werden (Alcivar et al, 1989).

Spermien

Gegen Ende der Geschlechtsreife von Januar bis Ende April findet man große Mengen von Spermien, aber auch von Residualkörpern in der Cölomflüssigkeit männlicher Tiere. Spermien haben den Großteil ihres biosynthetischen Potentials mit dem Abschnüren der Residualkörper und dem damit einhergehenden Verlust des Golgi-Apparates und des endoplasmatischen Reticulums eingebüßt, dennoch bauen frühe Spermien vom Januar noch fast 10 % des aufgenommenen Inosins und 5 % des Guanosins in die RNA ein. Bei Spermien fast laichreifer Tiere im April war der Einbau von Nukleosiden in die RNA deutlich geringer; dies läßt den Schluß zu, dass die RNA-Synthese während der Spermiogenese, aber auch in fast laichreifen Spermien noch nicht völlig zum Erliegen gekommen ist. Der seit dem Tetradenstadium äußerst geringe RNA-Gehalt blieb auch bei allen nachfolgenden Spermienstadien unverändert niedrig (unter 2 mg/ml ZV). Auch bei *Nereis diversicolor* und bei *Xenopus laevis* wird im Verlauf der Spermiogenese RNA synthetisiert, wenn auch deutlich weniger als zuvor (Bertout, 1983; Kalt, 1979). RNA-Synthese konnte aber auch in den Spermien von Säugern nachgewiesen werden: RNA-Synthese findet sehr wahrscheinlich vorwiegend in den am Spermien Schwanz angelagerten Mitochondrien und weniger im zunehmend kondensierten Zellkern des Spermienkopfes statt (Fuster et al, 1977). Die zirkuläre mtDNA codiert für rRNAs, tRNAs und für eine Reihe von Polypeptiden die für die Atmungskette benötigt werden. Alcivar et al (1989) vermuten sogar, dass der turnover mitochondrialer RNA im Lauf der Spermatogenese der Maus zunimmt. Die von den Spermien synthetisierten RNA-Arten sind von einer Reihe von Autoren untersucht worden; dabei hat sich gezeigt, dass das RNA-Muster stark variiert. Fuster et al (1977) führen dies auf die Aggregation unterschiedlicher RNA-Arten bzw. auf den fortschreitenden Abbau durch Ribonucleasen zurück.

Wie es scheint, bauen auch die Residualkörper von *Nereis virens* noch einen geringen Prozentsatz exogenes Guanosin (0,5 %) in RNA, nicht aber in DNA ein. Der Einbau in RNA könnte aber auch teilweise oder ganz auf den Verbleib einiger Spermien in dem Residualkörper-Isolat zurückzuführen sein. Es konnte gezeigt werden, dass Residualkörper

auch Teile des Syntheseapparates mitbekommen womit es wahrscheinlich ist, dass in ihnen noch ein biosynthetisches Restprogramm abläuft.

Inosin wurde in geringem Maß (4%) auch in die DNA früher Spermien (Januar) eingebaut; ein Einbau in die DNA fast laichreifer Spermien war dagegen kaum noch nachzuweisen. Guanosin wurde in die DNA aller untersuchten Spermien in etwa demselben Ausmaß (4-5 %) eingebaut. Der DNA-Gehalt nimmt ab dem Tetradenstadium und im Verlauf der Spermiogenese nur unwesentlich zu (Daten nicht gezeigt). Es ist ungewöhnlich, dass fast laichreife Spermien noch DNA synthetisieren. In vielen Säugerspermien, aber auch bei Spermien von *Urechis caupo* ist nämlich generell keine DNA-Synthese mehr nachweisbar (Meistrich et al, 1975; Schroeder et al, 1975; Brachet, Seite 40, 1960).

Außerdem bauten fast alle männliche Keimzellstadien exogene Nukleoside in das **Lipid** ein (meist unter 1 %). Der Einbau war allerdings im Vergleich zu dem Einbau in Oozyten sehr gering. Exogene Nukleoside werden auch in das **Protein** aller männlicher Keimzellstadien von *Nereis virens* eingebaut (meist unter 0,2 %). Dies weist darauf hin, dass in allen Stadien, d.h. auch während der Spermiogenese, Proteinsynthese stattfindet. Dabei ist allerdings nicht näher untersucht worden, in welcher Form die Nukleoside in das Protein der *Nereis*-Keimzellen gelangten. Während der Spermatogenese von Säugern ist ebenfalls in allen Keimzellstadien Proteinsynthese nachweisbar (Stern und Hecht, 1983). Von Plasmamembranen männlicher Keimzellen der Maus weiß man, dass sie große Mengen von Glycoproteinen enthalten (Potter et al., 1981). Von Keimzellen der Säuger ist außerdem bekannt, dass viele Proteine die für die spätere Spermiogenese benötigt werden bereits in primären Spermatozyten synthetisiert werden. Andere Proteine, wie z.B. diejenigen für den Bau des Spermenschwanzes, werden dagegen erst im Verlauf der Spermiogenese mit Hilfe von mRNA gebildet, die bereits viel früher synthetisiert wurde. Es leuchtet ein, dass vor allem für die Umbauprozesse der Spermiogenese eine ganze Reihe neuer Proteine benötigt werden (siehe Stern und Hecht, 1983). Man weiß außerdem, dass im Verlauf der Spermatogenese verstärkt Histone synthetisiert werden (Das und Alfert, 1968; Goldberg und Bruce, 1977). Zur möglichen Verwendung der Lipide und des Proteins im Metabolismus männlicher Keimzellen von *Nereis virens* siehe weiter unten.

3.4.3 Anteil aufgenommener Nukleoside am Nukleosidstoffwechsel der Keimzellen

Bisher wurde dargestellt, welches Schicksal die aufgenommenen Nukleoside in den heranwachsenden Keimzellen haben. Nachfolgend soll diskutiert werden, welchen Anteil die exogenen Nukleoside an den intrazellulären Gehalten der Nukleoside bzw. Nukleotide haben. Dies beantwortet vielleicht die Frage, ob die Reifung bzw. das Wachstum der Keimzellen von der Aufnahme exogener Nukleoside abhängig ist.

Die Keimzellen wurden bei einem standardisierten Nukleosidangebot von 60 µM inkubiert. Unter diesen Bedingungen konnte gezeigt werden, dass in den Oozyten von *Nereis virens* der meisten Reifungsstadien ein beständiger turnover von freien **Nukleosiden** zu Metaboliten stattgefunden hat und, dass dieser turnover innerhalb relativ kurzer Zeit d.h. nach 48 bzw. 72 h im Gleichgewicht war. Das bedeutet auch, dass das Nukleosidangebot im Medium ausreichend war um eine konstante Versorgung der Keimzellen mit Nukleosiden in vitro sicherzustellen. Durch den Vergleich der intrazellulären Nukleosid- bzw. Nukleotidkonzentrationen mit der aufgenommenen Nukleosidmenge über die Zeit konnte

außerdem gezeigt werden, dass in manchen Reifungsstadien nur ein Teil der Purinnukleoside bzw. Purinmetabolite exogener Herkunft war, der andere Teil muss endogener Herkunft sein. Dagegen bauten die Keimzellen auch nach 72 h aus exogenen Nucleosiden entstandene Nucleotide in die **Nucleinsäuren** linear ein.

Der **Inosinpool** schnell wachsender Oozyten bestand im Gegensatz zu denjenigen jüngeren Oozyten nach 48 h sogar vollständig aus exogenem Inosin; dies deutet darauf hin, dass Inosin von **schnell wachsenden** Oozyten nicht bzw. nicht mehr endogen bereitgestellt wird. Die im Laufe des Oozytenwachstums ebenfalls beobachtete Verringerung des Inosinpools könnte auf einen stark erhöhten Inosin-Metabolismus und/oder auf eine verringerte *de novo* Synthese von Inosin zurückzuführen sein. Aus all dem könnte man schließen, dass schnell wachsende Oozyten im viel stärkeren Maße auf die Aufnahme von exogenem Inosin angewiesen sind, als junge, nur langsam wachsende Oozyten. Zumindest bei schnell wachsenden Oozyten ist aufgrund dieser Befunde vorstellbar, dass das durchweg geringe Angebot an exogenem Inosin (max. 0,02 $\mu\text{mol/ml}$ CF) in der Cölomflüssigkeit einen limitierenden oder gar steuernden Faktor für den Nucleosidstoffwechsel und damit vielleicht auch für das Wachstum der Eizellen darstellt.

Der intrazelluläre **Guanosinpool** bestand im Gegensatz zum Inosinpool nach 48 h in allen Reifungsstadien etwa zur Hälfte aus exogenem Guanosin. Die spezifische Aktivität des Guaninnucleotidpools war also geringer als die spezifische Aktivität des freien Guanosins in der Zelle. Unter der Voraussetzung eines konstanten Guanosin-Turnovers kann die Aussage getroffen werden, dass der Guanosinpool der Oozyten nach 48 h zu etwa 42 % aus exogenem Guanosin bestanden hat; die restlichen 58 % müssen demnach endogener Herkunft sein. Das endogene Guanosin kann durch *de novo* Synthese und/oder durch die Konvertierung gespeicherter Nucleotide entstanden sein. Ganz ähnliches wurde auch für den Pyrimidinstoffwechsel in Säugerzellen nach Inkubation mit H^3 -Uridin gefunden. Die Autoren konnten zeigen, dass die Zugabe von Uridin zum Medium die *de novo* Synthese der Zelle nicht vollständig gehemmt hat (Kramer et al, 1973).

Des Weiteren fiel auf, dass der Anteil exogener Nucleoside an den Metaboliten (Nucleotide und Nucleinsäuren) bei den ganz jungen *Nereis*-Oozyten (60 μm \varnothing) am größten war. Es ist nicht klar worauf dies zurückzuführen ist. Außerdem waren in fast allen Reifungsstadien die turnover-Raten der Nucleotide bzw. der Nucleinsäuren viel geringer als die turnover-Raten der freien Nucleoside.

Bei den Spermien und einigen anderen Entwicklungsstadien männlicher Keimzellen konnte gezeigt werden, dass der turnover der freien Nucleoside bzw. der daraus entstandenen Nucleotide innerhalb relativ kurzer Zeit, d.h. nach 48 bzw. 72 h, den Gleichgewichtszustand erreicht. Wie bei den Oozyten war nur ein Teil der Purinnucleoside bzw. Purinmetabolite exogener Herkunft, der andere Teil muss demnach endogener Herkunft sein. Im Vergleich zu den Oozyten waren die turnover-Raten der freien Nucleoside bzw. der daraus entstandenen Nucleotide bei den männlichen Keimzellen durchweg viel geringer. Der Anteil exogener Nucleoside an den Metaboliten männlicher Keimzellen war mit Abstand bei den mitotisch stark proliferierenden Spg I und Spg II am höchsten.

Aufgrund der diskutierten Befunde kann nicht ausgeschlossen werden, dass *Nereis*-Keimzellen was die Versorgung mit Purinen betrifft autonom sind, d.h. dass sie Purine (nach Bedarf !?) auch *de novo* synthetisieren können. Von vielen Zellen ist bekannt, dass sie zwar Nucleotide *de novo* synthetisieren können, sie die Synthese aber sofort reduzieren oder ganz einstellen, wenn sie über ein gewisses Angebot an exogenen Nucleosiden verfügen (Plagemann, 1971).

Sie schalten dann zur Energieersparnis auf Purinsalvage um (siehe auch weiter unten im Text). Dementsprechend können die Zellen bei geringem Angebot an exogenen Nukleosiden wieder auf *de novo*-Synthese umschalten. Untersuchungen in unserem Labor von Rebscher (1994) haben immerhin gezeigt, dass mittelreife (100 µm Ø) und fast ausgewachsene (170 µm Ø) *Nereis*-Oozyten, die über einen Zeitraum von 10 -12 Tagen (!) in einem Nukleosid-Mangelmedium inkubiert worden waren, der Inosin- bzw. Guanosingehalt **nicht** signifikant abgenommen hatte. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die metabolisch sehr aktiven *Nereis*-Oozyten zur *de novo*-Synthese von Purinen fähig sind, wenn ihnen keine exogenen Purine zur Verfügung stehen. Die Frage, ob *Nereis*-Keimzellen Nukleotide tatsächlich *de novo* synthetisieren, kann nicht zweifelsfrei beantwortet werden. Dazu müsste man die Purinbiosynthese mit **Azaserin** oder **Methotrexat** hemmen (Smith et al, 1975; Plagemann et al, 1988) oder die Keimzellen mit radioaktiv markiertem **Glycin** (einem Baustein der Purinbiosynthese) inkubieren und die Zellen auf markierte Purine hin überprüfen. Bisher sind in unserem Labor nur die Elaeozyten von *Nereis virens* mit **C¹⁴-Glycin** inkubiert worden, dabei hat sich gezeigt, dass Elaeozyten wahrscheinlich nur in sehr geringem Ausmaß zur *de novo*-Synthese fähig sind (Märker, persönliche Mitteilung).

3.4.4 Stoffwechselwege exogener Nukleoside in Keimzellen von *Nereis virens*

Purin- und Pyrimidinnukleotide werden für nahezu alle zellulären Prozesse benötigt. Neben struktureller, metabolischer und energetischer haben sie auch regulatorische Funktion (Rudolph, 1994). Von vielen tierischen Zellen weiß man, dass sie Purin- bzw. Pyrimidinnukleotide auf dem *de novo*-Weg synthetisieren können, dass sie also prinzipiell nicht auf die Aufnahme exogener Nukleoside angewiesen sind (Plagemann et al, 1988; He et al., 1994). Werden diesen Zellen allerdings vorgeformte Purinbasen oder Purinnukleoside zugeführt, dann können sie auf dem von Kornberg (1957) postulierten **Salvage-Weg** Purinnukleotide synthetisieren. Durch diese Wiederverwertung erspart sich die Zelle die Aufwendung von 6 mol ATP für die Synthese von 1 mol IMP (Rudolph, 1994). Bei Hepatoma-Zellen konnte gezeigt werden, dass die Zellen den *de novo* Weg zur Nukleotidsynthese bei einem Angebot von exogenen Nukleosiden im Medium sogar komplett unterdrücken (Plagemann, 1971). Andere Autoren vermuten, dass der *de novo* Weg nur aktiv ist, wenn die Zelle über ausreichend Energie verfügt (Murray, 1971; Berlin und Oliver, 1975). Darm-Epithelzellen, einige Bakterienmutanten, Erythrozyten, Leukozyten und parasitische Protozoen sind sogar gänzlich auf die Aufnahme exogener Nukleoside angewiesen, da sie nicht oder nur sehr begrenzt Nukleotide synthetisieren können (He et al., 1994; Hoffmeyer et al., 1971; Henderson et al., 1977; Matias et al. 1990). Bei vielen Organismen gelangen die in der Nahrung enthaltenen Purin- bzw. Pyrimidinnukleoside über den Darm und den Blutstrom zu den Zellen. Bei dem Anneliden *Nereis virens* werden die Purinnukleoside wie in **Kapitel 2.1.** gezeigt von den Elaeozyten in signifikanter Menge in die Cölomflüssigkeit abgegeben und sehr effektiv von den ebenfalls in der Cölomflüssigkeit schwimmenden Keimzellen aufgenommen (siehe auch **Kapitel 2.2**). Durch die Inkubation von Keimzellen beiderlei Geschlechts mit radioaktiv markierten Nukleosiden konnte ich die Stoffwechselwege dieser Nukleoside in den Keimzellen zu bestimmen. Da die Reaktionen des Purinstoffwechsels in allen bisher untersuchten Organismen im Wesentlichen durch dieselben Enzyme katalysiert werden, kann man indirekt auf die Existenz der beteiligten Enzyme schließen. Außerdem konnte das relative Ausmaß bestimmt werden mit dem die verschiedenen Wege des Purinstoffwechsels in

Keimzellen von *Nereis virens* besprochen werden. Meines Wissens wurde damit das erste Mal der Purinstoffwechsel bei Keimzellen eines marinen Invertebraten genauer untersucht. Der Metabolismus der Pyrimidinnukleoside bzw. -nukleotide bei Keimzellen von *Nereis virens* wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Die Tatsache, dass man in der Cöloflüssigkeit zwar Purine aber keine Pyrimidine findet, deutet darauf hin, dass *Nereis*-Keimzellen sich autonom, dh vorwiegend durch *de novo*-Synthese, mit Pyrimidinen versorgen. Von Sporozoiten verschiedener *Plasmodium*-Arten ist bekannt, dass sie ebenfalls exogene Purine zur Synthese von Purinnukleotiden nutzen, dass sie Pyrimidinnukleotide aber nur *de novo* synthetisieren können (Jacobs et al, 1974).

Nach Inkubation mit ^{14}C -Inosin bzw. ^{14}C -Guanosin waren die aufgenommenen Nukleoside zu einem großen Teil, dh oft zu mehr als 50 %, in **unmetabolisierter** Form in den Keimzellen beiderlei Geschlechts verblieben. Der andere Teil der aufgenommenen und metabolisierten Purinnukleoside wurde in *Nereis*-Keimzellen aller Reifungsstadien beiderlei Geschlechts zu **100 % anabolisiert**. Dies war daran zu erkennen, dass zumindest im Inkubationszeitraum von 48 h keine markierten Katabolite wie Harnsäure, Hypoxanthin etc zu finden waren. Bei *Drosophila*-Larven die mit ^{14}C -Inosin-haltiger Nahrung gefüttert worden, konnten ebenfalls so gut wie keine Inosinkatabolite in den Larven nachgewiesen werden; die Autoren schloßen daraus, dass die zum Abbau der Nukleoside nötige Purin-nukleosidphosphorylase nur in sehr geringem Maße in den Larven aktiv ist (Johnson et al., 1980 c). In den Elaeozyten von *Nereis virens* ist ebenfalls keine Nukleosid-Phosphorylaseaktivität nachweisbar (Hoeger, pers. Mitt.). Anhand der markierten Stoffwechselprodukte ist zu erkennen, dass die Keimzellen von *Nereis virens* beiderlei Geschlechts exogene Purinnukleoside auf dem sogenannten **Salvage-Weg** zur Synthese von Adenin- und Guaninnukleotiden nutzen (siehe **Abb. 66**). Diese Nukleotide wurden von den Keimzellen schließlich auch zur Synthese von Nukleinsäuren verwendet und gelangten in einer nicht näher spezifizierten Form auch in das Lipid und in das Protein der Keimzellen. Viele Zellen können außerdem auch die Purinbasen Hypoxanthin, Guanin und Adenosin aufnehmen, um sie auf dem Salvage-Weg zu verwerten (Burridge, 1977; Johnson et al, 1980 a; Rotllan et al, 1993). Exogene Purinbasen scheinen für die Keimzellen von *Nereis virens* aber keine Rolle zu spielen, da man in der Cöloflüssigkeit der Tiere nie Purinbasen findet. In der Cöloflüssigkeit stets nachweisbar sind dagegen Desoxyinosin und Desoxyguanosin; deren Konzentrationen sind allerdings viel geringer als die von Inosin und Guanosin. Die Aufnahme von Desoxynukleosiden durch *Nereis*-Keimzellen wurde in der vorliegenden Arbeit zwar nicht untersucht. In der Literatur werden aber Organismen geschildert, die auch exogene Desoxynukleoside zur Nukleotidsynthese verwenden: So kann z.B. *E.coli* Inosin, Guanosin **und** die korrespondierenden Desoxynukleoside als Purinquelle nutzen (Hove-Jensen und Nygaard, 1989). Der parasitische Protozoe *Giardia lamblia* kann Purine nicht *de novo* synthetisieren, und da *Giardia* Purinnukleoside nur in sehr geringem Maße für die Nukleotidsynthese verwendet ist er sogar gänzlich auf die Aufnahme exogener Desoxynukleoside angewiesen (Baum et al., 1989). Diese strikte Abhängigkeit der Purinsynthese von exogenen Desoxynukleosiden scheint aber eher die Ausnahme zu sein.

In den *Nereis*-Keimzellen waren sowohl nach Inkubation mit ^{14}C -Inosin als auch mit ^{14}C -Guanosin jeweils die Adenin- **und** die Guaninnukleotide radioaktiv markiert, dh. dass beide **Nukleoside** zur Bildung von Adenin- **und** von Guaninnukleotiden beitragen haben:

3.4.4.1 Exogenes Inosin im Nucleotidstoffwechsel der Keimzellen

Die Phosphorylierung von **exogenem Inosin** zu IMP geschah vermutlich durch eine Inosinkinase. Inosinkinasen sind nicht unbedingt spezifisch für Inosin, sondern können in vielen Fällen, wie z.B. bei *E. coli* gezeigt, auch Guanosin umsetzen (Mori et al., 1995). Die anschließende Umsetzung des IMP zu AMP wird im Allgemeinen durch eine Adenylosuccinatsynthase katalysiert. Keimzellen beiderlei Geschlechts können aus exogenem Inosin außerdem GMP bilden; diese Reaktion vom IMP über XMP zu GMP wird in allen bisher untersuchten Zellen durch eine IMP-Dehydrogenase und durch eine GMP-Synthase ermöglicht (siehe die **Stoffwechselwege 3 + 4 in Abb. 66**).

Die Nucleotide IMP und XMP waren in den *Nereis*-Keimzellen nach Inkubation mit radioaktiv markierten Nucleosiden nicht in jedem Fall markiert. Dies mag daran liegen, dass die Konzentrationen von Nucleotidmono- und Diphosphaten typischerweise niedriger als die von Triphosphaten sind (Rudolph, 1994). So konnten in *Drosophila*-Larven nach Gabe von ^{14}C -Inosin ebenfalls nur vergleichsweise geringe Mengen an Radioaktivität im IMP und im XMP nachgewiesen werden (Johnson et al., 1980 c). Es ist zu vermuten, dass die Intermediärprodukte IMP bzw. XMP sehr schnell zu Adenin- bzw. Guaninnucleotiden konvertiert werden, so dass man zwangsläufig immer nur geringe Radioaktivitäten nachweisen kann.

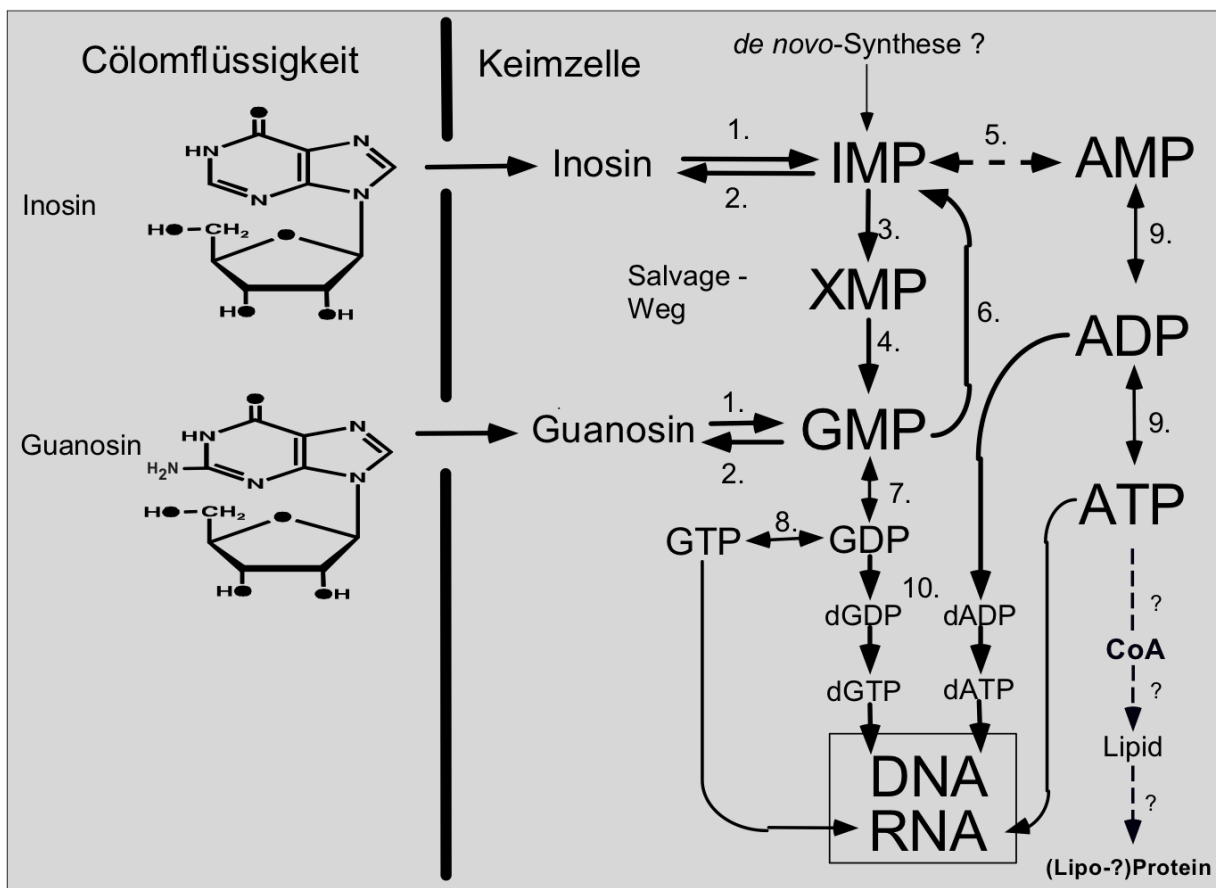


Abb. 66: Postulierter Purin-Stoffwechsel bei Keimzellen beiderlei Geschlechts von *Nereis virens*. Auf die Existenz der beteiligten Enzyme wurde indirekt anhand der Stoffwechselwege nach Inkubation mit radioaktiv markierten Nucleosiden geschlossen; demnach sind folgende Enzyme zu vermuten: 1. Inosin-/Guanosin-Kinase; 2. 5'-Nucleotidase; 3. IMP-

Dehydrogenase; **4.** GMP-Synthase; **5.** Adenylosuccinatsynthase/-lyase; **6.** GMP-Reduktase; **7.** Guanlyatkinase; **8.** Diphosphatkinase; **9.** Adenylatkinase; **10.** Ribonukleotid-Reduktase.

Das Ausmaß mit dem die exogenen Nukleoside zu Nukleotiden umgebaut wurden, war eindeutig vom Reifungsstadium der Keimzellen abhängig: Bei der Verstoffwechslung von exogenem Inosin fällt auf, dass junge Oozyten (60-115 μm \varnothing) nie mehr als 40 % davon zu Adeninnukleotiden und fast 60 % des exogenen Inosins zu GMP umgebaut haben; schnell wachsende Oozyten bauten dagegen 75 % des exogenen Inosins zu Adeninnukleotiden und nur noch 23 % zu GMP um. Männliche Keimzellen fast aller Reifungsstadien bauten mehr als 60 % des exogenen Inosins zu AMP um, gleichzeitig wurden die restlichen 40 % des exogenen Inosins, wie bei den Oozyten, zu GMP umgebaut. Reife Spermien setzten exogenes Inosin dagegen ganz überwiegend, d.h. zu 84 %, zu GMP und nur zu 15 % zu AMP um. Die Larve von *Drosophila* baut zum Vergleich exogenes Inosin ebenfalls sehr effektiv zu Adenin- und zu Guaninnukleotiden um: 65 % des exogenen Inosins werden dabei zu AMP und nur 26 % zu GMP (Johnson et al., 1980 c). Der Umbau von exogenem Inosin über IMP und XMP zu GMP wird in den *Nereis*-Keimzellen möglicherweise nur dann im verstärkten Maße beschritten (siehe junge Oozyten und reife Spermien) wenn die Zellen bereits über genug AMP verfügen. Der AMP-Gehalt einer Zelle unterliegt einer stringenten Kontrolle, da überschüssiges AMP unter ATP-Verbrauch sofort zu ADP konvertiert wird. Außerdem aktivieren zu hohe AMP-Gehalte ein Schlüsselenzym der Glykolyse, die Phosphofruktokinase wodurch die Glykolysegeschwindigkeit beeinflusst würde.

Bei *Nereis virens* wurde **aufgenommenes**, exogenes Inosin nur im Stoffwechsel schnell wachsender Oozyten (140 μm \varnothing) über IMP und GMP auch zu Guanosin konvertiert; dabei wurden weniger als 5 % des Inosins umgesetzt. Im Stoffwechsel männlicher Keimzellen wurde exogenes Inosin ebenfalls nur bei stark proliferierenden Spermatogonien II zu immerhin 13 % zu Guanosin konvertiert. Wieso die intrazelluläre Interkonversion des exogenen Inosins zu Guanosin auf bestimmte Keimzellstadien beschränkt ist kann nicht beantwortet werden. Der Abbau des aus **exogenem Inosin** entstandenen GMP zu Guanosin deutet jedoch darauf hin, dass *Nereis*-Keimzellen beiderlei Geschlechts über eine 5'-Nukleotidase zu verfügen (siehe **Abb. 66**). 5'-Nukleotidasen kommen in einer ganzen Reihe von Säugergeweben vor wurden aber z.B. auch in *Artemia*, bei *Saccharomyces* und in den Larven von *Drosophila* nachgewiesen (Zimmermann, 1992; Burridge et al, 1977; Johnson et al, 1980 c).

3.4.4.2 Exogenes Guanosin im Nukleotidstoffwechsel der Keimzellen

Exogenes Guanosin wurde in Keimzellen beiderlei Geschlechts zu Guaninnukleotiden umgesetzt, was, wie bereits erwähnt, auf die Aktivität einer Inosin-/Guanosinkinase hindeutet. Die Fähigkeit der Keimzellen beiderlei Geschlechts, Guanosin auch zu Adeninnukleotiden bzw. zu Inosin zu konvertieren, impliziert außerdem, dass eine GMP-Reduktase in den Keimzellen aktiv sein muss welche die Umsetzung des aus exogenem Guanosin entstandenen GMP zu IMP ermöglicht. Ausgehend von dem aus exogenem Guanosin entstandenen IMP war es in den Keimzellen beiderlei Geschlechts zur Bildung von Inosin (vermutlich mit Hilfe einer 5'-Nukleotidase) und zur Bildung von Adeninnukleotiden (vermutlich mit Hilfe einer Adenylosuccinat-Synthase) gekommen (siehe **Abb. 66**). Auf diese Weise bauten die Oozyten **aller** Reifungsstadien immerhin 50 -20 % des exogenen Guanosins

zu Inosin um. Die Larve von *Drosophila* konvertiert zum Vergleich lediglich 1 % des exogenen Guanosins zu Inosin (Johnson et al, 1980 b). Vermutlich ist die für die Umsetzung von IMP zu Inosin verantwortliche 5'-Nukleotidase immer dann besonders aktiv, wenn die Zelle in Situationen kommt die zu einer geringen Energy Charge führen, dh wenn sie viel leisten muss oder wenn anoxische Bedingungen vorliegen. Das so entstandene Inosin verläßt die Zelle; die Zelle entledigt sich damit sozusagen vorübergehend überschüssiger Nukleoside bis sie sich wieder im „Normalzustand“ befindet (Zimmermann, 1992). Auch bei *Nereis*-Keimzellen konnte gezeigt werden, dass sie zuvor aufgenommenes Inosin auch wieder in das Medium abgeben; somit ist immerhin wahrscheinlich, dass *Nereis*-Keimzellen auch das durch die Interkonversion von Guanosin entstandene Inosin unter bestimmten Bedingungen ausschleusen können.

Mit Umbauraten von 20 - 41 % wurde ein nicht unbeträchtlicher Anteil des aus exogenen Guanosin entstandenen IMP in allen Oozytenstadien auch zu Adeninnukleotiden metabolisiert. Anhand des relativen Ausmaßes mit dem Inosin **und** AMP gebildet wurden kann man berechnen, dass in allen Stadien immer mehr als 40 % des exogenen Guanosins zu IMP umgebaut worden sind; dies läßt wiederum auf eine sehr aktive GMP-Reduktase in den Oozyten schließen. Bei Bakterien weiß man, dass das Zusammenwirken von GMP-Reduktase einerseits und von IMP-Dehydrogenase und GMP-Synthase andererseits den GMP bzw. IMP-Gehalt der Zelle kontrolliert. Die GMP-Reduktase ist vor allem dann sehr aktiv wenn eine Zelle zuviel GMP und zuwenig AMP besitzt (Hove-Jensen, et al., 1989).

Bei den männlichen Keimzellen konvertierten nur die Spg II **exogenes Guanosin** über IMP zu etwa 6 % zu Inosin. Dagegen konvertierten alle männlichen Keimzellstadien exogenes Guanosin über IMP zu Adeninnukleotiden; die Umbauraten lagen dabei außer in Spg I immer unter 0.4 %. Aus dem Umbau von exogenem Guanosin zu Inosin und zu Adeninnukleotiden kann man berechnen, dass in allen Stadien oft deutlich weniger als etwa 6 % des exogenen Guanosin zu IMP umgebaut worden sind. Dies weist darauf hin, dass die GMP-Reduktase in männlichen Keimzellen aller Stadien, im Gegensatz zu den Oozyten, nur wenig aktiv ist. Die geringe Aktivität der GMP-Reduktase erklärt möglicherweise auch warum exogenes, metabolisiertes Guanosin zu 60 % und mehr als Guaninnukleotid in männlichen Keimzellen fast aller Stadien verblieben ist.

3.4.4.3 Exogenes Inosin bzw. Guanosin im Nukleinsäurestoffwechsel der Keimzellen

Mit Hilfe der Inkubationsexperimente konnte außerdem klar gezeigt werden, dass die aus exogenen Nukleosiden gebildeten Adenin- bzw. Guaninnukleotide den *Nereis*-Keimzellen beiderlei Geschlechts auch zur Synthese von Nukleinsäuren gedient haben (siehe **Abb. 66**). Das Ausmaß mit dem exogene Nukleoside in die Adenin- bzw. Guaninbausteine der Nukleinsäuren eingebaut wurden hing deutlich vom Reifungsstadium der Keimzellen beiderlei Geschlechts ab. Außerdem zeigten sich bei der Verwendung der aus exogener Nukleoside entstandenen Nukleotide für die Nukleinsäuresynthese bemerkenswerte Unterschiede: In den Oozyten fast aller untersuchten Reifungsstadien wurden die aus **exogenem Inosin bzw. Guanosin** gebildeten **Guaninnukleotide** sowohl für die DNA- als auch für die RNA-Synthese verwendet. Nur die aus **exogenem Inosin** entstandene **Adeninnukleotide** wurden in die Adeninbausteine von DNA **und** RNA der Oozyten eingebaut; das relative Ausmaß dieses Einbaues war allerdings in allen Stadien mit maximal 3.5 % vergleichsweise gering. Dagegen wurden die aus **exogenem Guanosin** entstandene **Adeninnukleotide** erstaunlicherweise in die DNA und in das Lipid nicht aber in die RNA der Oozyten eingebaut. Unter der Annahme,

dass sich alle Metabolite des Purinstoffwechsels im selben intrazellulären Pool befinden, muss es verwundern, dass die aus exogenem Guanotin gebildeten Adeninnukleotide zwar in die DNA und in das Lipid, nicht aber in die RNA gelangt sind. Nach Hauschka (1973) deutet die bevorzugte Verwendung einer Substanz für einen bestimmten Reaktionsweg darauf hin, dass sie in irgendeiner Art und Weise getrennt von den anderen Substanzen in der Zelle vorliegt. In der Literatur wird teilweise sehr kontrovers diskutiert, ob eine solche Trennung durch membranbegrenzte Zellorganellen, durch die Bindung an Enzymkomplexe oder gar durch Diffusionsgradienten bedingt ist. Vielleicht handelt es sich auch nur um eine scheinbare Kompartimentierung, die durch unterschiedliche Turnoverraten der Intermediärprodukte bedingt ist (siehe dazu Sies, 1982; Traut, 1994). Nguyen et al (1986) vermuten, dass aufgenommenes Guanotin am intrazellulären dGTP-Pool von Lymphoma-Zellen sozusagen vorbeigeleitet wird. In diesem und in einer Reihe weiterer Beispiele nehmen die Autoren an, dass solch ein Trenneffekt durch einen Multienzymkomplex bedingt ist. Solche Komplexe könnten Nukleotid-Kinasen, Ribonukleotid-Reduktasen und DNA-Polymerasen neben weiteren Enzymen in sich vereinigen. Die aus den Nukleotid-Vorstufen entstandenen Zwischenprodukte würden in diesem Komplex von Enzym zu Enzym weitergereicht ohne dass sie mit ihren jeweiligen, intrazellulären Pools äquilibrieren können. Nach Untersuchungen bei Prokaryonten gibt es wohl deutliche Hinweise darauf, dass die Enzyme der Desoxynukleotidsynthese tatsächlich einen Multienzymkomplex darstellen der zu einer funktionellen Kompartimentierung der Zwischenprodukte führt (Bestwick, 1982). Es gibt zwar auch in Eukaryonten Multienzymkomplexe, wie z.B. die Fettsäure-Synthase, für den Nukleotidstoffwechsel von Eukaryonten konnte ein schlüssiger Beweis für die Existenz eines solchen Enzymkomplexes allerdings noch nicht erbracht werden.

In fast allen untersuchten Reifungsstadien männlicher Keimzellen wurden die aus **exogenem Inosin bzw. Guanotin** gebildeten **Guaninnukleotide**, wie in den Oozyten, sowohl für die DNA- als auch für die RNA-Synthese verwendet. Das Ausmaß des Einbaus war ebenfalls vom Reifungsstadium abhängig: Sehr teilungsaktive Spg II bauten nur 3 % des **exogenen Inosins** dafür aber immerhin 64 % **exogenes Guanotin** als Guanotinbaustein in die DNA ein. Erstaunlicherweise bauten fast reife Spermien sogar 33 % exogenes Inosin in die Guanotinbausteine der RNA ein.

Die aus **exogenem Inosin** entstandenen **Adeninnukleotide** wurden dagegen von den männlichen Keimzellen in geringem Maße nur in die DNA und nie in die RNA eingebaut und das obwohl exogenes Inosin in allen Reifungsstadien, mit Ausnahme reifer Spermien, zu weit mehr als 60 % zu Adeninnukleotiden umgebaut worden ist. Es bleibt unklar wieso die aus exogenem Inosin bzw. Guanotin entstandenen Adeninnukleotide kaum bzw. gar nicht in die Nukleinsäuren, dafür aber fast immer in die Lipide männlicher Keimzellen eingebaut wurden und das, obwohl nachweislich alle männlichen Reifungsstadien Nukleinsäuren synthetisieren, also einen ständigen Bedarf an Adenosinbausteinen haben. Da die Syntheserate für Nukleinsäuren in den *Nereis*-Keimzellen vergleichsweise gering ist, reicht möglicherweise die Inkubationszeit von 48 h nicht aus, um die Adeninbausteine der Nukleinsäuren nachweisbar zu markieren. Es ist auch möglich, dass männliche Keimzellen ihren Bedarf an **Adeninbausteinen** für die Nukleinsäuresynthese aus anderen Quellen, dh durch *de novo* Synthese, rekrutieren. Es könnte sein, dass es für die aus exogenem und die auf einem anderen endogenen Weg entstandenen Adeninnukleotide zwei verschiedene, irgendwie voneinander getrennte intrazelluläre Pools gibt. Plagemann (1972) vermutet bei Hepatoma Zellen der Ratte, dass es für die Ribonukleotide zwei getrennte Pools im Cytoplasma und im Zellkern gibt. Die aus exogenen Nukleosiden entstandenen Nukleotide verbleiben demnach

zum größten Teil im Cytoplasma und haben keinen, oder nur sehr eingeschränkten Zugang zum Zellkern (dh dem Ort der Nukleinsäuresynthese). Dies könnte vielleicht erklären warum nach 48 h Inkubation mit ^{14}C -Guanosin in den männlichen *Nereis*-Keimzellen fast nur das vornehmlich im Cytoplasma synthetisierte Lipid, nicht aber die RNA radioaktiv markiert ist. Dieser Theorie ist entgegenzuhalten, dass die Poren der Kernhülle aufgrund ihrer Größe (10 nm) gar keine effektive Barriere für kleine Metabolite wie Nukleotide darstellen. Eine Kompartimentierung von Nukleotiden zwischen Cytoplasma und Zellkern wurde, vielleicht aus diesem Grund, noch nie sicher nachgewiesen (Traut, 1994).

Aus **exogenem Guanosin** entstandene **Adeninukleotide** wurde sogar überhaupt nicht für die Nukleinsäuresynthese, dafür aber im geringen Maße für die Lipidsynthese verwendet. Bei *Drosophila*-Larven und in den Ovarien von *Musca domestica* wurden auch nur die aus exogenem Inosin, nicht aber die aus exogenem Guanosin entstandenen Adeninukleotide in die Nukleinsäuren eingebaut (Johnson et al, 1980 b; Johnson et al, 1980 c; Miller et al., 1973). Bei *Musca* schloßen die Autoren daraus, dass die GMP-Reduktase in den Ovarien von *Musca* nicht aktiv ist. Wie gezeigt werden konnte, ist die GMP-Reduktase männlicher *Nereis*-Keimzellen ebenfalls viel weniger aktiv als die der Oozyten. Dass die aus exogenen Guanosin entstandenen Adeninbausteine nicht in die Nukleinsäuren männlicher *Nereis*-Keimzellen gelangt sind könnte also zumindest teilweise durch die geringe Aktivität der GMP-Reduktase männlicher Keimzellen erklärt werden.

3.4.4.4 Exogene Nukleoside im Lipid- bzw. Proteinstoffwechsel der Keimzellen

Wie bereits erwähnt, war in **allen** untersuchten Reifungsstadien von Keimzellen beiderlei Geschlechts nach der Inkubation mit ^{14}C -Inosin bzw. ^{14}C -Guanosin auch die Lipidfraktion radioaktiv markiert. Das relative Ausmaß mit dem die exogenen Purine in das Lipid gelangt waren, hatte bei schnell wachsenden *Nereis*-Oozyten (140 μm \varnothing) dramatisch zugenommen; exogenes Guanosin wurde bei fast reifen Oozyten sogar zu 40 % in das Lipid eingebaut. Dies kann als ein Indiz dafür angesehen werden, dass die Lipidsynthese oder der Lipid-turnover mit dem Eintritt der *Nereis*-Oozyten in die schnelle Wachstumsphase enorm gesteigert wird. Bei den männlichen Keimzellen bauten dagegen vor allem die fast reifen Spermien verstärkt exogene Nukleoside in das Lipid ein. Wie die markierten Nukleoside in das Lipid der Keimzellen gelangt sind, wurde zwar nicht untersucht, es kann aber vermutet werden, dass sie auf dem oben beschriebenen Salvage Weg zur Synthese des Coenzym A (CoA) beigetragen haben. CoA spielt eine wichtige Rolle für die Fettsäuresynthese, aber auch für den Abbau und den Umbau der Fettsäuren (siehe Stryer, 1988). Dem Fettsäureumbau (Elongation, Verkürzung und Desaturierung etc), aber auch dem Einbau der Fettsäuren in komplexe Lipide muss die Aktivierung der Fettsäuren durch CoA vorausgehen. Die Bindung langkettiger Fettsäuren an CoA und deren Einbau in Phospholipide oder Triacylglyceride findet bei Wirbeltieren und wahrscheinlich auch bei Wirbellosen vor allem im Cytoplasma statt (Urich, 1990). Lipide haben bekanntermaßen eine wichtige physiologische Bedeutung für marine Invertebraten: Es konnte gezeigt werden, dass marine Tiere im Vergleich zu den meisten landlebenden Tieren stärker auf Lipide und weniger auf Kohlenhydrate angewiesen sind (Cowey et al. 1972 und Holland, 1978 zitiert in Luis et al., 1995). Oozyten von *Nereis diversicolor* bestehen zu 30 % ihres Trockengewichtes aus Lipiden (Dales, 1957). Pocock (1971) untersuchte Lipide in der Cölomflüssigkeit, in der Körperwand, im Darm, und in den Keimzellen von *Nereis virens*. *Nereis*-Oozyten enthielten demnach vor allem große Mengen an Triacylglyceriden aber auch ungewöhnlich hohe Konzentrationen neutraler Plasmalogene und Etherglyceride. Die

Konzentrationen dieser Lipide waren in den *Nereis*-Oozyten weitaus höher als in den anderen untersuchten *Nereis*-Gewebe. Vor allem in den größeren Oozyten von *Urechis caupo* konnten große Mengen Lipide nachgewiesen werden. Lipide stellen wahrscheinlich neben den Kohlenhydraten (Glykogen) und dem Dotterprotein eine der wichtigsten Energiequellen für die frühen Entwicklungsprozesse der sich teilenden Eizelle dar (Pocock, 1971; Miller und Epel, 1973; Dworkin, 1991). Lipide sind hierfür besonders geeignet, da sie im Gegensatz zu Kohlenhydraten einen hochkonzentrierten, wasserfreien Energiespeicher mit hohem Brennwert darstellen. Sie haben eine etwas geringere Dichte als Triglyceride und verleihen den *Nereis*-Oozyten möglicherweise einen besseren Auftrieb im Wasser (Pocock, 1971).

Spermien mariner Invertebraten beginnen mit Geißelbewegungen sobald sie in das Meerwasser entlassen werden; die durch Dynein-ATPase katalysierte Geißelbewegung verbraucht ATP. Da die Spermien im Meerwasser so gut wie keine Substrate finden, die sie zur Energieerzeugung nutzen können sind sie auf ihren Vorrat an endogenen Substraten angewiesen. In den Spermien von *Balanus balanus*, von *Nereis virens* und verschiedener Seeigelarten konnten vor allem hohe Konzentrationen von Phospholipiden (Phosphatidylcholin; Phosphatidyl-Ethanolamin) nachgewiesen werden (Pocock, 1971; Mita et al, 1994). Phospholipide sind das Hauptlipid der Zellmembranen können jedoch auch als lösliche Transportform in den Zellen vorliegen (Urich, 1990). Triglyceride und Etherglyceride waren in *Nereis*-Spermien dagegen nicht nachweisbar (Pocock, 1971). Bei Spermien verschiedener Seeigelarten konnte gezeigt werden, dass sie endogenes Phosphatidylcholin oder Triglycerid, aber kaum Kohlenhydrate als Substrat des Energiestoffwechsels nutzen (Mita et al, 1994). Säugerspermien oxidieren dagegen vorwiegend Kohlenhydrate, die sie aus der Samenflüssigkeit aufnehmen; unter bestimmten Bedingungen können sie aber auch Phospholipide oxidieren (Mita et al, 1994; Kamp, 1996).

Nach Inkubation mit radioaktiv markierten Nucleosiden war in den *Nereis*-Oozyten, nicht aber in den männlichen Keimzellen, auch die Proteinfraction markiert. Der Einbau in das Protein fand nur bei schnell wachsenden bzw. bei ausgewachsenen Oozyten statt und war mit maximal 1.4 % vergleichsweise gering. In welcher Form die exogenen Nucleoside in die Proteine gelangten ist nicht untersucht worden. Möglicherweise besteht eine Verbindung zur Synthese bzw. zur Modifikation von Lipoproteinen, die als Speicher- oder Transportprotein in den Oozyten vorliegen.

3.4.4.5 Purinstoffwechsel verschiedener Zellen im Vergleich:

In der **Tabelle 11** sind die Eigenschaften des Purinstoffwechsels bei verschiedenen Tierarten einander gegenübergestellt. Man sieht, dass alle aufgeführten Zellen einschließlich der Keimzellen von *Nereis virens* exogene Purine auf dem **Salvage Weg** verwerten können. Die aus exogenen Nucleosiden entstandenen Nucleotide werden außerdem von diesen Zellen für die Nucleinsäuresynthese verwendet. Einige der hier aufgeführten Zellen sind zur *de novo* Synthese von Nucleotiden fähig, andere, wie z.B. die parasitischen Protozoen *Babesia bovis* und *Giardia lamblia* dagegen grundsätzlich nicht. Es kann aufgrund der hier vorgestellten Befunde nicht sicher gesagt werden, ob *Nereis*-Keimzellen auch zur *de novo*-Synthese fähig sind. Auf die Existenz typischer Enzyme des Purinstoffwechsels wurde entweder, wie in dieser Arbeit, anhand der Stoffwechselprodukte indirekt geschlossen, oder die Aktivität der Enzyme wurde von den Autoren direkt gemessen. Eine GMP-Reduktase ist demnach z.B. nicht in allen

Zellen vorhanden; wie bereits beschrieben können solche Zellen Guanosin nicht zu Adeninnukleotiden interkonvertieren.

Zellart	<i>de novo</i> Purin-synthese	salvage Weg	Purin-abbau	GMP-Reduktase	Einbau exogener Purine in RNA+ DNA	Literatur
<i>Salmo g.</i> (Testes)	-	+	?	-	+	Tarr et al., 1966
<i>Drosophila</i> (Larve)	+	+	+	+	+	Johnson et al., 1980 a - - c
<i>Musca d.</i> (Ovar)	+	+	-	-	+	Miller & Collins, 1973
<i>Oncopeltus f.</i> (Eier)	?	+	?	?	?	Forest et al., 1967
<i>Nereis</i> Keimzellen	+?	+	-	+	+	Geier
<i>Artemia</i> (Larven)	+	+	?	+	+	Liras et al., 1992; Rotllan et al., 1993
<i>Babesia bovis</i>	-	+	?	?	+	Matias et al., 1990
<i>Giardia lamblia</i>	-	+	?	-	+	Baum et al., 1989
<i>Saccharomyces c.</i>	+	+	+	+	+	Burridge et al., 1977

Tabelle 11: Vergleich einiger typischer Parameter des Purinstoffwechsels bei *Nereis*-Keimzellen mit denen anderer Zellarten. (+) Enzym bzw. Stoffwechselweg nachgewiesen; (-) Enzym bzw. Stoffwechselweg nicht aktiv bzw. nicht vorhanden; (?) nicht untersucht.

Ein wenn auch geringer Abbau aufgenommener Purine, wie z.B. in *Drosophila* Larven und in *Artemia*, deutet darauf hin, dass diese Organismen über Nukleosidphosphorylasen verfügen. *Nereis*-Keimzellen **katabolisieren** aufgenommene Nukleoside dagegen nicht.

Schlußfolgerungen (Purinstoffwechsel)

- ⇒ Die Untersuchungen haben gezeigt, dass Oozyten von *Nereis virens* zur Autosynthese von Nucleinsäuren fähig sind.
- ⇒ Der Einbau exogener Nucleoside in die Nucleotide, Nucleinsäuren, Lipid und in das Protein ist vom Reifungsstadium der Keimzellen abhängig: Vor allem junge und schnell wachsende Oozyten sowie stark proliferierende Spermatogonien synthetisieren verstärkt Nucleinsäuren.
- ⇒ Bei den Oozyten fiel auf, dass den Phasen verstärkter Nucleinsäuresynthese immer auch eine Phase der verstärkten Nucleosidaufnahme vorausgegangen war - dies deutet darauf hin, dass die Keimzellen ganz gezielt exogene Nucleoside aufnehmen und bevorraten, um sie später für die Synthese von Nucleinsäuren zu nutzen.
- ⇒ Für viele Reifungsstadien von *Nereis*-Keimzellen beiderlei Geschlechts konnte gezeigt werden, dass freie Nucleoside bzw. Nucleotide einem beständigem turnover unterliegen und, dass dieser turnover, unter den gegebenen Bedingungen, innerhalb relativ kurzer Zeit im Gleichgewicht war.
- ⇒ Der überwiegende Teil der aufgenommenen Nucleoside wurde in den Keimzellen **nicht** sofort metabolisiert. Der restliche Teil der metabolisierten Nucleoside wurde in allen Reifungsstadien zu **100 %** anabolisiert; dies deutet darauf hin, dass die Nucleosid-Phosphorylase in den Keimzellen nicht aktiv ist.
- ⇒ *Nereis*-Keimzellen bauen exogene Nucleoside auf dem **Salvage-Weg** zu Nucleotiden um, was energetisch günstig sein dürfte.
- ⇒ In einigen Fällen konnte gezeigt werden, dass nur ein Teil der Purine in den Keimzellen exogener Herkunft war, der andere Teil muss endogen entstanden sein. Unter anderem deshalb ist zu vermuten, dass *Nereis*-Keimzellen Purine nach Bedarf auch *de novo* synthetisieren, wenngleich ein eindeutiger Beweis dafür noch aussteht.
- ⇒ Anhand der Stoffwechselprodukte konnte indirekt auf die Existenz typischer Enzyme des Purinstoffwechsels geschlossen werden: Besonders interessant ist hierbei, dass Keimzellen beiderlei Geschlechts sehr wahrscheinlich über eine GMP-Reduktase verfügen und dass diese in Oozyten viel aktiver ist als in männlichen Keimzellen.
- ⇒ Der Befund, dass manchen Vorstufen der Nucleinsäuresynthese offensichtlich nur ganz bestimmte Stoffwechselwege zugänglich sind, ist verwunderlich und könnte auf einer wie immer gearteten Kompartimentierung beruhen.
- ⇒ Der Einbau exogener Nucleoside in das Lipid der Oozyten deutet darauf hin, dass die Lipidsynthese oder der Lipid-turnover bis zum Ende des Oozytenwachstums stark gesteigert wird; dies ist nicht verwunderlich, da Lipide eine der wichtigsten Energiequelle sich entwickelnder Oozyten darstellen.
- ⇒ Nucleoside könnten neben den diskutierten Funktionen im Purinstoffwechsel auch noch weitere Aufgaben erfüllen: So wäre denkbar, dass gespeichertes, freies Inosin befruchteten Oozyten auch als Energiequelle dient (Jarvis, 1980). Es ist außerdem möglich, dass von ablaichenden Tieren in großer Menge in das Seewasser abgegebenes Inosin als Pheromon wirkt (Zeeck, 1996)

Abb. 67 fasst die Befunde zum Stoffwechsel der Purinnukleotide bei Keimzellen von *Nereis virens* nochmals zusammen:

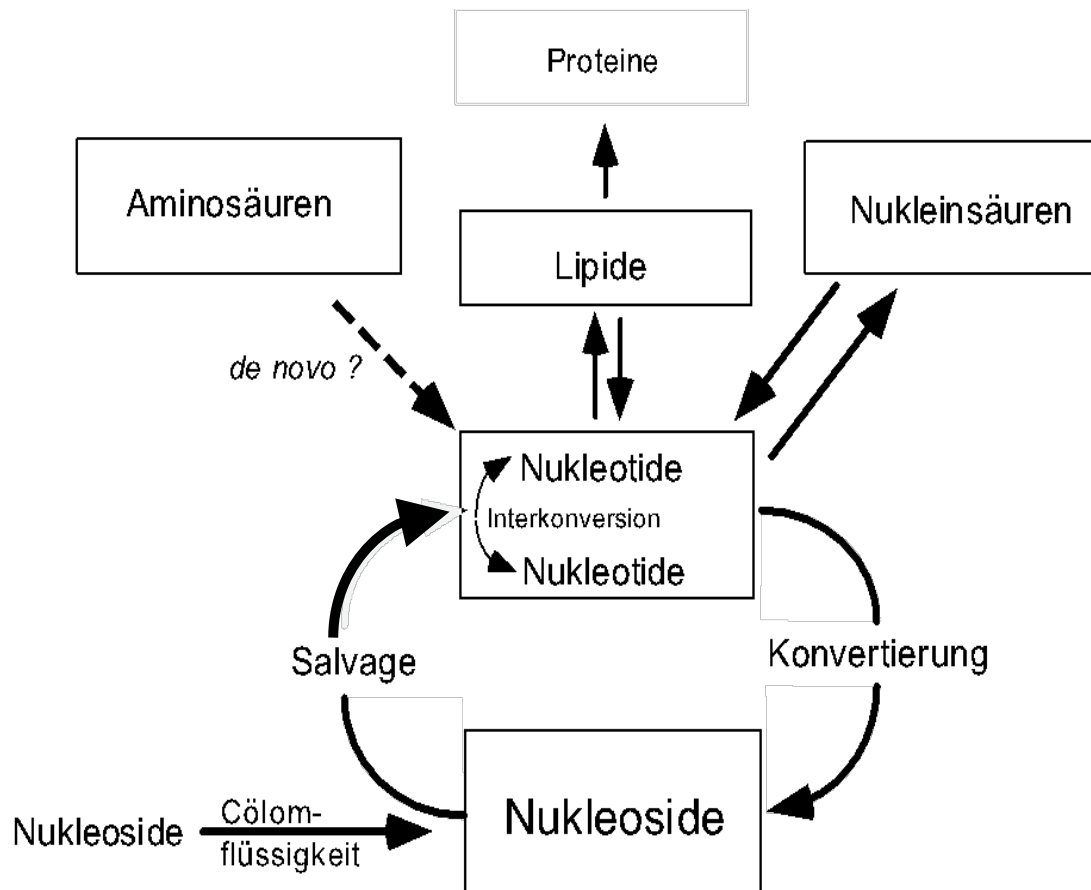


Abb. 67: Aufnahme, Salvage und Interkonversion von Purinnucleosiden in Keimzellen von *Nereis virens*: Elaeozyten bauen gespeicherte Nucleotide zu Nucleosiden ab und/oder synthetisieren Nucleoside *de novo* und geben diese dann in die Cöloflüssigkeit ab wo sie von den Keimzellen aufgenommen und metabolisiert werden. Graphik verändert nach

4 Abkürzungsverzeichnis

ATP, ADP, AMP	Adenosinposphate
CMFSW	Calcium-Magnesium freies Seewasser
DIP	Dinitrophenol
G6PDH	Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase
GTP, GDP, GMP	Guanosinphosphate
HEPES	N 2-Hydroxyethyl Piperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HPLC	High-performance-liquid-chromatography
ITP, IDP, IMP	Inosin-tri-di-monophosphate
JAA	Jodacetamid
JAC	Jodacetat
MEM	Minimal polychaete medium
NADP(H)	Nicotinamid-adenin-diphosphat
NBSS	Natural balanced salt solution
NBTI	Nitrobenzylthioinosin
PCA	Perchlorsäure
PCMB	Perchloromercuribenzoat
PVP	Polyvinylpyrollidon
[S]	Substratkonzentration
Sp_g I, II	Spermatogonienstadien 1. und 2. Ordnung
Sp_z	Spermatozyten
v	Umsatzgeschwindigkeit
ZV	gepacktes Zellvolumen

5 Zusammenfassung der Dissertation von Gunter Geier

Fachbereich Biologie der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

Thema: „Die Bedeutung der Cölomzellen für den Nukleosid- und Nukleotidstoffwechsel der Keimzellen von *Nereis virens* (Annelida, Polychaeta)“

In der vorliegenden Arbeit wurden im Wesentlichen folgende drei Fragen aufgeworfen:

1. Woher kommen die in der Cölomflüssigkeit von *Nereis virens* vorhandenen Nukleoside?
2. Werden diese Nukleoside von den Keimzellen beiderlei Geschlechts aufgenommen und welche Bedeutung haben sie für die Entwicklung der Keimzellen?
3. Werden die aufgenommenen Nukleoside in den Keimzellen verstoffwechselt und wenn ja, auf welchen Wegen?

Die stoffwechselaktiven Elaeozyten sezernieren in Kultur die Nukleoside Inosin, Guanosin, Desoxyinosin und Desoxyguanosin, und zwar in Mengen, die vom Geschlecht und Reifungsstadium abhängen. Keimzellen beiderlei Geschlechts inkorporieren und akkumulieren radioaktiv markiertes Inosin bzw Guanosin, und zwar in Abhängigkeit vom Reifungsstadium der Keimzellen. Eizellen steigern die Aufnahme von Purinnukleosiden beim Eintritt in die schnelle Wachstumsphase überproportional, bei Männchen nehmen die Spermatogonien am meisten auf. Bei den Oozyten ist die konzentrationsabhängige Aufnahme von Purinnukleosiden bis zum Ende der schnellen Wachstumsphase meist sättigbar. Unterschiedliche Spermatogonienstadien zeigten dagegen vielfach eine sättigbare Aufnahme die bei höheren Konzentrationen in ein nicht-sättigbares Aufnahmeverhalten überging. Die apparenten K_m -Werte für die Inosinaufnahme durch Oozyten streuen wenig und bleiben im Verlauf des Oozytenwachstums weitgehend konstant; das verantwortliche Transportsystem bleibt also anscheinend gleich.

Aus der Kenntnis der Aufnahmekinetiken wird klar, dass die Konzentration an Inosin in der Cölomflüssigkeit oft nicht ausreicht, um das Aufnahmesystem der Oozyten zur Hälfte abzusättigen. Bei Männchen war zumindest das Inosinangebot meist hoch genug, um das Aufnahmesystem zur Hälfte oder sogar darüber hinaus abzusättigen.

Die Vorbehandlung der Keimzellen mit verschiedenen Transportinhibitoren ergab folgendes: Bei Oozyten und bei Spermatogonien wird Inosin bzw. Guanosin im Bereich physiologischer Substratkonzentrationen überwiegend durch ein **sättigbares, ATP-abhängiges** System aufgenommen, wobei es sich wahrscheinlich um **erleichterte Diffusion** handelt. Ein geringer Teil der Nukleoside gelangt durch **nicht-sättigbare, ATP-unabhängige** Aufnahme in die Keimzellen; dabei handelt es sich sehr wahrscheinlich um **einfache Diffusion**.

Die aufgenommenen Nukleoside werden dem **Salvage-Weg** zugeführt und zur Synthese von Adenin- und Guaninukleotiden genutzt. Diese Nukleotide werden von Keimzellen **beiderlei Geschlechts** in die Nukleinsäuren, aber auch in Lipid und in Protein eingebaut: Vor allem junge und schnell wachsende Oozyten sowie Spermatogonien synthetisieren verstärkt Nukleinsäuren. Durch die Verwertung exogener Nukleoside auf dem Salvage-Weg sparen die Keimzellen Energie. In einigen Fällen konnte erschlossen werden, dass nur ein Teil der Purine in den Keimzellen exogener Herkunft ist, der andere Teil muss endogen, d.h. z.B. durch *de novo* Synthese entstanden sein.

Die Befunde haben also gezeigt, dass die Elaeozyten von *Nereis virens* neben weibchenspezifischem Vitellogenin auch Nukleoside sezernieren; diese Nukleoside werden von den Keimzellen **beiderlei Geschlechts** aufgenommen und verwertet. Es müsste geklärt

werden, ob das Nukleosidangebot einen steuernden Einfluß auf das Keimzellwachstums hat, inwieweit die Keimzellen Purinnukleoside *de novo* synthetisieren, und ob diese Synthese im Rahmen des Nukleosidangebots eine wesentliche Rolle beim Aufbau der Keimzellen spielt.

6 Literaturverzeichnis

Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.D., Molecular biology of the cell. Garland Publishing, Inc. New York, sec. edition (1989)

Alcivar A.A.H., Millette L.H., Trasler C.F., Hecht J.M., Mitochondrial gene expression in male germ cells of the mouse. *Dev Biol*, 2 (1989) 263-71

Allen J.M., Nucleic acid and protein synthesis in the developing oocytes of the budding form of the syllid *Autolytus Edwardsi* (Class Polychaeta). *Biol Bull*, 133 (1967) 287-302

Baum K.F.B., Berens R.L., Marr J.J., Harrington J.A. and Spector T., Purine desoxynucleoside salvage in *Giardia lamblia*. *J Biol Chem*, 264 (1989) 21087-90

Berlin R.D., Oliver, J.M., Membrane Transport of Purine and Pyrimidine Bases and Nucleosides in Animal Cells. *Int Rev Cytol*, 42 (1975) 287-336

Bertout M. et al, Development of the nuclear structure and metabolism during oogenesis of *Perinereis Cultrifera* (Annelida, Polychaeta). *Int J Inv Rep*, 3 (1981) 121-132

Bertout M., Syntheses of nucleic acids during spermatogenesis in *Nereis diversicolor* (Annelida, Polychaeta): A quantitative autoradiographic study. *J Exp Zoo*, 226 (1983) 143-149

Bestwick C. K., Unusual compartmentation of precursors for nuclear and mitochondrial DNA in mouse L cells. *J Biol Chem*, 257 (1982) 9305-8

Bisswanger H., Enzymkinetik - Theorie und Methoden. VCH-Verlagsgesellschaft, (1994)

Boven P.J., Chloridegehalte en Watertemperatuur van de Oosterschelde bij Yerseke over de periode 1964 - 1980. Delta Instituut v oor Hydrobiologische Onderzoek, (1981) 69

Brachet J., Biochemistry of development. Pergamon Press, (1960)

Burridge P., Wood R.A., Henderson J.F., Purine metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Can J Biochem*, 55 (1977) 935-941

Che M.O., Ortiz D. F., Arias I. M., Primary structure and functional expression of a cDNA encoding the bile canalicular, purine-specific Na⁺-nucleoside cotransporter. *J Biol Chem*, 270 (1995) 13596-9

Chemes H., The phagocytic function of Sertoli cells: a morphological, biochemical, and endocrinological study of lysosomes and acid phosphatase localization in the rat testis. *Endocrinology*, 118 (1986) 1673-81

8. Literaturverzeichnis

- Cohen A.M.**, Martin D. W., Inosine uptake by cultured fibroblasts from normal and purine nucleoside phosphorylase-deficient humans. *J Biol Chem*, 252 (1977) 4428-4430 Issn: 0021-9258
- Conant A.R.**, Jarvis S.M., Nucleoside influx and efflux in guinea-pig ventricular myocytes - inhibition by analogues of iodoflazine. *Biochem Pharma*, 48 (1994) 873-880
- Cowden R. R.**, Cytochemistry of oogenesis and early embryonic development. *Amer Zool*, 16 (1976) 363-374
- Cowey C.B.**, Sargent J.R., Fish nutrition. *Adv mar Biol*, 10 (1972) 383-492
- Crawford C.R.N.**, Ng C. Y., Noel L. D., Belt J. A., Nucleoside transport in L1210 murine leukemia cells. Evidence for three transporters. *J Biol Chem*, 265 (1990) 9732-9736
- Dales R.P.**, Preliminary observations on the role of the coelomic cells in food storage and transport in certain polychaetes. *J Mar biol Ass*, 36 (1957) 91-110
- Dales R.P.**, The coelomic and peritoneal cell systems of some sabellid polychaetes. *Quart J Microsc*, 102 (1961) 327-436
- Danielli J.F.**, The present position in the field of facilitated diffusion and selective active transport. *Proc Symp Colston Res Soc*, 7 (1954) 1-4
- Das N.K.**, Cytochemical and biochemical analysis of development of *Urchis* oocytes . *Amer Zool*, 16 (1976) 345-362
- Das N.K.**, Alfert M., Cytochemical studies on the concurrent synthesis of DNA and histone in primary spermatocytes of *Urechis caupo*. *Exp Cell Res*, 49 (1968) 51-58
- Davis F.C.**, Wilt F.H., RNA-Synthesis during oogenesis in the Echiuroid worm *Urechis caupo*. *Dev Biol*, 27 (1972) 1-12
- Dawid I. B.**, Brown D., The mitochondrial and ribosomal DNA components of oocytes of *Urechis caupo*. *Dev Biol*, 22 (1970) 1-14
- de Jong-Brink M.** et al, Spermatogenesis and the role of Sertoli cells in the freshwater snail *Biomphalaria glabrata*. *Cell Tiss Res*, 181 (1977) 37-58
- Dhainaut A.**, Etude ultrastructurelle de l'évolution des l'oocytes chez *Nereis pelagica* L. (Annélide, Polychète). *CR Acad Sci Paris*, 262 (1966) 2740-2743
- Dhainaut A.**, Etude en microscopie électronique et par autoradiographie à haute résolution de extrusions nucléaires au cours de l'ovogénèse de *Nereis pelagica* (Annélide polychète). *J Microscopie*, 9 (1970) 99-118
- Dhainaut A.**, Oogenesis in polychaetes. Ultrastructural differentiation and metabolism of nereid oocytes. *Fortschr Zoo*, 29 (1984) 183-206

8. Literaturverzeichnis

- Dhainaut A.**, Taki H., Influence of the cerebral neuroendocrine system on neutral lipid synthesis during oogenesis in *Nereis diversicolor* (Annelida, Polychaeta) I. Action on coelomocytes. *Inv Repr Dev*, 14 (1988) 211-221
- Downs S. M.**, Coleman D.L. and Eppig J.J., Maintenance of Murine Oocyte Meiotic Arrest: Uptake and Metabolism of Hypoxanthine and Adenosine by Cumulus Cell -Enclosed and Denuded Oocytes. *Develop. Biol.*, 117 (1986) 174-183
- Dworkin M.B.**, Dworkin R.E., Carbon metabolism in early amphibian embryos. *TIBS*, 16 (1991) 229-234
- Emanuelsson H.**, Anehus S., Development in vitro of the female germ cells of the polychaete *Opryotrocha labronica*. *J Embr ex Morph*, 85 (1985) 151-161
- Fabiani R.**, Ronquist G., Abundance of guanine, guanosine, inosine and adenosine in human seminal plasma. *Int J Clin Lab Res*, 25 (1995) 47-51
- Fersht A.**, Enzyme structure and mechanism. Freeman and Company (1977)
- Fischer A.**, The structure of symplasmic early oocytes and their enveloping sheat cells in the polychaete *Platynereis dumerilii*. *Cell Tiss Res*, 160 (1975) 327-343
- Fischer, A.** ; Dhainaut, A., The origin of yolk in the oocytes of *Nereis virens* (Annelida, Polychaeta). Electron microscopic and autoradiographic studies by use of unspecific and yolk-specific markers. *Cell Tiss Res*, 240 (1985) 67-76
- Fischer A.** , Hoeger U., Metabolic links between somatic sexual maturation an oogenesis in nereid annelids - a brief review. *Inv Repr Dev*, 23 (1993) 131-138
- Fischer A.**, Dorresteyjn A.W.C and Hoeger U., Metabolism of oocyte construction and the generation of histospecificity in the cleaving egg. Lessons from the nereid annelids. *Int J Dev Biol*, 40 (1996) 421-430
- Foret M.**, Ahlers J., Interconversion and uptake of nucleotides, nucleosides and purine bases by the marine bacterium MB 22. *J Bacteriol*, 150 (1982) 471-482
- Forrest H.S.**, Harris S.E. and Morton L.J., Inosine, guanosine, uric acid, DNA and RNA in developing eggs of the milkweed bug *Oncupeltus fasciatus* (Dallas). *J Insect Phys*, 13 (1967) 359-367
- Franco R.**, Centelles J.J. and Kinne R.K., Further charcterization of adenosine transport in renal brush-border membranes. *Biochim Biophys A*, 1024 (1990) 241-248
- Fuster C.D.**, Farrell D., Stern F.A. and Hecht N.B., RNA Polymerase activity in bovine spermatozoa. *J Cell Biol*, 74 (1977) 698-706

8. Literaturverzeichnis

Gehrke C.W., Kuo K., Chromatography and nucleosides. *J Chromatography*, 188 (1980) 129-147

Geier G., Hoeger U., Nucleosidaufnahme und -sekretion bei Cölomzellen von *Nereis virens* (Annelida, Polychaeta). *Ver. Zoo.Ges.*, 86 (1993) 89

Geier G., Stoffbedarf und Stoffabgabe der Cölomzellen von *Nereis virens* (Annelida, Polychaeta) in Abhängigkeit vom sexuellen Reifungszustand. Diplomarbeit Johannes Gutenberg-Universität Mainz, (1992)

Geier G., Hoeger U., Charakterisierung der Nucleosidaufnahme bei Keimzellen von *Nereis virens* (Annelida, Polychaeta). *Verh dt Zool Ges*, 88 (1995) 100

Geier G., Hoeger U., Nucleoside uptake in male germ cells of the polychaete *Nereis virens*. *J Inv Repr Dev*, 31 (1997) 75-85

Geisbuhler T.P.J., Johnson D. A., Rovetto M. J., Cardiac myocyte guanosine transport and metabolism. *Am J Physiol*, (1987) C645-51

Gerremia R., Boitani C., Conti M., Monesis V., RNA synthesis in spermatocytes and spermatids and preservation of meiotic RNA during spermatogenesis in the mouse. *Cell Differ*, 5 (1977) 343-355

Gillam S., Aline R., Wylie V., Ingles C.J., RNA synthesis and RNA polymerase activities in germ cells of developing rainbow trout testis. *Biochim Biophys A*, 565 (1979) 275-292

Goldberg R.B.G., Geremia R., Bruce W. R., Histone synthesis and replacement during spermatogenesis in the mouse. *Differentiation*, (1977) 167-180

Gould M.C., Schroeder P.C., Studies on the oogenesis in the polychaete annelid *Nereis Grubei kinberg*. I. Some aspects of RNA Synthesis. *Biol Bull*, 136 (1969) 216-225

Hall S.T., Odgers G.A., Gero A.M., Nucleoside transport in *Crithidia luciliae*. *Int J Parasitology*, 23 (1992) 1039-1044

Hammond R., Differential uptake of ³Hguanosine by nucleoside transporter subtypes in Ehrlich ascites tumor cells. *Biochem J*, 287 (1992) 431-436

Hammond R., Effekt of protein phosphorylation on nucleoside transporter function. Homepage Department of Pharmacology and Toxicology UWO (1997)

Hansen B.D., Sleeman H.K. and Peter W. Pappas, Purine base and nucleoside uptake in *Plasmodium berghei* and host erythrocytes. *J Parasitol*, 66 (1980) 205-212

Hanske M., Gametogenese eines monotelischen Anneliden: Untersuchungen zur Gonienherkunft, zum Verlauf und zur Feinstruktur der Spermatogenese bei *Platynereis dumerilii* (Annelida, Polychaeta). Ruhr-Dissertation Universität Bochum, April (1989)

Harbers E., Nucleinsäuren. Georg Thieme Verlag Stuttgart, (1975)

Hauenschild C., Der hormonale Einfluß des Gehirns auf die sexuelle Entwicklung bei dem Polychaeten *Platynereis dumerilii*. Gen Comp Endocrinol, 6 (1966) 26-73

Hauschka P. V., Analysis of nucleotide pools in animal cells. Meth Cell Biol, (1973) 361-463

He Y., Sanderson I. R., Walker W. A., Uptake, transport and metabolism of exogenous nucleosides in intestinal epithelial cell cultures. J Nutrition, 124 (1994) 1942-1949

Heacox A. E., Schroeder P., A light and electron-microscopic investigation of gametogenesis in *Typosyllis pulchra* (Berkeley and Berkeley) (Polychaeta: Syllidae) : II Oogenesis. Cell Tiss Res, 218 (1981) 641-658

Heil P., Die Bereitstellung von Vitellogenin durch die Eleazozyten im Wachstumsverlauf der Oozyten von *Nereis virens*. Dissertation Johannes Gutenberg-Universität Mainz, (1995)

Henderson J.F.Z., Fraser J. H., McCoy, E. E. Verhoef V. Morris A. J., Factors affecting inosinate synthesis and inosine triphosphate accumulation in human erythrocytes. Can J Biochem, 55 (1977) 359-64

Hirose F.H., Hotta Y., Yamaguchi M., Matsukage A., Difference in the expression level of DNA polymerase beta among mouse tissues: high expression in the pachytene spermatocyte. Exp Cell Res, 181 (1989) 169-180

Hochstadt O. J., The regulation of purine utilization in bacteria. IV. Roles of membrane-localized and pericytoplasmatic enzymes in the mechanism of purine nucleoside transport across isolated *Escherichia coli* membranes. J Biol Chem, 247 (1972) 2419-2426

Hoeger U., Hydrolytic enzymes in the coelomic cells of the polychaete *Nereis virens* during sexual maturation. Marine Biol, 110 (1991) 7-12

Hoeger U., Märker C., Nukleotidspeicher und -kompartimentierung in Cölomzellen (Eleazozyten) von *Nereis virens* (Annelida, Polychaeta).. Ver Zoo Ges, 85 (1992) 141

Hoeger U., Geier G., Märker C., Nucleoside release in coelomic cells (eleocytes) of the polychaete *Nereis virens*.. Stud Stoffphys Dt Zoo Ges, 2 (1994)

Hoeger U., Geier G., Beteiligung exogener Nucleoside bei der Entwicklung der Keimzellen von *Nereis virens* (Annelida, Polychaeta). Verh. Zoo. Ges., 87 (1994) 170

Hoeger U., Dunn J.F. and Märker C., Adenylate compartmentation and storage in coelomic cells of the polychaete *Nereis virens*. J Exp Biol, 198 (1995) 2079-2085

Hoeger U., Geier G., Verwertung exogener Nucleoside im Stoffwechsel der Oozyten von *Nereis virens* (Annelida, Polychaeta). Verh dt Zool Ges, 89 (1996) 107

8. Literaturverzeichnis

Hoeger U., Kunz I., Metabolic enzymes in coelomic cells (elaeocytes) of the polychaete *Nereis virens* : sex specific changes during sexual maturation. *Marine Biol*, 115 (1993) 653-660

Hoeger U., Märker C., Geier G., Adenylate storage, metabolism and utilization in coelomic cells of the polychaete *Nereis virens* (Annelida, Polychaeta). *Experientia*, 52 (1996) 481-486

Hoffmeyer J., Neuhard J., Metabolism of exogenous purine bases and nucleosides by *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol*, 106 (1971) 14-24

Holland D.L., Lipid reserves and energy metabolism in the larvae of benthic marine invertebrates. *Biochem biophys Persp mar Biol*, 4 (1978) 85-123

Homa S.T.W., Russell R. K., Phospholipid turnover and ultrastructural correlates during spontaneous germinal vesicle breakdown of the bovine oocyte: effects of a cyclic AMP phosphodiesterase inhibitor. *Dev Biol*, 146 (1991) 461-72

Hove-Jensen B., Nygaard P., Role of Guanosine-Kinase in the Utilization of Guanosine for Nucleotide Synthesis in *E.Coli*. *J Gen Mikrobiol*, 135 (1989) 1263-1273

Huang Q.Q.H., C. M. Paterson, A. R. Cass, C. E. Young, J. D., Functional expression of Na⁺-dependent nucleoside transport systems of rat intestine in isolated oocytes of *Xenopus laevis*. Demonstration that rat jejunum expresses the purine-selective system N1 (cif) and a second, novel system N3 having broad specificity for purine and pyrimidine nucleosides. *J Biol Chem*, 268 (1993) 20613-20619

Jacobs R.L., Miller L.H, Koontz L.C., Labeling of sporozoites of *Plasmodium berghei* with tritiated purines. *J Parasitol*, 60 (1974) 340-343

Jacquez J. A., Transport and enzymic splitting of pyrimidine nucleosides in ehrlich cells. *Biochim Bio Act*, 61 (1962) 265-277

Jarvis S.M., Young J.D., Ansay M., Archibald A.L., Harkness R.A. and Simmonds R.J., Is Inosine the physiological energy source of pig erythrocytes ?. *Biochim Biophys A*, 597 (1980) 183-188

John P., Zell- und Gewebekulturen. de Gruyter Berlin NY, (1980)

Johnson M., Nash D. and Henderson J.F., Metabolism of Adenosine in Larvae of *Drosophila Melanogaster*. *C Biochem Phys*, 66 (1980 a) 549-553

Johnson M., Nash D. and Henderson J.F., Metabolism of guanine and guanosine in larvae of *Drosophila Melanogaster*. *C Biochem Phys*, 66 (1980 b) 563-567

Johnson M., Nash D. and Henderson J.F., Purine metabolism in larvae of *Drosophila Melanogaster* fed radioactive hypoxanthine, inosine or formate. *C Biochem Phys*, 66 (1980 c) 555-561

Kalt M.R., Morphology and kinetics of spermatogenesis in *Xenopus laevis*. *J Exp Zool*, 195 (1976) 393-407

Kamp G., Büsselmann, G., Lauterwein J., Spermatozoa: models for studying regulatory aspects of energy metabolism. *Experientia*, 52 (1996) 487-494

Kessel D., Shurin S. G., Transport of two non-metabolized nucleosides, deoxycytidine and cytosine arabinoside, in a sub-line of the L210 murine leukemia. *Biochim Biophys Acta*, 163 (1968) 179-187

Kleene K.C.D., R. J. Hecht, N. B., cDNA clones encoding cytoplasmic poly(A)+ RNAs which first appear at detectable levels in haploid phases of spermatogenesis in the mouse. *Dev Biol*, 2 (1983) 455-64

Knippers R., Molekulare Genetik. Georg Thieme Verlag Stuttgart 6. Auflage (1995)

Köhler S., Der Verlauf der Spermatogenese bei Nereiden: Licht - und Elektronenmikroskopische Einteilung der Spermatogenese in vivo und in vitro. Dissertation Johannes Gutenberg-Universität Mainz, (1985)

Kornberg A., Pathways of enzymatic synthesis of nucleotides and polynucleotides. Johns Hopkins Press, (1957) 579-608

Kornblatt M.J., Synthesis and turnover of sulfogalactoglycerolipid, a membrane lipid, during spermatogenesis. *Can J Biochem*, (1977) 255-258

Kramer G., Wiegers U. and Hilz H., mRNA turnover studies applying labeled uridine require an evaluation of specific radioactivities of UTP and RNA-U. *Biochem Biophys Res Com*, 55 (1973) 273-281

Lamb D.J., Shubhada S., Baker K. and Lee S.K., Sertoli cell conditioned medium affects nucleoside utilization in vitro. *J Andrology*, 15 (1994) 117-124

Lang D., Racker E., Effects of quercetin and f1 inhibitor on mitochondrial ATase and energy reactions in submitochondrial particulates. *Biochim Biophys A*, 333 (1974) 180-186

Lassen U.V., Overgaard H.K., *Biochim Biophys Acta*, 57 (1962) 111

LC GC International, The Magazine of Separation Science. Advanstar.com.

Lee Y. R., Whiteley A. H., Gene transcription during oogenesis of *Schizobranhia insignis*, a tubicolous polychaete. *Fortschr Zoo*, 29 (1984) 167-182

Liras A., Rotllan P. and Llorente P., De novo purine biosynthesis in the crustacean *Artemia* : influence of salinity and geographical origin. *J Comp Physiol*, 162 (1992) 263-266

Luis O., Passos A.M., Seasonal changes in lipid content and composition of the polychaete *Nereis (Hediste) divesicolor*. *Comp Biochem Physiol B*, 111 B (1995) 579-586

8. Literaturverzeichnis

MacInnis A.J., Fisher F.M and Read C.P., Membrane transport of purines and pyrimidines in a cestode. *J Parasitol*, 51 (1965) 260

Märker C., Veränderungen im Muster freier Nucleotide der Elaeozyten von *Nereis virens* (Annelida, Polychaeta) im Verlauf der Geschlechtsreifung. Diplomarbeit, Johannes Gutenberg-Universität Mainz (1992)

Mahlein F., Die Aufnahme freier Aminosäuren bei Oozyten von *Nereis virens* (Annelida, Polychaeta). *Ver Zoo Ges*, 86 (1993) 99

Mahlein F., Aufnahme, Transport und Nutzung von freien Aminosäuren in wachsenden Oozyten von *Nereis virens*. Dissertation Johannes Gutenberg-Universität Mainz, (1996)

Mann T., *Biology of Semen and the male reproduction tract*. Methuen & Co LTD, (1964)

Matias C., Nott S.E., Bagnara A.S., O'Sullivan W.J. and Gero A.M., Purine salvage and metabolism in *Babesia bovis*. *Parasitol Res*, 76 (1990) 207-213

Meisel J., Zur Hormonabhängigkeit der Spermatogenese bei *Platynereis dumerilii*: Licht- und elektronenmikroskopische Befunde sowie experimentelle Untersuchungen in vivo und in vitro.. Dissertation Ruhr-Universität Bochum, (1990)

Meistrich M.L., Reid B.O. and Barcellona W.J., Meiotic DNA synthesis during mouse spermatogenesis. *J Cell Biol*, 64 (1975) 211-222

Mercader J.G., M. Dalsanto, B. Casado, F. J. Felipe, A. Pastoranglada, M., Nucleoside uptake in rat liver parenchymal cells. *Biochem J*, 317 (1996) 835-842

Meyer V. R., *Practical High-Performance Liquid Chromatography*. John Wiley & Sons Ltd., (1988)

Meyer V.R., *Fallstricke und Fehlerquellen der HPLC in Bildern*. Hüthig Verlag Heidelberg, (1996)

Miller J.H., Epel D., Studies of Oogenesis in *Urechis caupo* II. Accumulation during Oogenesis of Carbohydrate, RNA, Microtubule Protein, and Soluble, Mitochondrial, and Lysosomal Enzymes. *Dev Biol*, 32 (1973) 331-344

Miller S., Collins J., Metabolic purine pathways in the developing ovary of the housefly *Musca domestica*. *C Biochem Phys*, 44 (1973) 1153-1163

Mita M., Oguchi A., Kikuyama S., Yasumasu I, De Santis R. and Nakamura M., Endogenous substrates for energy metabolism in spermatozoa of the sea urchins *Arbacia lixula* and *Paracentrotus lividus*. *Biol Bull*, 186 (1994) 285-290

Mizel S.B. and Wilson L., Nucleoside transport in mammalian cells - Inhibition by colchicine., *Biochemistry*, 11 (1972) 2573 - 2578

8. Literaturverzeichnis

Monesi V., Ribonucleic acid synthesis during mitosis and meiosis in the mouse testis. *J Cell Biol*, 22 (1964) 521-532

Mori H., Iida A., Teshiba S., Fujio T., Cloning of a guanosin-inosine kinase gene of *Escherichia coli* and characterization of the purified gene product. *J Bacteriol*, 177 (1995) 4921-4926

Mueckler M., Facilitative Glukose transporter. *Euro J Biochem*, 219 (1994) 713-725

Munch-Petersen A. and Pihl, N.J., Stimulatory effect of low ATP pools on transport of purine nucleosides in cells of *E.coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 77 (1980) 2519-2523

Murray A.W., The biological significance of purine salvage. *Ann Rev Biochem*, 40 (1971) 811-826

Nguyen B.T. and Sadee W., Compartmentation of guanine nucleotide precursors for DNA synthesis. *Biochem J*, 234 (1986) 263-269

Nirmal K., Das Elsie, P.S. and Alfert M., Synthetic activities during spermatogenesis in the locust. *J Cell Biol*, 25 (1965) 387-395

Page C.R., MacInnis A.J., Charakterization of nucleoside transport in Hymenolepidid cestodes. *J Parasitol*, 61 (1975) 281-290

Patil SDU, J. D., Sodium dependent nucleoside transport in the human intestinal brush border membrane. *Amer J Physiol*, 35 (1997) G1314-G1320

Piatigorsky J., Tyler A., Radioactive labeling of RNAs of sea urchin eggs during oogenesis. *Biol Bull*, 133 (1967) 229-245

Pickard M.A., Passive diffusion of nucleosides into *Micrococcus sodonensis* membrane vesicles. *Can J Biochem*, 58 (1980) 457-460

Plagemann P. G., Nucleotide pools of novikoff rat hepatoma cells growing in suspension culture I. Kinetics of incorporation of nucleosides into nucleotide pools and pool sizes during growth cycle. *J Cell Phys*, 77 (1971 a) 213-240

Plagemann P. G., Nucleotide pools of novikoff rat hepatoma cells growing in suspension culture II. Independent nucleotide pools for nucleic acid synthesis. *J Cell Phys*, 77 (1971 b) 241-258

Plagemann P. G., Erbe J., Thymidine transport by cultured novikoff hepatoma cells and uptake by simple diffusion and relationship to incorporation into deoxyribonucleic acid. *J Cell Biol*, 55 (1972) 161-178

Plagemann P.G., Richey D.P., Transport of nucleosides, nucleic acid bases, choline and Glukose by animal cells in culture. *Biochim Biophys Acta*, 344 (1974) 263-305

8. Literaturverzeichnis

Plagemann P.G., R. M. Erbe, J., Facilitated transport of inosine and uridine in cultured mammalian cells is independent of nucleoside phosphorylases. *Biochim Biophys Acta*, 640 (1981)

Plagemann P.G., Wohlhueter R. , Woffendin C., Nucleoside and nucleobase transport in animal cells. *Biochem Biophys Acta*, 947 (1988) 405-443

Plagemann P.G., Aran J., Characterization of Na⁺-dependent, active nucleoside transport in rat and mouse peritoneal macrophages, a mouse macrophage cell line and normal rat kidney cells. *Biochim Biophys Acta*, 1028 (1990 a) 289-298

Plagemann P.G., Aran J.M., "Na⁺-dependent, active nucleoside transport in mouse spleen lymphocytes, leukemia cells, fibroblasts and macrophages, but not in equivalent human or pig cells, dipyrindamole enhances nucleoside salvage by cells with both active and facilitated transport". *Biochim Biophys Acta*, 1025 (1990 b) 32-42

Plagemann P.G., Na⁺ dependent, active nucleoside transport in S49 mouse lymphoma cells and loss in AE-1 mutant deficient in facilitated nucleoside transport. *J Cell Biochem*, 46 (1991) 54-59

Pocock D.M.E., Marsden J.R. and Hamilton J.G., Lipids in an intertidal polychaete and their relation to the maturation of the worm. *Comp Biochem Physiol A*, 39 (1971) 683-697

Porchet M., Biochemistry of oocyte differentiation in nereids. *Fortschr. Zoo*, 29 (1984) 207-225

Potter J.E.R., Millette C.F., James M.J. and Kandutsch A.A., Elevated cholesterol and dolichol synthesis in mouse pachytene spermatocytes. *J Biol Chem*, 256 (1981) 7150-7154

Preston R.L., D-Alanine transport and metabolism by the coelomocytes of the bloodworm, *Glycera dibranchiata* (Polychaeta). *Comp Biochem Physiol*, 87 B (1987) 63-71

Rabien H., Bindung und Aufnahme von Dotterprotein durch die Oozyten von *Nereis virens* in vitro. Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz , (1992)

Rawn J.D., Biochemistry. Neil Patterson Publishers (1989).

Rebscher N., Biochemische Veränderungen in den Oozyten von *Nereis virens* (Annelida, Polychaeta) im Verlauf des Wachstums und unter experimentellen Bedingungen. Diplomarbeit, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, (1994)

Rotllan P.L.A., Llorente P., Salvage and interconversion of purines in developing *Artemia*. *Biochim Biophys Acta*, 2 (1993) 128-34

Rotllan P.L.A., Liras A. and Llorente P., A set of procedures for resolving purine compounds by reversed-phase high-performance liquid chromatography : application to the study of purine nucleotide and nucleic acid metabolism. *Anal. Biochem.*, 159 (1986) 377-385

8. Literaturverzeichnis

Rudolph F.B., The biochemistry and physiology of nucleotides. American Institute of Nutrition, (1994)

Sandermann H., Membranbiochemie. Springer-Verlag, (1983)

Schmidt S., Thannhauser S.J., A method for the determination of desoxyribonucleic acid, ribonucleic acid, and phosphoproteins in animal tissues. J Biol Chem, 161 (1945) 83-89

Schneider E.G., Whitten D.J., Uptake and metabolism of nucleosides by embryos of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. Exp Cell Res, 168 (1987) 1-14

Scholtissek C., Studies on the uptake of nucleic acid precursors into cells in tissue culture. Biochim Bio Act, 158 (1968) 435-447

Schwartz M.C., Nucleic acid metabolism in Oocytes and Embryos of *Urechis Caupo*. Dev Biol, 23 (1970) 261-275

Sconzo G., Bono A., Albanese I. and Giudice G., Studies on the sea urchin oocytes II. Synthesis of RNA during Oogenesis. Exp Cell Res, 72 (1972) 95-100

Sies H., Metabolic compartmentation. Academic Press, (1982)

Smith CMH J. F., Relative importance of alternative pathways of purine nucleotide biosynthesis in Ehrlich ascites tumor cells in vivo. Can J Biochem, 54 (1976) 341-9

Schroeder P.C. and Hermans C.O. Reproduction of marine invertebrates. Vol. III Annelids and Echiurans, Edited by Giese A.C. and Pearse J.S., Academic Press Inc., (1975)

Stark G.R., Wahl G.M., Gene amplification. Ann Rev Biochem, 53 (1984) 447-491

Stein W. D., Transport and Diffusion Across Cell Membranes. Academic Press Inc., (1986)

Stern L.G., B. Hecht, N. B., Gene expression during mammalian spermatogenesis. I. Evidence for stage-specific synthesis of polypeptides in vivo. Biol Reprod, 2 (1983) 483-96

Stryer Lubert, Biochemie. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, (1988)

Sweeney M.I., Adenosine release and uptake in cerebellar granule neurons both occur via an equilibrative nucleoside carrier that is modulated by G proteins. J Neurochem, 67 (1996) 81-88

Tarr H.L.A., Roy J., Incorporation of radioactive compounds into the purine and pyrimidine bases and 2-deoxyribose of salmon testes deoxyribonucleic acid. Can J Biochem, 44 (1966) 1435-1446

Taube R.A. and Berlin R.N., Membrane transport of nucleosides in rabbit polymorphonuclear leucocytes. Biochim Biophys Acta, 255 (1972) 6-18

8. Literaturverzeichnis

Tobin T., Sen A., Stability and ligand sensitivity of H³-ouabain binding to (Na⁺ + K⁺)-Atpase. *Biochim Biophys A*, 198 (1970) 120-131

Trautt T. W., Physiological concentrations of purines and pyrimidines. *Mol Cell Biochem*, 140 (1994) 1-22

Tweedell K. S., Oocyte development and incorporation of H³-Thymidine and H³-Uridine in *Pectinaria (Cistenides) Gouldii*. *Biol Bull*, 131 (1966) 517-538

Tyler A., Prolongation of life-span of sea urchin spermatozoa and improvement of spermatozoa and eggs with metalchelation agents. *Biol Bull mar biol Lab*, 104 (1953) 224-239

Urich K., Vergleichende Biochemie der Tiere. Gustav Fischer Verlag, (1990)

Viswanadhan V.N.G., A. K. Weinstein, J. N., Mapping the binding site of the nucleoside transporter protein: a 3D-OSAR study. *Biochim Biophys Acta*, 3 (1990) 356-66

Whittam R., *J Physiol (London)*, 154 (1960) 614

Williams T.C., Jarvis M., Multiple sodium-dependent nucleoside transport systems in bovine renal brush-border membrane vesicles. *Biochem J*, 274 (1991) 27-33

Winter C. G., Christensen H. N., Migration of amino acids across the membrane of the human erythrocyte. *J Biol Chem*, 239 (1964) 872-878

Wohlhueter R.M., Brown, W., Plagemann P.G.W., Kinetic and thermodynamic studies on NBTI-Binding to the nucleoside transporter of chinese hamster ovary cells. *Biochim Biophys A*, 731 (1983) 168-176

Wong P.C.H., Purine ribonucleotide biosynthesis, interconversion and catabolism in mouse brain in vitro. *Biochem J*, 5 (1972) 1085-94

Wu X.G., M. M. Giacomini, K. M., Further characterization of the sodium-dependent nucleoside transporter (N3) in choroid plexus from rabbit. *Biochim Biophys Acta*, (1994) 190-6

Young J.D., Paterson A., Henderson F., Nucleoside transport and metabolism in erythrocytes from the Yucatan miniature pig. Evidence that inosine functions as an in vivo energy substrate. *Biochim Biophys Acta*, 842 (1985) 214-224

Zeeck E., Marine gamete-release pheromones. *Nature*, 382 (1996) 214

Zeidler R.B., Metzler M.H., Moran J.B. and Kim H.D., The liver is an organ site for the release of inosine metabolized by non-glycolytic pig red cells. *Biochim Biophys A*, 838 (1985) 321-328

8. Literaturverzeichnis

Ziegler M., Dubiel W., Pimenov A., Tikhonov Y.V., Toguzov R.T., Henke W. and Gerber G., The catabolism of endogenous adenine nucleotides in rat liver mitochondria. *Mol Cell Biochem*, 93 (1990) 7-12

Zimmermann H., 5'-Nucleotidase : molecular structure and functional aspects. *Biochem J*, 285 (1992) 345-365

Zubay, *Biochemistry*. Macmillian Pub Comp., (1988)

Erklärung

Hiermit bestätige ich, Gunter Geier, dass ich diese Arbeit selbst angefertigt und keine anderen, als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Mainz, November 1997

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Gunter Geier'. The signature is written in a cursive style with a large initial 'G' and a long, sweeping underline.

Liste der Veröffentlichungen

G. Geier, U. Hoeger : Nukleosidaufnahme und -sekretion bei Cölomzellen von *Nereis virens* (Annelida, Polychaeta). Verh. Dt. Zool. Ges. 86,1 : 89 (1993)

U. Hoeger, G. Geier : Beteiligung exogener Nukleoside bei der Entwicklung der Keimzellen von *Nereis virens* (Annelida, Polychaeta). Verh. Dt. Zool. Ges. 87,1 : 190 (1994)

G. Geier, U. Hoeger : Charakterisierung der Nukleosidaufnahme bei Keimzellen von *Nereis virens* (Annelida, Polychaeta). Verh. Dt. Zool. Ges. 88,1 : 100 (1995)

U. Hoeger, C. Märker, G. Geier : Adenylate storage, metabolism and utilization in coelomic cells of the polychaete *Nereis virens* (Annelida, Polychaeta). Experientia 52 : 481 - 486 (1995)

G. Geier, U. Hoeger : Nucleoside uptake in male germ cells of the polychaete *Nereis virens*. Invert Reprod Dev 31, 1-3 : 75 - 85 (1996).

U. Hoeger, G. Geier : Verwertung exogener Nukleoside im Stoffwechsel der Oozyten von *Nereis virens* (Annelida, Polychaeta). Verh. Dt. Zool. Ges. 89,1 : 107 (1996)

U. Hoeger, N.Rebscher, G.Geier: Metabolite supply in oocytes of *Nereis virens*: Role of nucleosides. Hydrobiologica (1999)

U. Hoeger, G. Geier: Extreme nucleoside concentrations in a marine annelid: A novel nucleoside storing in the polychaete *Nereis virens*. Comp. Biochem. and Phys., Part B 157: 175-181 (2010)