

Institut für Biochemie & Biologie  
Arbeitsgruppe Zoophysiologie

---

# Räumliche und zeitliche Aspekte der intrazellulären pH-Regulation in Epithelien

- DISSERTATION -

zur Erlangung des akademischen Grades  
„doctor rerum naturalium“  
(Dr. rer. nat.)  
in der Wissenschaftsdisziplin „Zoophysologie“

eingereicht an der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität Potsdam

von  
BETTINA SCHEWE

Potsdam, August 2008

Dieses Werk ist unter einem Creative Commons Lizenzvertrag lizenziert:  
Namensnennung - Keine kommerzielle Nutzung - Weitergabe unter gleichen  
Bedingungen 2.0 Deutschland

Um die Lizenz anzusehen, gehen Sie bitte zu:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.0/de/>

Online veröffentlicht auf dem

Publikationsserver der Universität Potsdam:

<http://opus.kobv.de/ubp/volltexte/2008/2687/>

urn:nbn:de:kobv:517-opus-26879

[<http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:kobv:517-opus-26879>]

## Publikationen

DAMES, P., ZIMMERMANN, B., SCHMIDT, R., REIN, J., VOSS, M., SCHEWE, B., WALZ, B., BAUMANN, O. (2006). cAMP regulates plasma membrane vacuolar-type H<sup>+</sup>-ATPase assembly and activity in blowfly salivary glands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 3926-3931.

SCHMÄLZLIN, E., WALZ, B., KLIMANT, I., SCHEWE, B., LÖHMANNSRÖBEN, H.-G. (2006). Monitoring hormone-induced oxygen consumption in the salivary glands of the blowfly, *Calliphora vicina*, by use of luminescent microbeads. *Sensors and Actuators B: Chemical* **119**, 251-254.

SCHEWE, B., SCHMÄLZLIN, E., WALZ, B. (2008). Intracellular pH homeostasis and serotonin-induced pH changes in *Calliphora* salivary glands: the contribution of V-ATPase and carbonic anhydrase. *Journal of Experimental Biology* **211**, 805-815.

SCHEWE, B., WALZ, B. Intracellular pH regulation in unstimulated *Calliphora* salivary glands is Na<sup>+</sup>-dependent and requires V-ATPase activity. (Manuskript in Vorbereitung)

SCHEWE, B., BLENAU, W., WALZ, B. Molecular analysis of pH regulating transporters on mRNA level of *Calliphora* salivary glands. (Manuskript in Vorbereitung)

## Tagungsbeiträge

SCHEWE, B., BAUMANN, O., WALZ, B. (2005). Characterization of serotonin-induced intracellular pH changes in *Calliphora* salivary glands. Abstractband S.129, Poster 6\_Po\_13, 98. Jahresversammlung der Deutschen Zoologischen Gesellschaft, Bayreuth.

SCHEWE, B., BAUMANN, O., WALZ, B. (2006). Intracellular pH homeostasis and 5-HT-induced intracellular pH changes in *Calliphora* salivary glands. *Acta Physiologica* **186**: S.147, Poster PM08P-10. 85. Jahresversammlung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft, München.

SCHEWE, B., BAUMANN, O., WALZ, B. (2006). Intracellular pH regulation and 5-HT-induced intracellular pH changes in *Calliphora* salivary glands. Abstractband S.49, Poster 29.2. 2006 American Physiological Society Conference, Virginia Beach, USA.

SCHEWE, B., BAUMANN, O., SCHMÄLZLIN, E., WALZ, B. (2007). Intracellular pH-regulation and 5-HT-induced pH changes in *Calliphora* salivary glands. Abstractband S.145, Poster P24, 100. Jahresversammlung der Deutschen Zoologischen Gesellschaft, Köln.



# Zusammenfassung

Die Speicheldrüsen der Schmeißfliege *Calliphora vicina* produzieren bei Stimulierung mit dem Neurohormon Serotonin (5-Hydroxytryptamine, 5-HT) einen KCl-reichen Primärspeichel. Der transepitheliale  $K^+$ -Transport wird durch eine apikal lokalisierte vakuoläre  $H^+$ -ATPase (V-ATPase) energetisiert. Stimulierung der Speicheldrüsen mit 5-HT aktiviert die apikale V-ATPase, die Protonen aus der Zelle in das Drüsenlumen transportiert. Trotz des auswärts gerichteten Protonentransportes führt die 5-HT-Stimulierung kurioserweise zu einer intrazellulären Ansäuerung. Die Ursachen dieser 5-HT-induzierten Ansäuerung waren unzureichend untersucht. Deshalb war das Ziel dieser Arbeit die Identifikation aller Transporter, die an der intrazellulären pH ( $pH_i$ )-Regulation in unstimulierten Speicheldrüsen von *Calliphora vicina* beteiligt sind und an der Entstehung und Regulation der 5-HT-induzierten  $pH_i$ -Änderungen mitwirken. Von besonderem Interesse war hierbei die funktionelle Mitwirkung der V-ATPase, deren Beteiligung an der  $pH_i$ -Regulation in tierischen Zellen bisher wenig untersucht war.

Wesentliche Ergebnisse dieser Arbeit waren:

- Messungen des  $pH_i$ -Wertes in der unstimulierten Drüse zeigten, dass vor allem die V-ATPase und mindestens ein  $Na^+$ -abhängiger  $HCO_3^-$ -Transporter an der Aufrechterhaltung des Ruhe- $pH_i$  beteiligt sind.
- Zur Wiederherstellung des Ruhe- $pH_i$  nach einer intrazellulären Ansäuerung ( $NH_4Cl$ -Vorpuls) tragen ebenfalls im Wesentlichen die V-ATPase und mindestens ein  $Na^+$ -abhängiger  $HCO_3^-$ -Transporter bei. Der  $Na^+/H^+$ -Antiporter hat in der unstimulierten Drüse keinen messbaren Einfluss auf den Ruhe- $pH_i$ .
- Die Wiederherstellung des Ruhe- $pH_i$  nach einer intrazellulären Alkalisierung (Na-acetat-Vorpuls) ist  $Cl^-$ -abhängig, aber auch unter extremen Bedingungen waren die Zellen noch in der Lage sich vollständig von einer intrazellulären Alkalisierung zu erholen. Einen entscheidenden Anteil daran hat offenbar die hohe intrazelluläre Pufferkapazität.
- Ein  $Na^+$ -abhängiger Glutamat-Transporter ist *per se* kein  $pH_i$ -regulierender Transporter, seine Aktivität hat jedoch Einfluss auf den Ruhe- $pH_i$  in der unstimulierten Speicheldrüse von *Calliphora vicina*.
- 10 nM 5-HT induzieren in den *Calliphora* Speicheldrüsen eine intrazelluläre Ansäuerung. An dieser Ansäuerung ist der  $Na^+/H^+$ -Antiporter entscheidend beteiligt. Auch eine klare  $Cl^-$ -Abhängigkeit der 5-HT-induzierten Ansäuerung konnte beobachtet werden. Wahrscheinlich ist eine gekoppelte Aktivität von  $Na^+/H^+$ -Antiporter und  $Cl^-/HCO_3^-$ -Antiporter.

- Messungen mit einem O<sub>2</sub>-empfindlichen Fluoreszenzfarbstoff zeigten, dass Stimulierung der Speicheldrüsen mit 5-HT die Zellatmung aktivierte. Der cAMP- und der IP<sub>3</sub>/Ca<sup>2+</sup>-Weg tragen auf komplexe Weise zu der 5-HT-induzierten Aktivierung der Zellatmung und damit auch zu den 5-HT-induzierten pH<sub>i</sub>-Änderungen bei.
- Mit molekularbiologischen Untersuchungen ist es gelungen den Na<sup>+</sup>-abhängigen Glutamat-Transporter, den Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Antiporter, die Carboanhydrase und die Untereinheit C der V-ATPase in den *Calliphora* Speicheldrüsen direkt nachzuweisen. Zudem konnte erstmals der direkte Nachweis für die Expression eines nH<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-Antiporters in den Speicheldrüsen von *Calliphora vicina* erbracht werden.

Diese Arbeit trug ganz wesentlich zum Verständnis der pH<sub>i</sub>-Regulation in der unstimulierten und stimulierten Speicheldrüse von *Calliphora vicina* bei. Mechanismen die zur Aufrechterhaltung und Wiederherstellung des Ruhe-pH<sub>i</sub> nach einer intrazellulären Ansäuerung bzw. Alkalisierung beitragen, konnten mit pH<sub>i</sub>-Messungen und auch molekularbiologisch nachgewiesen werden. Die Mechanismen, welche die 5-HT-induzierte intrazelluläre Ansäuerung verursachen, konnten ebenfalls aufgeklärt werden. Zudem wurde an den *Calliphora* Speicheldrüsen eine neue optische Methode zur Messung des O<sub>2</sub>-Verbrauchs in tierischen Geweben etabliert.

# Abstract

The tubular salivary glands of the blowfly *Calliphora vicina* consist of a single layer of epithelial cells. Stimulation with the neurohormone serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) induces the secretion of a KCl-rich primary saliva. Transepithelial  $K^+$ -transport is energized by a vacuolar-type  $H^+$ -ATPase (V-ATPase) which is located in the apical membrane. 5-HT stimulates the apical V-ATPase which transports protons out of the cells into the lumen of the glands. Despite this outward directed proton transport, 5-HT stimulation leads to an intracellular acidification. The causes of this intracellular acidification were poorly understood. Therefore the aim of this thesis was the identification of all  $pH_i$  regulating transporters which are involved in  $pH_i$  regulation in the unstimulated salivary glands of *Calliphora vicina* and which contribute to the 5-HT-induced  $pH_i$  changes. Of special interest was the functional role of the V-ATPase, whose contribution to  $pH_i$  regulation in animal cells is, as yet, not well studied.

Key results were:

- $pH_i$  measurements in unstimulated glands showed that mainly the V-ATPase and at least one  $Na^+$ -dependent  $HCO_3^-$ -transporter are involved in maintenance of resting  $pH_i$ .
- V-ATPase and at least one  $Na^+$ -dependent  $HCO_3^-$ -transporter are also necessary for the recovery from an intracellular acidification ( $NH_4Cl$  prepulse).
- Recovery from an intracellular alkali load (Na-acetate prepulse) is partially  $Cl^-$  dependent.
- A  $Na^+$  dependent glutamate-transporter is present in *Calliphora* salivary glands and its activity affects the resting  $pH_i$ .
- 10 nM 5-HT induce an intracellular acidification. This acidification is  $Na^+$  dependent, EIPA-sensitive and also  $Cl^-$  dependent. No DIDS-sensitivity was observed. A coupled activity of a  $Na^+/H^+$ -antiporter and a  $Cl^-/HCO_3^-$ -antiporter was suggested.
- Using  $O_2$ -sensitive fluorescent microbeads I could show that 5-HT stimulation of the *Calliphora* salivary glands activates cellular respiration. The cAMP and  $Ca^{2+}$  signalling pathways contribute in a complex manner to the 5-HT-induced activation of cellular respiration and consequently, also to the 5-HT-induced intracellular acidification.
- The expression of a  $Na^+$  dependent glutamate-transporter, a  $Na^+/H^+$ -antiporter, a carbonic anhydrase, subunit C of the V-ATPase and a  $nH^+/K^+$ -antiporter were determined on mRNA level by RT-PCR.

This thesis contributes significantly to the understanding of  $\text{pH}_i$  regulation in unstimulated and stimulated salivary glands of *Calliphora vicina*. Mechanisms which contribute to the maintenance and recovery of resting  $\text{pH}_i$  were identified by using  $\text{pH}_i$  measurements and molecular biological techniques. Mechanisms which are responsible for the 5-HT-induced intracellular acidification were also clarified. Furthermore a new optical method for measuring  $\text{O}_2$  consumption in animals cells was established by using the *Calliphora* salivary glands as a model.



# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>iii</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>vi</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>vii</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Aspekte der $\text{pH}_i$ -Regulation . . . . .	1
1.2 Die Speicheldrüse von <i>Calliphora vicina</i> . . . . .	3
1.2.1 Morphologie . . . . .	3
1.2.2 5-HT-induzierte Speichelsekretion in den Speicheldrüsen von <i>Calliphora vicina</i> . . . . .	4
1.2.3 5-HT-induzierte $\text{pH}_i$ -Änderungen in den Speicheldrüsen von <i>Calliphora vicina</i> . . . . .	5
1.3 Ziel dieser Arbeit . . . . .	7
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>9</b>
2.1 Verwendete Lösungen und Substanzen . . . . .	9
2.1.1 Ringerlösungen . . . . .	9
2.1.2 Farbstoffe und weitere verwendete Substanzen . . . . .	10
2.2 Präparation der Speicheldrüsen . . . . .	11
2.3 Mikrofluorometrische Messung des Sauerstoffverbrauchs . . . . .	11
2.4 Mikrofluorometrische Messung des $\text{pH}_i$ -Wertes mit BCECF . . . . .	12
2.4.1 Der Farbstoff 2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5-(and-6)- carboxyfluorescein (BCECF) . . . . .	12
2.4.2 Beladung der Speicheldrüsen . . . . .	14
2.4.3 Versuchsaufbau zur mikrofluorometrischen Messung des $\text{pH}_i$ - Wertes . . . . .	14
2.4.4 Kalibrierung des Fluoreszenzsignals . . . . .	15
2.5 Analyse der räumlichen Muster 5-HT-induzierter intrazellulärer $\text{Ca}^{2+}$ - & $\text{pH}_i$ -Änderungen . . . . .	16
2.5.1 Verwendete Farbstoffe . . . . .	16
2.5.2 Aufnahme von Raum-Zeit-Diagrammen . . . . .	17
2.6 Molekularbiologische Methoden . . . . .	18
2.6.1 Zusammensetzung von Pufferlösungen für die Molekularbiologie	18
2.6.2 Gesamt-RNA-Extraktion . . . . .	19
2.6.3 mRNA-Extraktion . . . . .	20
2.6.4 cDNA-Synthese . . . . .	20
2.6.5 PCR mit degenerierten Primern . . . . .	21

2.6.6	Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Agarosegelelektrophorese . . . . .	21
2.6.7	Fragmentisolierung . . . . .	22
2.6.8	Ligation und Transformation . . . . .	22
2.6.9	Blau-Weiß-Selektion . . . . .	22
2.6.10	Plasmidisolierung und Restriktionsverdau . . . . .	23
2.6.11	RT-PCR . . . . .	23
2.7	Datenanalyse und Statistik . . . . .	24
2.7.1	Bioinformatische Methoden . . . . .	24
2.7.2	Darstellung der Ergebnisse und Statistik . . . . .	24
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>26</b>
3.1	Intrazellulärer pH-Wert in der unstimulierten Speicheldrüse von <i>Calliphora vicina</i> . . . . .	26
3.1.1	Aufrechterhaltung des Ruhe-pH <sub>i</sub> . . . . .	26
3.1.2	Erholung von einer intrazellulären Ansäuerung - NH <sub>4</sub> Cl-Vorpuls-Methode . . . . .	29
3.1.3	Erholung von einer intrazellulären Alkalisierung - Na-acetat-Vorpuls-Methode . . . . .	38
3.2	Der Na <sup>+</sup> -abhängige Glutamat-Transporter . . . . .	51
3.2.1	Na <sup>+</sup> - und Glutamatabhängige pH <sub>i</sub> -Änderungen . . . . .	51
3.2.2	Molekularbiologischer Nachweis des Na <sup>+</sup> -abhängigen Glutamat-Transporters . . . . .	52
3.2.3	Dosis-Wirkungskurve für den Na <sup>+</sup> -abhängigen Glutamat-Transporter . . . . .	54
3.3	5-HT-induzierte pH <sub>i</sub> -Änderungen . . . . .	55
3.3.1	Einfluss von pH <sub>i</sub> -regulierenden Transportern auf die 5-HT-induzierte intrazelluläre Ansäuerung . . . . .	55
3.3.2	Glutamat-Abhängigkeit der 5-HT-induzierten intrazellulären Ansäuerung . . . . .	58
3.3.3	Ca <sup>2+</sup> -Abhängigkeit der 5-HT-induzierten intrazellulären Ansäuerung . . . . .	58
3.3.4	Räumliche Muster der 5-HT-induzierten pH <sub>i</sub> -Änderungen . . . . .	61
3.4	5-HT-induzierter Sauerstoffverbrauch . . . . .	63
3.5	Molekularbiologischer Nachweis pH <sub>i</sub> -regulierender Transportmechanismen	66
3.5.1	CPA-Superfamilie . . . . .	67
3.5.2	Carboanhydrase . . . . .	72
3.5.3	C-Untereinheit der V-H <sup>+</sup> -ATPase . . . . .	74

---

<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>77</b>
4.1	Intrazellulärer pH-Wert in der unstimulierten Speicheldrüse von <i>Calliphora vicina</i> . . . . .	77
4.1.1	Aufrechterhaltung des Ruhe-pH <sub>i</sub> . . . . .	77
4.1.2	Erholung von einer intrazellulären Ansäuerung - NH <sub>4</sub> Cl-Vorpuls-Methode . . . . .	86
4.1.3	Erholung von einer intrazellulären Alkalisierung - Na-acetat-Vorpuls-Methode . . . . .	89
4.1.4	Modell zur Regulation des Ruhe-pH <sub>i</sub> in der Speicheldrüse von <i>Calliphora vicina</i> . . . . .	91
4.2	5-HT-induzierte pH <sub>i</sub> -Änderungen . . . . .	92
4.3	5-HT-induzierter Sauerstoffverbrauch . . . . .	97
4.4	Ausblick . . . . .	99
<b>5</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>101</b>
<b>6</b>	<b>Anhang</b>	<b>117</b>
6.1	Abkürzungsverzeichnis . . . . .	117
6.2	Degenerierte Primer . . . . .	119
6.3	Nukleotid-Sequenzen der erhaltenen PCR-Fragmente . . . . .	120
6.4	Spezifische Primer für RT-PCR . . . . .	123
	<b>Danksagung</b>	<b>124</b>
	<b>Lebenslauf</b>	<b>125</b>
	<b>Eidesstattliche Erklärung</b>	<b>126</b>

## Abbildungsverzeichnis

1.1	pH <sub>i</sub> -regulierende Transportmechanismen . . . . .	3
1.2	Morphologie der Speicheldrüse von <i>Calliphora vicina</i> . . . . .	4
1.3	Signalkaskaden der 5-HT-induzierten Speichelsekretion in den Speicheldrüsen von <i>Calliphora vicina</i> . . . . .	5
1.4	5-HT- und cAMP-induzierte pH <sub>i</sub> -Änderungen in den Speicheldrüsen von <i>Calliphora vicina</i> . . . . .	6
1.5	Einfluss von Acetazolamid auf die 5-HT-induzierte intrazelluläre Ansäuerung in den Speicheldrüsen von <i>Calliphora vicina</i> . . . . .	7
2.1	Aufbau des Messplatzes zur O <sub>2</sub> -Messung . . . . .	12
2.2	Strukturformeln des pH-sensitiven Fluoreszenzfarbstoffes BCECF . . . . .	13
2.3	Aufbau des Messplatzes zur mikrofluorometrischen Messung des pH <sub>i</sub> -Wertes . . . . .	15
2.4	Kalibrierung des Fluoreszenzsignals . . . . .	16
3.1	Einfluss von extrazellulärem Na <sup>+</sup> & Cl <sup>-</sup> und von Hemmstoffen für den NHE, die V-ATPase, HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -Transporter und die Carboanhydrase auf den Ruhe-pH <sub>i</sub> -Wert in der unstimulierten Speicheldrüse von <i>Calliphora vicina</i> . . . . .	29
3.2	NH <sub>4</sub> Cl-Vorpuls-Methode in den Speicheldrüsen von <i>Calliphora vicina</i> . . . . .	30
3.3	NH <sub>4</sub> Cl-Vorpuls: Beitrag der V-ATPase und Na <sup>+</sup> -abhängiger Transportsysteme zur aktiven pH <sub>i</sub> -Regulation in den Speicheldrüsen von <i>Calliphora vicina</i> . . . . .	32
3.4	NH <sub>4</sub> Cl-Vorpuls: Beitrag des NHE und der V-ATPase zur aktiven pH <sub>i</sub> -Regulation in den Speicheldrüsen von <i>Calliphora vicina</i> . . . . .	34
3.5	NH <sub>4</sub> Cl-Vorpuls: Beitrag Na <sup>+</sup> -abhängiger HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -Transporter und der V-ATPase zur aktiven pH <sub>i</sub> -Regulation in den Speicheldrüsen von <i>Calliphora vicina</i> . . . . .	35
3.6	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -Vorpuls: Beitrag Cl <sup>-</sup> -abhängiger Transporter und der V-ATPase zur aktiven pH <sub>i</sub> -Regulation in den Speicheldrüsen von <i>Calliphora vicina</i> . . . . .	37
3.7	NH <sub>4</sub> Cl-Vorpuls: Beitrag der PKA zur aktiven pH <sub>i</sub> -Regulation in den Speicheldrüsen von <i>Calliphora vicina</i> . . . . .	38
3.8	Na-acetat-Vorpuls-Methode in den Speicheldrüsen von <i>Calliphora vicina</i> . . . . .	39
3.9	Na-acetat-Vorpuls: Beitrag Cl <sup>-</sup> - und HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -abhängiger Transporter zur aktiven pH <sub>i</sub> -Regulation in den Speicheldrüsen von <i>Calliphora vicina</i> . . . . .	41
3.10	Na-acetat-Vorpuls: Beitrag der Carboanhydrase zur aktiven pH <sub>i</sub> -Regulation in den Speicheldrüsen von <i>Calliphora vicina</i> . . . . .	43
3.11	Na-acetat-Vorpuls: Beitrag Glutamat-abhängiger Transporter zur aktiven pH <sub>i</sub> -Regulation in den Speicheldrüsen von <i>Calliphora vicina</i> . . . . .	45

3.12 Na-acetat-Vorpuls: ATP-Abhängigkeit der aktiven $\text{pH}_i$ -Regulation in den Speicheldrüsen von <i>Calliphora vicina</i> . . . . .	47
3.13 Na-acetat-Vorpuls: Additive Effekte auf die aktive $\text{pH}_i$ -Regulation in den Speicheldrüsen von <i>Calliphora vicina</i> . . . . .	49
3.14 Na-acetat-Vorpuls: ATP-Abhängigkeit und Beitrag $\text{pH}_i$ -regulierender Transporter zur aktiven $\text{pH}_i$ -Regulation in den Speicheldrüsen von <i>Calliphora vicina</i> . . . . .	50
3.15 Einfluss von extrazellulärem $\text{Na}^+$ und Glutamat auf den $\text{pH}_i$ -Wert . . .	52
3.16 Vergleich der Aminosäuresequenz des $\text{Na}^+$ -abhängigen Glutamat-Transporters verschiedener Insekten . . . . .	53
3.17 BLAST-Analyse der <i>Cv EAAT</i> - Aminosäuresequenz . . . . .	54
3.18 Dosis-Wirkungskurve für den $\text{Na}^+$ -abhängigen Glutamat-Transporter in den Speicheldrüsen von <i>Calliphora vicina</i> . . . . .	55
3.19 $\text{Na}^+$ -Abhängigkeit der 5-HT-induzierten intrazellulären Ansäuerung . .	56
3.20 $\text{Cl}^-$ -Abhängigkeit der 5-HT-induzierten intrazellulären Ansäuerung . .	57
3.21 Glutamat-Abhängigkeit der 5-HT-induzierten intrazellulären Ansäuerung	58
3.22 $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit der 5-HT-induzierten intrazellulären Ansäuerung . .	60
3.23 Einfluss von U73122 auf die 5-HT-induzierte intrazelluläre Ansäuerung	61
3.24 Vergleich der zeitlich-räumlichen Muster 5-HT-induzierter $\text{pH}_i$ - & $\text{Ca}^{2+}$ -Änderungen . . . . .	62
3.25 5-HT-induzierter $\text{O}_2$ -Verbrauch in der Speicheldrüse von <i>Calliphora vicina</i>	64
3.26 cAMP-induzierter $\text{O}_2$ -Verbrauch in den Speicheldrüsen von <i>Calliphora vicina</i> . . . . .	65
3.27 Einfluss von $\text{Ca}^{2+}$ auf den 5-HT-induzierten $\text{O}_2$ -Verbrauch . . . . .	66
3.28 Vergleich der Aminosäuresequenz des NHE verschiedener Insekten . . .	68
3.29 BLAST-Analyse der <i>Cv NHE</i> - Aminosäuresequenz . . . . .	69
3.30 Vergleich der Aminosäuresequenz des NHA1 verschiedener Insekten . .	71
3.31 BLAST-Analyse der <i>Cv NHA</i> - Aminosäuresequenz . . . . .	72
3.32 Vergleich der Aminosäuresequenz der Carboanhydrase verschiedener Insekten . . . . .	73
3.33 BLAST-Analyse der <i>Cv CA</i> - Aminosäuresequenz . . . . .	74
3.34 Vergleich der Aminosäuresequenz der UE-C der V-ATPase verschiedener Insekten . . . . .	75
3.35 BLAST-Analyse der <i>Cv UE-C</i> - Aminosäuresequenz . . . . .	76
4.1 Modell zur $\text{pH}_i$ -Regulation in der unstimulierten Speicheldrüse von <i>Calliphora vicina</i> . . . . .	92
4.2 Modell zu 5-HT-induzierten $\text{pH}_i$ -Änderungen in den Speicheldrüsen von <i>Calliphora vicina</i> . . . . .	99
6.1 Nukleotid-Sequenz des $\text{Na}^+$ -abhängigen Glutamat-Transporters aus <i>Calliphora vicina</i> ( <i>Cv EAAT</i> ) . . . . .	120

---

6.2	Nukleotid-Sequenz des $K^+/H^+$ -Antiporter aus <i>Calliphora vicina</i> ( <i>Cv NHA</i> )	120
6.3	Nukleotid-Sequenz des $Na^+/H^+$ -Antiporter aus <i>Calliphora vicina</i> ( <i>Cv NHE</i> ) . . . . .	121
6.4	Nukleotid-Sequenz der Carboanhydrase aus <i>Calliphora vicina</i> ( <i>Cv CA</i> )	122
6.5	Nukleotid-Sequenz der UE-C der V-ATPase aus <i>Calliphora vicina</i> ( <i>Cv UE-C</i> ) . . . . .	123

## Tabellenverzeichnis

2.1	Zusammensetzung der verwendeten Ringerlösungen . . . . .	9
2.2	Zusammensetzung von $\text{NH}_4\text{Cl}$ & $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Ringerlösungen . . . . .	9
2.3	Zusammensetzung von Na-acetat-Ringerlösungen . . . . .	10
2.4	Eingesetzte Farbstoffe und Substanzen . . . . .	10
2.5	Zusammensetzung von Puffern und Lösungen für die Molekularbiologie	18
2.6	Zusammensetzung der verwendeten <i>Kits</i> für die Molekularbiologie . . .	19
3.1	$\text{NH}_4\text{Cl}$ -Vorpuls: Einfluss von extrazellulärem $\text{Na}^+$ und Concanamycin A	32
3.2	$\text{NH}_4\text{Cl}$ -Vorpuls: Einfluss von EIPA und Concanamycin A . . . . .	33
3.3	$\text{NH}_4\text{Cl}$ -Vorpuls: Einfluss von DIDS und Concanamycin A . . . . .	35
3.4	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Vorpuls: Einfluss von extrazellulärem $\text{Cl}^-$ und Concanamycin A . . . . .	36
3.5	$\text{NH}_4\text{Cl}$ -Vorpuls: Einfluss von H-89 und Concanamycin A . . . . .	38
3.6	Na-acetat-Vorpuls: Einfluss von extrazellulärem $\text{Cl}^-$ und DIDS . . . . .	40
3.7	Na-acetat-Vorpuls: Einfluss von Acetazolamid . . . . .	42
3.8	Na-acetat-Vorpuls: Einfluss von extrazellulärem $\text{Cl}^-$ , Glutamat und DIDS	44
3.9	Na-acetat-Vorpuls: Einfluss von Oligomycin . . . . .	46
3.10	Na-acetat-Vorpuls: Einfluss von extrazellulärem $\text{Cl}^-$ und/oder Glutamat & DIDS und/oder Oligomycin . . . . .	48
3.11	Na-acetat-Vorpuls: Einfluss von extrazellulärem $\text{Cl}^-$ & Glutamat und DIDS & Oligomycin . . . . .	50
4.1	$\text{NH}_4\text{Cl}$ -induzierte Ansäuerung: Vergleich der <i>Calliphora</i> Speicheldrüsen mit anderen Systemen . . . . .	86
6.1	Degenerierte Primer . . . . .	119
6.2	Spezifische Primer für RT-PCR . . . . .	123

# 1 Einleitung

Die Speicheldrüsen der Schmeißfliege *Calliphora vicina* produzieren bei Stimulierung mit dem Neurohormon Serotonin (5-Hydroxytryptamine, 5-HT) einen KCl-reichen Primärspeichel. Eine in der apikalen Membran der Drüsenzellen lokalisierte vakuoläre H<sup>+</sup>-ATPase (V-ATPase) ist dabei elementarer Bestandteil der Erregungs-Sekretions-Kopplung. Die V-ATPase generiert einen einwärts gerichteten elektrochemischen Protonengradienten über der apikalen Membran. Dieser wird von einem putativen nH<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-Antiporter genutzt um K<sup>+</sup> in das Lumen der Speicheldrüsen zu transportieren. Als Folge der V-ATPase-Aktivität auftretende intrazelluläre pH (pH<sub>i</sub>) -Änderungen sind nicht untersucht und die zugrunde liegenden Mechanismen weitgehend unbekannt.

Eine strenge Regulation des pH<sub>i</sub>-Wertes in der unstimulierten und stimulierten Drüse ist grundlegend für die Aufrechterhaltung der Zellfunktionen. Der Beitrag der V-ATPase und weiterer pH<sub>i</sub>-regulierender Mechanismen an der pH<sub>i</sub>-Regulation ist ebenfalls unbekannt. Diese Arbeit leistet einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der Rolle der V-ATPase und weiterer pH<sub>i</sub>-regulierender Transportsysteme bei der pH<sub>i</sub>-Regulation in Drüsenepithelien. Sie soll auch entscheidend zur Aufklärung der pH<sub>i</sub>-Regulation in den Speicheldrüsen von *Calliphora vicina* beitragen.

## 1.1 Aspekte der pH<sub>i</sub>-Regulation

Der pH-Wert ist definiert als negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration ([H<sup>+</sup>]).

$$\text{pH} = -\log([\text{H}^+])$$

Der pH<sub>i</sub>-Wert ist ein wichtiger Parameter bei der Aufrechterhaltung und Regulation fast aller Zellfunktionen. Makromoleküle, Proteine, Peptide und Aminosäuren werden vom pH<sub>i</sub>-Wert in Struktur und Funktion beeinflusst. Auch Prozesse wie die Proteinbiosynthese, der Zellzyklus oder die Leitfähigkeit von Ionenkanälen sind vom pH<sub>i</sub>-Wert abhängig (Madshus 1988, Putnam 2001). Deshalb unterliegt der pH<sub>i</sub>-Wert einer strengen Regulation. Das Membranpotential (V<sub>m</sub>) einer ruhenden Zelle liegt bei ca. -60 mV. Nach der Nernst-Gleichung wäre demnach ein pH<sub>i</sub>-Wert von ca. pH 6.2 zu erwarten, wenn eine passive Protonenverteilung aufgrund des Membranpotentials erfolgen würde (Boron 2004).



$$\begin{aligned}
 V_m &= [(2.3 \cdot R \cdot T) / F] \cdot \log([H^+]_o / [H^+]_i) \quad ^1 \\
 -60 \text{ mV} &= 58 \text{ mV} \cdot \log(10^{-7.2} / x) \\
 -60 \text{ mV} &= 58 \text{ mV} \cdot (x - 7.2) \\
 x &= (-60 \text{ mV} / 58 \text{ mV}) + 7.2 \\
 x &\approx 6.2
 \end{aligned}$$

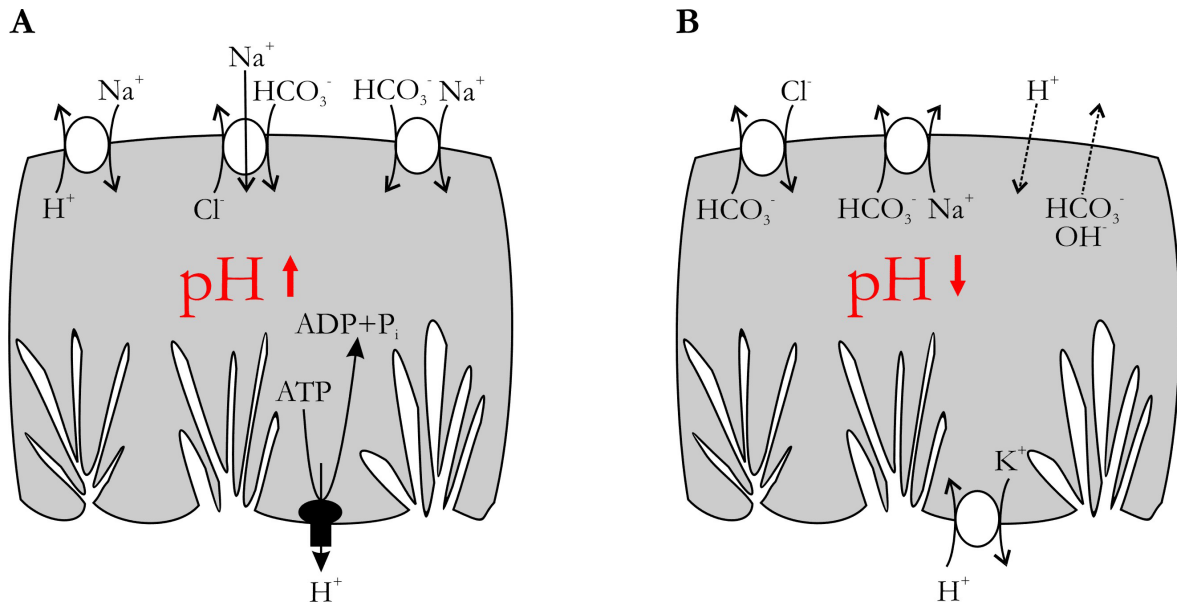
Dieser  $\text{pH}_i$ -Wert ist für die meisten lebenden Zellen zu sauer und toxisch. Der tatsächliche  $\text{pH}_i$ -Wert liegt meist höher, was zu einem einwärts gerichteten Protonengradienten führt. Die Zelle muss mit Hilfe von aktiven  $\text{pH}$ -Regulationsmechanismen einer schleichenden Ansäuerung entgegenwirken und einen physiologischen  $\text{pH}_i$ -Wert von 6.9-7.6 aufrechterhalten (Ilundain 1992). Zu diesen Regulationsmechanismen zählen zum einen die intrazelluläre Pufferkapazität ( $\beta$ ) und zum anderen  $\text{pH}_i$ -regulierende Transportmechanismen in der Plasmamembran.

Die intrazelluläre Pufferkapazität beschreibt die Fähigkeit der Zelle eine Zugabe von Basen- oder Säureäquivalenten zu puffern. Die Pufferkapazität  $\beta$  ist definiert als Menge an Säure oder Base pro Volumen (in mol/l), die benötigt wird um den  $\text{pH}_i$ -Wert um eine Einheit zu verschieben. Dabei unterscheidet man die intrinsische Pufferkapazität ( $\beta_i$ ) und die bicarbonatabhängige Pufferkapazität ( $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -System,  $\beta_{\text{CO}_2}$ ). Die intrinsische Pufferkapazität umfasst alle Puffersysteme einer Zelle, mit Ausnahme des  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -Systems. Dazu zählen Phosphate, Aminosäuren, Peptide und Proteine. Bei einem Influx von Protonen in die Zelle, wird ein Teil davon von den Puffersystemen aufgenommen. Die Summe aus intrinsischer und bicarbonatabhängiger Pufferkapazität ergibt die Gesamtpufferkapazität ( $\beta_{\text{ges}}$ ) einer Zelle (Ilundain 1992, Deitmer & Schild 2000).

$\text{pH}_i$ -regulierende Transportmechanismen umfassen den Transport von Säurenäquivalenten (Protonen,  $\text{H}^+$ ) und den Transport von Basenäquivalenten (Bicarbonat,  $\text{HCO}_3^-$ ) über die Zellmembran. Dabei unterscheidet man zwischen alkalisierenden (Abb. 1.1 A) und ansäuernden (Abb. 1.1 B) Transportsystemen. Zu den alkalisierenden Transportern zählen der  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporter (NHE), die V-ATPase, sowie der einwärts gerichtete  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Cotransporter (NBC). Diese Membranproteine transportieren Protonen aus der Zelle hinaus (NHE & V-ATPase) oder Basenäquivalente wie  $\text{HCO}_3^-$  in die Zelle hinein (einwärts gerichteter NBC). Hierbei spielt auch die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase eine wichtige Rolle. Sie ist essentiell für die Aufrechterhaltung des einwärts gerichteten elektrochemischen  $\text{Na}^+$ -Gradienten über der Zellmembran. Die Energie aus diesem Gradienten kann vom NHE, vom einwärts gerichteten NBC oder einem  $\text{Na}^+$ -getriebenen  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Antiporter (NDCBE) genutzt werden um  $\text{H}^+$  aus der Zelle hinaus oder  $\text{HCO}_3^-$  in die Zelle hinein zu transportieren. Die V-ATPase transportiert Protonen gegen den elektrochemischen

<sup>1</sup> $V_m = -60 \text{ mV}$ ;  $R = \text{Gaskonstante} = 8.31441 \text{ J}/(\text{mol} \cdot \text{K})$ ;  $F = \text{Faraday-Konstante} = 9.648459 \cdot 10^{-4} \text{ C}/\text{mol}$ ;  $T = \text{absolute Temperatur} = 22^\circ\text{C} + 273.15 = 295.15 \text{ K}$ ;  $[(2.3 \cdot R \cdot T) / F] = 58 \text{ mV}$ ,  $[H^+]_o = \text{extrazelluläre Protonenkonzentration} = 10^{-7.2}$ ;  $[H^+]_i = \text{intrazelluläre Protonenkonzentration}$

Protonengradienten. Die Energie für diesen Transport stammt aus der Hydrolyse von Adenosintriphosphat (ATP). Der  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher (AE) bzw. der auswärts gerichtete NBC transportieren  $\text{HCO}_3^-$  aus der Zelle hinaus, und fungieren somit als alkalisierende Transportsysteme. Dazu zählt ebenfalls der  $n\text{H}^+/\text{K}^+$ -Antiporter (Roos & Boron 1981, Boron 1986, Strazzabosco & Boyer 1996).



**Abb. 1.1:  $\text{pH}_i$ -regulierende Transportmechanismen**

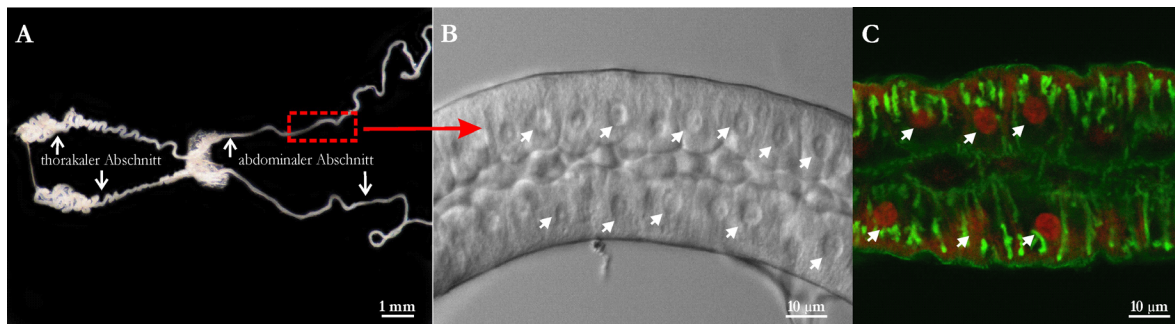
(A) alkalisierende  $\text{pH}_i$ -regulierende Transportmechanismen:  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporter (NHE),  $\text{Na}^+$ -getriebener  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Antiporter (NDCBE), einwärts gerichteter  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Cotransporter (NBC), vakuoläre  $\text{H}^+$ -ATPase (V-ATPase). (B) ansäuernde  $\text{pH}_i$ -regulierende Transportmechanismen:  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Antiporter (AE), auswärts gerichteter  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Cotransporter (NBC),  $n\text{H}^+/\text{K}^+$ -Antiporter.

## 1.2 Die Speicheldrüse von *Calliphora vicina*

### 1.2.1 Morphologie

Die Schmeißfliege *Calliphora vicina* besitzt tubuläre Speicheldrüsen, die sich als paarige blind endende Schläuche bis in das Abdomen der Tiere erstrecken (Abb. 1.2). Im anterioren Teil des Thorax vereinigen sich beide Schläuche zu einem gemeinsamen Ausführgang, der im Hypopharynx mündet (Oschmann & Berridge 1970). Die Länge eines Tubulus beträgt 5 cm und der Durchmesser ca. 100  $\mu\text{m}$ . Der abdominale Teil der Speicheldrüsen verläuft relativ gestreckt, während der thorakale Abschnitt stark aufgewunden ist. Die Speicheldrüsen von *Calliphora vicina* bestehen aus einem einschichtigen Epithel, das ein zentrales Lumen umschließt. Die Drüsen sind nicht innerviert. Die Speichelsekretion wird humoral durch das Neurohormon 5-HT ausgelöst (House & Ginsborg 1985). Die Speicheldrüse lässt sich in zwei funktionelle Abschnitte unterteilen (Rotte et al. 2008). Der abdominale Teil, sowie der hintere Abschnitt des thorakalen Abschnittes sind sekretorisch aktiv. Dieser sekretorisch aktive Teil der Speicheldrüsen besteht aus pyramidalen Zellen. Ein wichtiges Merkmal dieser Zellen sind extensive Canaliculi (stark verzweigte Einfaltungen) auf der apikalen

(luminalen) Seite. Die Canaliculi sind von einem dichten Saum aus Microplacae bedeckt, was zu einer enormen Oberflächenvergrößerung der apikalen Membran führt (Oschmann & Berridge 1970, Skaer et al. 1975). 5-HT-Stimulierung der sekretorisch aktiven Zellen führt zur Bildung eines KCl-reichen isotonischen Primärspeichels. Im thorakalen Abschnitt findet eine Modifikation des Speichels statt, was zu einem hypotonischen Endspeichel führt (House & Ginsborg 1985, Rotte et al. 2008).



**Abb. 1.2: Morphologie der Speicheldrüse von *Calliphora vicina***

(A) *Calliphora vicina*: makroskopische Anatomie der Speicheldrüse (Rotte 2006). (B) *Calliphora vicina*: mikroskopische Anatomie der Speicheldrüse (abdominaler Abschnitt), Aufnahme im differentiellen Interferenzkontrast, Pfeile markieren Zellkerne. (C) *Calliphora vicina*: Konfokale Aufnahme der Speicheldrüse (abdominaler Abschnitt), Phalloidin-AlexaFluor488 (grün) zeigt die Organisation der apikalen Membran der sekretorischen Zellen, Pfeile markieren die ToPro-3 gefärbten Zellkerne (rot).

### 1.2.2 5-HT-induzierte Speichelsekretion in den Speicheldrüsen von *Calliphora vicina*

Die Speichelsekretion wird bei *Calliphora vicina* durch das biogene Amin 5-HT ausgelöst (Abb. 1.3). 5-HT bindet an zwei unterschiedliche G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und aktiviert zwei parallele Signalkaskaden. Zum einen erfolgt die Aktivierung des zyklischen AMP (cAMP) -Weges, parallel dazu die Aktivierung des  $IP_3/Ca^{2+}$ -Weges (Berridge 1970 & 1981). Der cAMP-Weg aktiviert, vermittelt durch eine Proteinkinase A (PKA), eine apikal lokalisierte V-ATPase. Diese transportiert unter ATP-Verbrauch Protonen in das Lumen der Speicheldrüsen und erzeugt so einen einwärts gerichteten elektrochemischen Protonengradienten über der apikalen Membran. Dieser Protonengradient wird von einem putativen  $nH^+/K^+$ -Antiporter genutzt um  $K^+$  in das Lumen der Speicheldrüse zu transportieren (Wieczorek et al. 1991, Zimmermann et al. 2003, Dames et al. 2006, Rein et al. 2008). Über den zweiten 5-HT-Rezeptor erfolgt die Aktivierung der Phospholipase C (PLC). Diese katalysiert die Umwandlung von Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat ( $PtdIns(4,5)P_2$ ) in Inositol(1,4,5)-trisphosphat ( $IP_3$ ) und 1,2-Diacylglycerol (1,2-DAG).  $IP_3$  bindet an  $IP_3$ -Rezeptor  $Ca^{2+}$ -Kanäle am endoplasmatischen Retikulum (ER) und induziert so eine  $Ca^{2+}$ -Freisetzung. Der dadurch verursachte Anstieg der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration führt zur Öffnung von  $Ca^{2+}$ -gesteuerten  $Cl^-$ -Kanälen in der basalen und apikalen Membran der Epithelzellen. Dies führt zu einem transepithelialen passiven  $Cl^-$ -Transport in das Lumen der Speicheldrüse. Wasser

folgt dem KCl-Transport passiv. Diese Prozesse führen zur Bildung eines KCl-reichen Primärspeichels (Prince et al. 1972, Berridge et al. 1975, Fain & Berridge 1979 a & b).

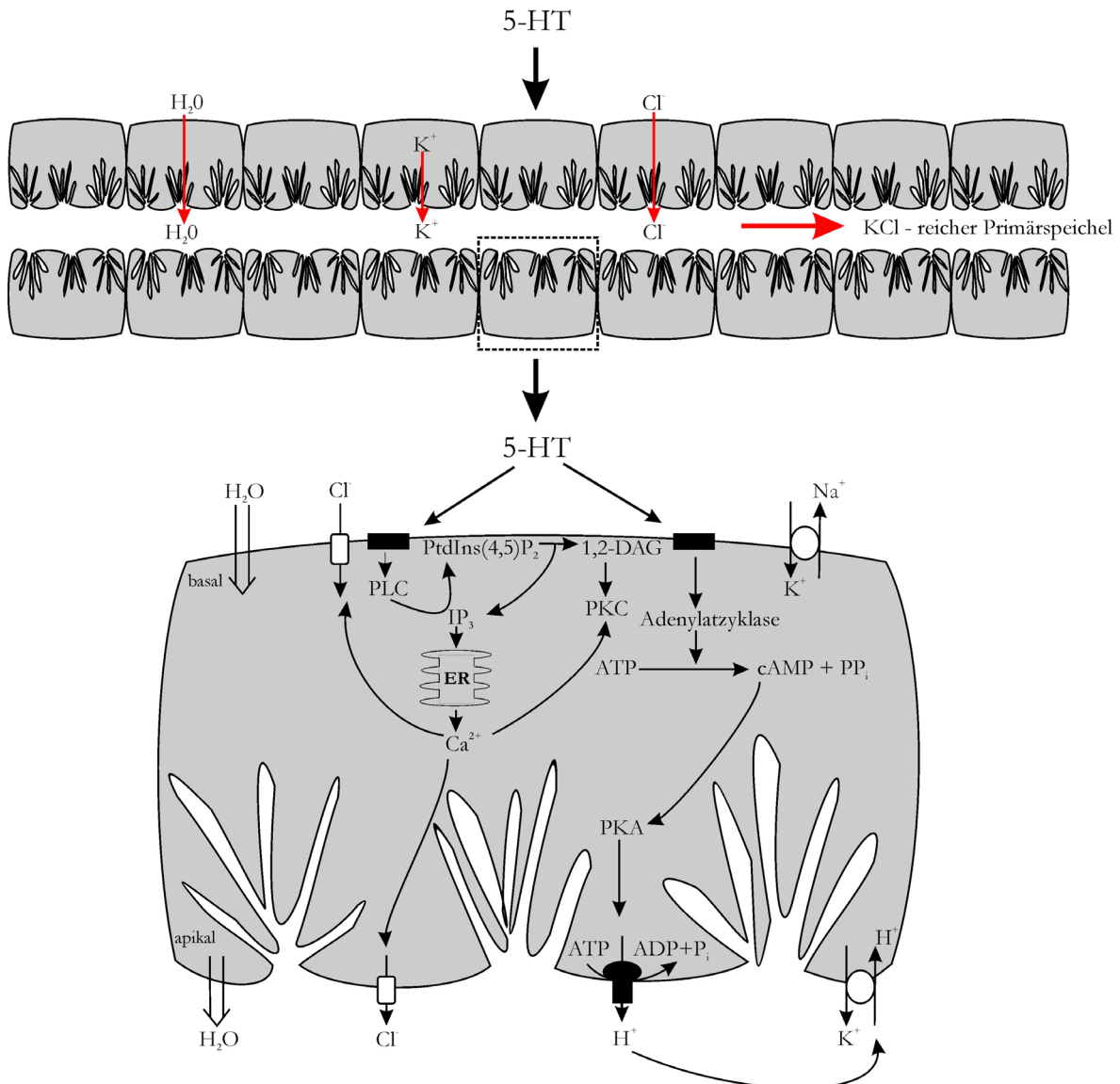
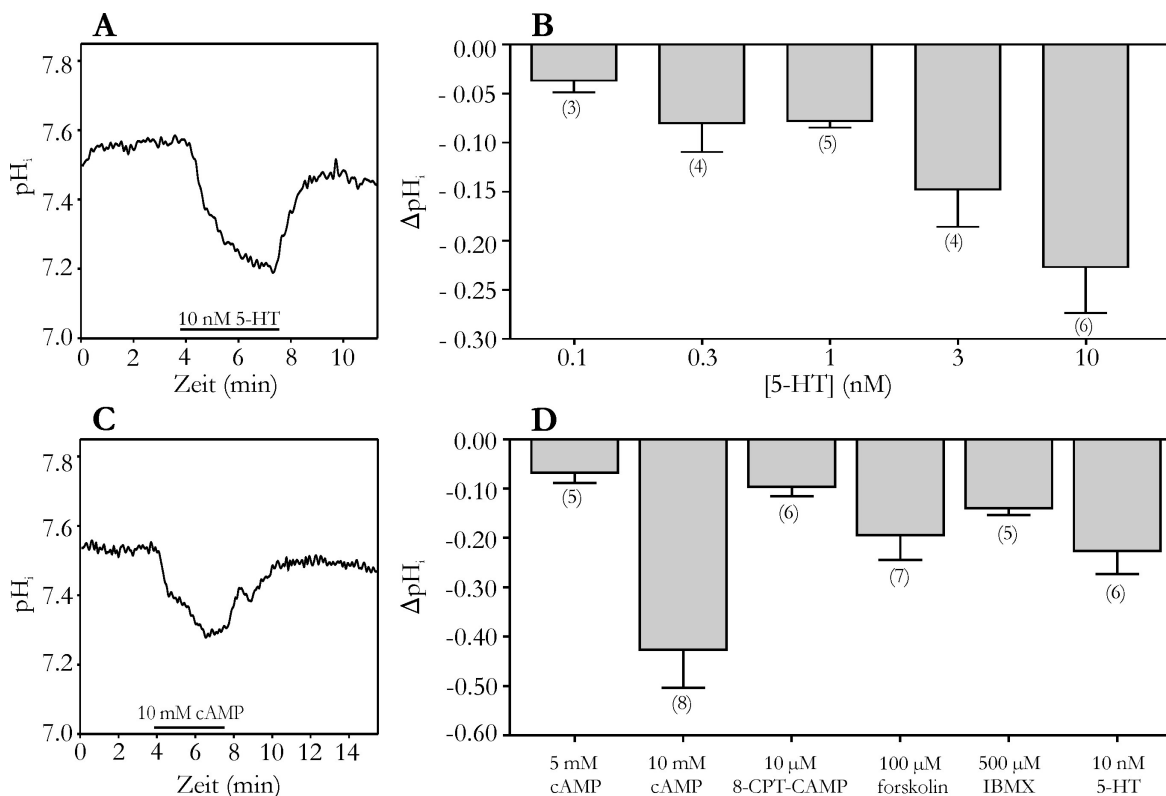


Abb. 1.3: Signalkaskaden der 5-HT-induzierten Speichelsekretion in den Speicheldrüsen von *Calliphora vicina*

### 1.2.3 5-HT-induzierte $\text{pH}_i$ -Änderungen in den Speicheldrüsen von *Calliphora vicina*

Der  $\text{pH}_i$ -Wert in unstimulierten Drüsen von *Calliphora vicina* beträgt  $7.53 \pm 0.34$ . Zudem besitzen diese Zellen, im Vergleich zu anderen Systemen, eine hohe Pufferkapazität. Die intrinsische Pufferkapazität beträgt  $123.5 \pm 80.4$  mM und die bicarbonatabhängige Pufferkapazität beträgt  $52.2 \pm 26.8$  mM. Mit steigendem  $\text{pH}_i$ -Wert nimmt die Pufferkapazität zu (Schewe 2005, Schewe et al. 2008). Die Identität der Transportmechanismen und Prozesse, die an der  $\text{pH}_i$ -Regulation in unstimulierten und stimulierten Speicheldrüsen beteiligt sind, sind noch nicht untersucht worden. Die apikale V-ATPase ist für die Bildung des KCl-reichen Primärspeichels von essentieller

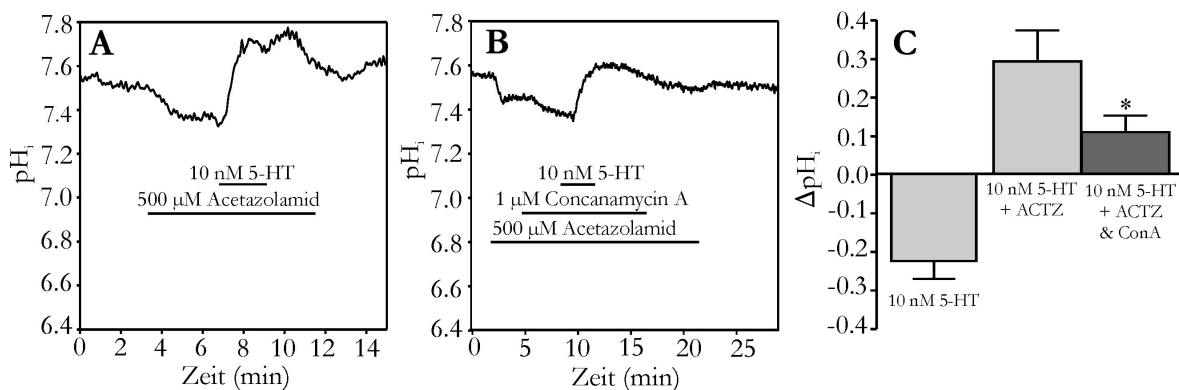
Bedeutung. Luminale pH-Messungen mit Hilfe des pH-empfindlichen Farbstoffs 5-Hexadecanoylaminofluorescein (HAF) zeigen eine cAMP-vermittelte Aktivierung der V-ATPase und eine damit verbundene Ansäuerung des Lumens (Rein et al. 2006). Intuitiv würde man im Gegenzug eine intrazelluläre Alkalisierung erwarten. In meiner Diplomarbeit konnte ich jedoch bereits zeigen, dass durch 5-HT-Stimulierung sowohl luminal als auch intrazellulär eine Ansäuerung auftritt (Abb. 1.4 A). Die Höhe der 5-HT-induzierten intrazellulären Ansäuerung ist konzentrationsabhängig. Mit steigender 5-HT-Konzentration nimmt die Ansäuerung zu (Abb. 1.4 B). Bei Badapplikation von cAMP, cAMP-Analoga (8-(4-Chlorophenylthio)-zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat, 8-CPT-cAMP), Forskolin (Adenylatzyklase-Aktivator) oder 3-Isobutyl-1-methyl-Xanthin (IBMX, Phosphodiesterase-Inhibitor) ist ebenfalls eine intrazelluläre Ansäuerung zu beobachten (Abb. 1.4 C & D).



**Abb. 1.4: 5-HT- und cAMP-induzierte  $pH_i$ -Änderungen in den Speicheldrüsen von *Calliphora vicina*** (A) Stimulierung der Speicheldrüsen mit 10 nM 5-HT führt zu einer intrazellulären Ansäuerung. (B) Die 5-HT-induzierte intrazelluläre Ansäuerung ist konzentrationsabhängig. Mit steigender 5-HT-Konzentration nimmt die Ansäuerung zu. (C) Badapplikation von cAMP führt ebenfalls zu einer intrazellulären Ansäuerung. (D) Auch das cAMP-Analoga 8-CPT-cAMP, der Adenylatzyklase-Aktivator Forskolin und der Phosphodiesterase-Hemmer IBMX induzieren eine intrazelluläre Ansäuerung. Zum Vergleich die Ansäuerung induziert durch 5 mM & 10 mM cAMP, sowie 10 nM 5-HT. (Mittelwert  $\pm$  Standardfehler, die Anzahl der Experimente ist in Klammern angegeben).

Die Ergebnisse meiner Diplomarbeit zeigten, dass die Ursache für diese Ansäuerung im Wesentlichen eine 5-HT-induzierte Aktivierung des zellulären Metabolismus ist. Dies führt zu einer erhöhten  $CO_2$ -Produktion in den Zellen. Dieses  $CO_2$  wird durch eine Carboanhydrase hydratisiert und es entsteht Kohlensäure ( $H_2CO_3$ ). Diese dissoziiert und es kommt zur Bildung von Protonen, was die intrazelluläre Ansäuerung bewirkt. Dafür sprechen Experimente in denen die Carboanhydrase mit Acetazolamid blockiert

wurde. Unter diesen Bedingungen induziert 5-HT keine intrazelluläre Ansäuerung mehr, sondern eine Alkalisierung (Abb. 1.5 A). Blockiert man gleichzeitig die V-ATPase mit Concanamycin A wird diese Alkalisierung signifikant reduziert (Abb. 1.5 B & C). Das zeigt, dass der auswärts gerichtete Protonentransport durch die V-ATPase im Wesentlichen für diese Alkalisierung verantwortlich ist. Diese Ergebnisse führten zu der Hypothese, dass die 5-HT-induzierte Ansäuerung durch eine erhöhte Atmungsaktivität auftritt, welche die durch die V-ATPase induzierte Alkalisierung maskiert.



**Abb. 1.5: Einfluss von Acetazolamid auf die 5-HT-induzierte intrazelluläre Ansäuerung in den Speicheldrüsen von *Calliphora vicina***

(A) & (C) Stimulierung der Speicheldrüsen mit 10 nM 5-HT in Gegenwart von 500 µM Acetazolamid induziert eine intrazelluläre Alkalisierung. (B) & (C) In der Gegenwart von 500 µM Acetazolamid (ACTZ) und 1 µM Concanamycin A (Con A) induziert 5-HT eine intrazelluläre Alkalisierung. Diese Alkalisierung ist signifikant kleiner als die hervorgerufene Alkalisierung in der Gegenwart von Acetazolamid (Mittelwert  $\pm$  Standardfehler,  $n = 9$ ).

### 1.3 Ziel dieser Arbeit

Ich konnte bereits zeigen, dass die Carboanhydrase und die V-ATPase an der Entstehung der 5-HT-induzierten intrazellulären Ansäuerung mitwirken (Schewe 2005, Schewe et al. 2008). In der vorliegenden Arbeit soll die Hypothese geprüft werden, dass die 5-HT-induzierten  $pH_i$ -Änderungen auf eine verstärkte Aktivierung des Metabolismus zurückzuführen sind. Dazu wurde auf eine Kooperation mit dem Institut für Physikalische Chemie an der Universität Potsdam zurückgegriffen. Dort wurde ein  $O_2$ -empfindlicher Fluoreszenzfarbstoff an Latexpartikel gekoppelt und ein Algorithmus entwickelt, um als  $O_2$ -empfindlichen Parameter die Lumineszenz-Lebenszeit zu nutzen. Diese Methode konnte für die Messung der  $O_2$ -Konzentration in Geweben erfolgreich eingesetzt werden (Schmälzlin et al. 2005). Dieser Farbstoff wurde erstmals an den Speicheldrüsen von *Calliphora vicina* eingesetzt. Damit war es möglich den Sauerstoffverbrauch der Zellen während der 5-HT-Stimulierung zu messen. Des Weiteren wurden in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe von  $pH_i$ -Messungen weitere Transportsysteme identifiziert, die an den 5-HT-induzierten  $pH_i$ -Änderungen beteiligt sind.

Eine Stimulierung der Speicheldrüsen mit 5-HT führt zum Anstieg der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration in komplexen zeitlich-räumlichen Mustern. So entstehen bei niedrigen schwelennahen 5-HT-Konzentrationen intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Oszillationen.

Bei höheren 5-HT-Konzentrationen (ab 10 nM) kommt es zur Bildung von interzellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Wellen (Zimmermann & Walz 1997 & 1999). Zudem konnte bereits gezeigt werden, dass sich cAMP- und  $\text{IP}_3/\text{Ca}^{2+}$ -Weg wechselseitig beeinflussen (Schmidt et al. 2008, Fechner 2008). Ausgehend davon wurde der Frage nachgegangen, ob auch die intrazelluläre  $\text{H}^+$ -Konzentration, bei 5-HT-Stimulierung, Oszillationen oder Wellen zeigt. Dazu wurden mikrofluorometrisch Messungen der 5-HT-induzierten intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{pH}_i$ -Änderungen vorgenommen. Die entstehenden zeitlich-räumlichen Muster wurden ausgewertet und miteinander verglichen. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Regulation des  $\text{pH}_i$ -Wertes in der unstimulierten Drüse. Diese Mechanismen wurden mit Hilfe von  $\text{pH}_i$ -Messungen aufgeklärt. Im Anschluss daran wurden die postulierten  $\text{pH}_i$ -regulierenden Transporter molekularbiologisch untersucht.

Zusammengefasst ergeben sich folgende zentrale Aspekte dieser Arbeit:

- Aufklärung der Regulation des  $\text{pH}_i$ -Wertes in der unstimulierten Drüse.
- Mit Hilfe von  $\text{pH}_i$ -Messungen Identifikation von Transportsystemen die an der 5-HT-induzierten Ansäuerung beteiligt sind.
- Vergleich der räumlichen Muster 5-HT-induzierter  $\text{pH}_i$ - und  $\text{Ca}^{2+}$ -Änderungen.
- Messung des Sauerstoffverbrauchs während 5-HT-Stimulierung mit Hilfe von  $\text{O}_2$ -empfindlichen Nanopartikeln.
- Molekularbiologischer Nachweis von postulierten Transportproteinen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Verwendete Lösungen und Substanzen

#### 2.1.1 Ringerlösungen

Zur Durchführung der Experimente wurden Ringerlösungen in verschiedenen Zusammensetzungen benötigt. Die Zusammensetzung dieser Lösungen ist in Tab. 2.1 dargestellt.

Tab. 2.1: Zusammensetzung der verwendeten Ringerlösungen (Angaben in mM)

	<i>NaCl</i>	<i>KCl</i>	<i>CaCl<sub>2</sub></i>	<i>MgCl<sub>2</sub></i>	<i>Na-glutamat</i>	<i>Maleinsäure</i>	<i>D-Glucose</i>	<i>Tris-HCl</i>	<i>Cholinchlorid</i>	<i>Na-isothionat</i>	<i>K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></i>	<i>CaSO<sub>4</sub></i>	<i>MgSO<sub>4</sub></i>	<i>Tris-Base</i>	<i>EGTA</i>	<i>pH-Wert</i>
<i>Calliphora-Ringer</i>	128	10	2	2	3	2.8	10	10								7.2* <sup>1</sup>
<i>Na<sup>+</sup>-freier Ringer</i>		10	2	2	3	2.8	10	10	128							7.2* <sup>3</sup>
<i>Ca<sup>2+</sup>-freier Ringer</i>	128	10		2	3	2.8	10	10						2		7.2* <sup>1</sup>
<i>Cl<sup>-</sup>-freier Ringer</i>					3	2.8	10			128	5	2	2	10		7.2* <sup>2</sup>
<i>Glutamat-freier Ringer</i>	131	10	2	2		2.8	10	10								7.2* <sup>1</sup>
<i>Glutamat- &amp; Cl<sup>-</sup>-freier Ringer</i>						2.8	10			131	5	2	2	10		7.2* <sup>3</sup>
<i>Kalibrierlösung</i>	138	2	2	3	2.8	10	10									6.2-10.2* <sup>3</sup>

pH-Wert eingestellt mit: \*1) 1M NaOH, \*2) 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, \*3) 1M KOH

Zur Charakterisierung der pH<sub>i</sub>-regulierenden Mechanismen in der unstimulierten Drüse wurden Ringerlösungen benötigt die Ammoniumchlorid (NH<sub>4</sub>Cl) oder Ammoniumsulfat ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) bzw. Natriumacetat (Na-acetat) enthielten. Die Zusammensetzungen dieser Lösungen sind in Tab. 2.2 bzw. Tab. 2.3 dargestellt.

Tab. 2.2: Zusammensetzung von NH<sub>4</sub>Cl & (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Ringerlösungen (Angaben in mM)

	<i>NH<sub>4</sub>Cl</i>	<i>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></i>	<i>NaCl</i>	<i>KCl</i>	<i>CaCl<sub>2</sub></i>	<i>MgCl<sub>2</sub></i>	<i>Na-glutamat</i>	<i>Maleinsäure</i>	<i>D-Glucose</i>	<i>Tris-HCl</i>	<i>Cholinchlorid</i>	<i>Na-isothionat</i>	<i>K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></i>	<i>CaSO<sub>4</sub></i>	<i>MgSO<sub>4</sub></i>	<i>Tris-Base</i>	<i>pH-Wert</i>
<i>NH<sub>4</sub>Cl-Ringer</i>	20		108	10	2	2	3	2.8	10	10							7.2* <sup>1</sup>
<i>NH<sub>4</sub>Cl-Ringer Na<sup>+</sup>-frei</i>	20			10	2	2	3	2.8	10	10	108						7.2* <sup>3</sup>
<i>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Ringer</i>		10	108	10	2	2	3	2.8	10	10							7.2* <sup>1</sup>
<i>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Ringer Cl<sup>-</sup>-frei</i>		10					3	2.8	10			108	5	2	2	10	7.2* <sup>2</sup>

pH-Wert eingestellt mit: \*1) 1M NaOH, \*2) 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, \*3) 1M KOH



Tab. 2.3: Zusammensetzung von Na-acetat-Ringerlösungen (Angaben in mM)

	Na-acetat	NaCl	KCl	CaCl <sub>2</sub>	MgCl <sub>2</sub>	Na-glutamat	Malbinsäure	D-Glucose	Tris-HCl	Cholinchlorid	Na-isothionat	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	CaSO <sub>4</sub>	MgSO <sub>4</sub>	Tris-Base	pH-Wert	
Na-acetat-Ringer	50	78	10	2	2	3	2.8	10	10								7.2* <sup>1</sup>
Na-acetat-Ringer Cl <sup>-</sup> -frei	50					3	2.8	10	10		78	5	2	2	10		7.2* <sup>2</sup>
Na-acetat-Ringer Glutamat-frei	50	81	10	2	2	3	2.8	10	10								7.2* <sup>1</sup>
Na-acetat-Ringer Cl <sup>-</sup> & Glutamat-frei	50						2.8	10			81	5	2	2	10		7.2* <sup>2</sup>

pH-Wert eingestellt mit: \*1) 1M NaOH, \*2) 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, \*3) 1M KOH

## 2.1.2 Farbstoffe und weitere verwendete Substanzen

Tab. 2.4: Eingesetzte Farbstoffe und Substanzen

Substanz	Molekulargewicht g/mol	Konzentration Stammlösung	Lösungsmittel	Konzentration im Versuch	Funktion
BCECF* <sup>1</sup>	600	1 mM	DMSO	5 µM	pH-empfindlicher Fluoreszenzfarbstoff
P3			destH <sub>2</sub> O		O <sub>2</sub> -empfindlicher Farbstoff
Fura-2* <sup>1</sup>	1001.86	1 mM	DMSO	20 µM	Ca <sup>2+</sup> -empfindlicher Fluoreszenzfarbstoff
5-HT* <sup>2</sup>	387.4	10 <sup>-4</sup> M	destH <sub>2</sub> O	1-100 nM	biogenes Amin, stimuliert die Speichelsekretion in den Speicheldrüsen von <i>Calliphora vicina</i>
8-CPT-cAMP* <sup>4</sup>	493.8	10 mM	destH <sub>2</sub> O	10 µM	membranpermeables cAMP- Analogon
Acetazolamid* <sup>2</sup>	222.29	100 mM	DMSO	500 µM	Inhibitor der Carboanhydrase
Concanamycin A* <sup>2</sup>	866.09	5 mM	DMSO	1 µM	Inhibitor der V-ATPase
DIDS* <sup>2</sup>	498.48	100 mM	DMSO	500 µM	Inhibitor von HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> - Transportern
EIPA* <sup>2</sup>	299.79	100 mM	DMSO	50 µM	Inhibitor des Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> -Antiporter
Forskolin* <sup>3</sup>	410.5	100 mM	DMSO	100 µM	Aktiviert Adenylatzyklase
H-89* <sup>3</sup>	519.4	10 mM	DMSO	30 µM	Inhibitor der Proteinkinase A
MnCl <sub>2</sub> * <sup>2</sup>	197.91		destH <sub>2</sub> O	20 mM	Auslöschung der Fura-2-Fluoreszenz
Nigericin* <sup>3</sup>	747.0	10 mM	DMSO	10 µM	K <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> -Ionophor
Thapsigargin* <sup>3</sup>	650.8	10 mM	DMSO	1 µM	Inhibitor der SERCA-Pumpe
U73122* <sup>3</sup>	464.7	10 mM	DMSO	10 µM	Inhibitor der Phospholipase C
Oligomycin* <sup>3</sup>	789.3	2.5mg/ml	DMSO	2.5µg/ml	Inhibitor der F-ATPase

Firma: \*1) Invitrogen (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland), \*2) Sigma & Fluka (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) \*3) Axxora (AXXORA Deutschland GmbH, Lörrach, Deutschland) \*4) Biolog (BIOLOG Life Science Institute, Bremen, Deutschland)

## 2.2 Präparation der Speicheldrüsen

Schmeißfliegen der Art *Calliphora vicina* wurden im eigenen Institut gezüchtet. Die Tiere wurden in einem Licht-Dunkel-Rhythmus von 12:12 Stunden gehalten und hatten freien Zugang zu Nahrung und Wasser. Zu experimentellen Zwecken wurden Tiere in einem Alter von mindestens 5 Tagen - 4 Wochen verwendet. Zur Präparation der Speicheldrüsen wurde das Abdomen der Tiere entfernt und in einem mit Sylgard ausgegossenen und mit Ringerlösung gefüllten Blockschälchen mit einer Insektennadel befestigt. Unter einem Stereomikroskop (Stemi DV4, Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland) wurde mit einer Pinzette an den Luftsäcken gezogen und diese entfernt. Dabei wurde der abdominale Teil der Speicheldrüsen sichtbar. Durch Ziehen an deren Ende konnten die Speicheldrüsen isoliert werden.

## 2.3 Mikrofluorometrische Messung des Sauerstoffverbrauchs

Zur Messung des O<sub>2</sub>-Verbrauchs in den Speicheldrüsen von *Calliphora vicina* wurden 0.3 - 1 µm große Polystyrol-Partikel verwendet (Schmäzlin et al. 2006). Diese enthielten Pt(II)-tetra-pentafluorophenylporphyrin (Pt-Porphyrin, PtPFPP, P3). P3 zeigt im roten bis nahen Infrarotbereich (NIR-Bereich) eine Phosphoreszenz die durch O<sub>2</sub> vermindert wird (*quenching*). Das führt zu einer Abnahme der Lebenszeit. Die Lebenszeit des P3 wurde mit der Zwei-Frequenz-Phasen-Modellierungs-Technik gemessen und aus der Phasenverschiebung zwischen sinusoidaler Anregung und Emission bei zwei verschiedenen Modulationsfrequenzen berechnet (Schmäzlin et al. 2006, Schewe et al. 2008).

Die Sensorpartikel wurden in das Lumen der Speicheldrüsen von *Calliphora vicina* injiziert. Das Versuchswännchen wurde auf dem Tisch eines modifizierten Mikrofluorometers Zeiss UEM/UMSP (Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland) montiert (Abb. 2.1). Als Objektiv diente ein Zeiss Plan Neofluar Immersionsobjektiv 25x/0.8 Imm. (Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland). Zur Anregung der Phosphoreszenz wurde eine 405 nm Leuchtdiode (LED) verwendet. Rote Anteile der LED-Emission wurden mit einem Kurzpass *dichroic blue filter* herausgefiltert (FD1B, Thorlabs Europe GmbH, Karlsfeld, Deutschland). Das vom Präparat abgestrahlte Phosphoreszenzlicht gelangte durch einen 635 nm Langpassfilter zum Photomultiplier (Type R 928, Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland). Eine variable Rechteckblende im Photometerkopf (konfokal zur Präparatebene) ermöglichte es, den Präparatbereich auf ca. 10 Zellen zu begrenzen. Der Anodenstrom des Photomultipliers wurde in eine Spannung umgewandelt und einem Lock-in-Verstärker (EG & G, Signal Recovery 7260, Workingham, Großbritannien) zugeführt, der auch Eingang von der sinusoidal modulierten Spannung erhielt, mit der die Helligkeit der LED moduliert wurde. Der Lock-in-Verstärker registrierte die Phasenverschiebung zwischen den beiden Modulationsfrequenzen. Das Mikroskopphotometer wurde über einen PC gesteuert. Ein

weiterer PC diene der Datenaufzeichnung und -auswertung.

Angaben zur  $O_2$ -Konzentration werden in % Luft spezifiziert: 100%  $O_2$  entspricht mit  $O_2$ -gesättigtem Wasser, das sich im Gleichgewicht mit Wasserdampf-gesättigter Luft befindet. Bei 22°C und 101.3 kPa entsprechen 100%  $O_2$  einer Konzentration von 8.7 mg/l (Benson & Krause 1980).

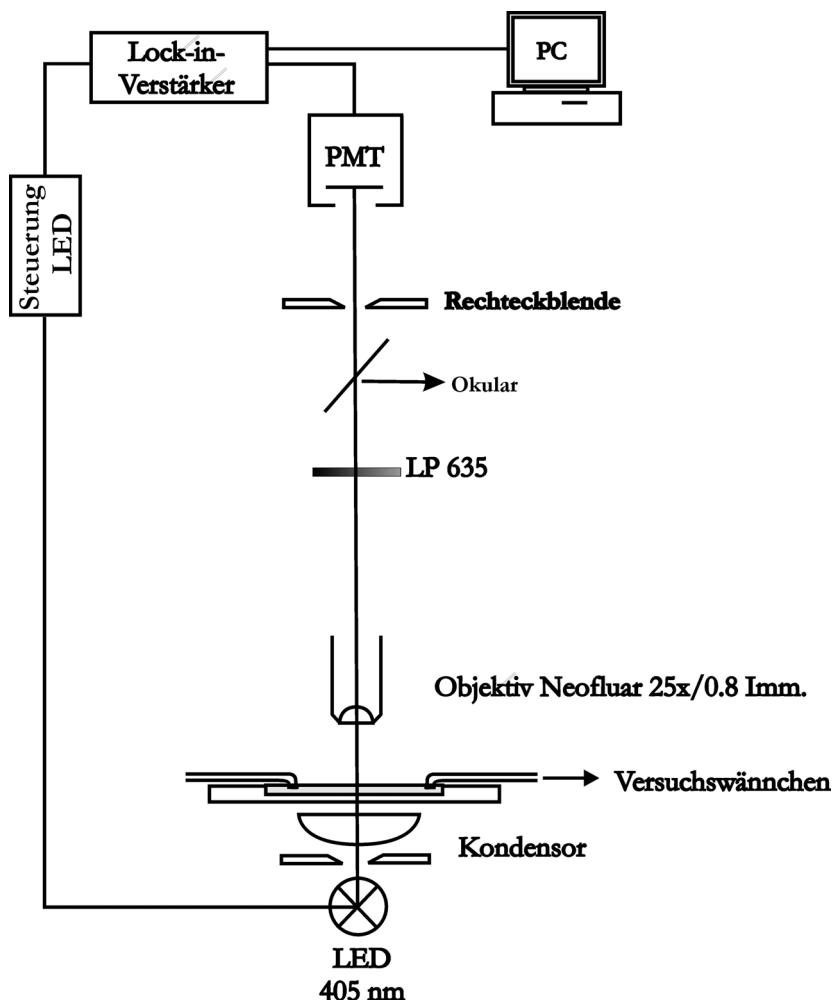


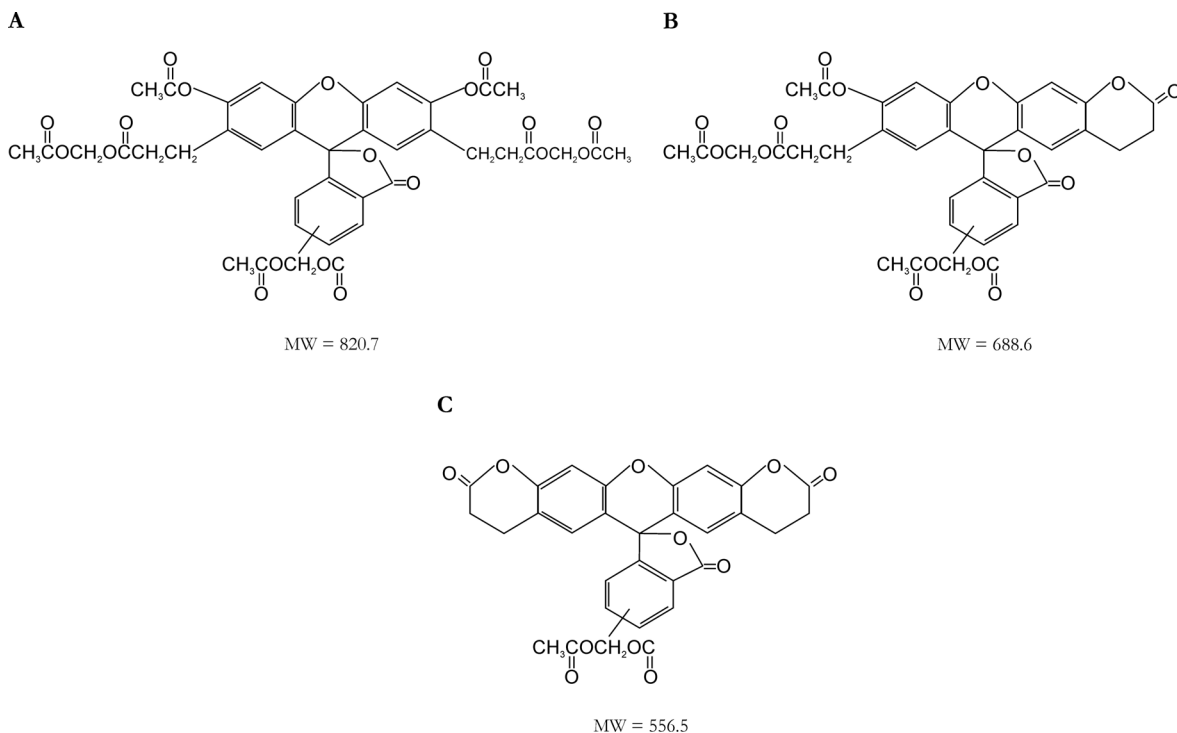
Abb. 2.1: Aufbau des Messplatzes zur  $O_2$ -Messung

## 2.4 Mikrofluorometrische Messung des $pH_i$ -Wertes mit BCECF

### 2.4.1 Der Farbstoff 2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5-(and-6)-carboxyfluorescein (BCECF)

Für die Messung des  $pH_i$ -Wertes wurde der pH-sensitive Fluoreszenzfarbstoff 2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5-(and-6)-carboxyfluorescein (BCECF) verwendet. BCECF wurde 1982 von Tsien et al. als pH-sensitiver Farbstoff entwickelt (Rink et al. 1982). BCECF besitzt 3 Carboxylgruppen mehr als Fluorescein (Abb. 2.2 A-C).

Dies verhindert dass BCECF über Dicarboxylattransporter wieder aus der Zelle heraustransportiert wird (Deitmer & Schild 2000).



**Abb. 2.2: Strukturformeln des pH-sensitiven Fluoreszenzfarbstoffes BCECF**  
(A)-(C) Strukturformeln BCECF (nach Datenblatt BCECF, Invitrogen 2006)

Die pH-Abhängigkeit von BCECF beruht auf einer Deprotonierung der Phenolgruppe bei Alkalisierung. Die Deprotonierung führt zu einer Verminderung der notwendigen Anregungsenergie des Moleküls, und einer Rechtsverschiebung des Absorptions- bzw. des Fluoreszenzanregungsspektrums. Die Absorption nimmt bei Alkalisierung zu und das Ergebnis ist ein isosbestischer Punkt bei ca. 439 nm. Bei dieser Wellenlänge ist die Absorption des protonierten und deprotonierten Moleküls identisch und deshalb unabhängig vom pH-Wert. Die Fluoreszenzemission von BCECF liegt zwischen 500 und 600 nm. Die Fluoreszenzintensität wird bei zwei Anregungswellenlängen gemessen. Dieses Verfahren hat den Vorteil dass der gemessene Quotient der Fluoreszenzintensitäten (*ratio*) aus beiden Anregungswellenlängen eindeutig der  $H^+$ -Konzentration zugeordnet werden kann, denn dieser ist unabhängig vom Messvolumen und der Farbstoffkonzentration. Für den Farbstoff BCECF liegt die erste Anregungswellenlänge idealerweise bei 490 nm, dem Anregungsmaximum. Als zweite Wellenlänge wählt man den isosbestischen Punkt bei ca. 439 nm. Der Quotient der gemessenen Fluoreszenzintensität bei den beiden Anregungswellenlängen *ratio*  $F_{490}/F_{439}$  sinkt bei einer Ansäuerung und steigt bei einer Alkalisierung.

### 2.4.2 Beladung der Speicheldrüsen

Um den Farbstoff auf einfache Weise in die Zellen der Speicheldrüsen zu laden, wurde die veresterte lipophile Form des BCECF, der Acetoxymethylester (AM-Ester) des BCECF verwendet. AM-Ester diffundieren über die Zellmembran und intrazelluläre Esterasen spalten die Esterreste ab. Der Farbstoff liegt dann als freie Säure in der Zelle vor und ist in diesem Zustand ionenempfindlich. Zudem kann der Farbstoff die Zelle nicht mehr verlassen und wird im Cytosol angereichert. Isolierte Speicheldrüsen wurden in ein Blockschälchen überführt, welches 5  $\mu\text{M}$  BCECF, AM in Ringerlösung enthielt. Die Drüsen wurden darin 20 min im Dunkeln bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. In dieser Zeit wurden auf dem Objektträger des verwendeten Versuchswännchens 0.7  $\mu\text{l}$  Cell-Tak und 0.4  $\mu\text{l}$  Ringer gemischt. Dies wurde 2 min bei 60°C getrocknet. Nach der Inkubation in 5  $\mu\text{M}$  BCECF, AM wurden die Speicheldrüsen in einem Tropfen Ringer auf dem Cell-Tak am Objektträger befestigt. Das Versuchswännchen wurde auf dem Mikroskopisch montiert. Es erfolgte zunächst eine 10-minütige Perfusion mit Ringer um Reste der Farbstofflösung zu entfernen und die vollständige Abspaltung der AM-Ester zu gewährleisten. Dann wurde die BCECF-Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 490 nm überprüft und eine Messstelle im Präparat ausgewählt, die ca. 10 Zellen umfasste.

### 2.4.3 Versuchsaufbau zur mikrofluorometrischen Messung des $\text{pH}_i$ -Wertes

Zur Messung des  $\text{pH}_i$ -Wertes in den Speicheldrüsen von *Calliphora vicina* wurde als Mikrofluorometer ein Zeiss UEM/UMSP Mikroskopstativ (Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland) verwendet (Abb. 2.3). Für das Durchlichtverfahren stand eine Halogenlampe 12 Volt, 100 Watt zur Verfügung. Zur Anregung der BCECF-Fluoreszenz wurde eine Xenon-Kurzbogenlampe XBO 75 Watt (Ushio, Steinhöring, Deutschland) genutzt. Definierte Wellenlängen wurden durch einen Monochromator (Polychrome II, T.I.L.L. Photonics, Planegg, Deutschland) erzeugt. Dieser wurde durch ein TestPoint-Programm (Keithley, Germering, Deutschland) gesteuert (s.u.). Das Anregungslicht wurde von einem Farbteiler FT 510 durch das Objektiv auf das Präparat reflektiert. Das vom Präparat abgestrahlte Fluoreszenzlicht gelangte durch den Farbteiler und einen Langpassfilter LP 515 zum Photomultiplier (Type R 928, Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland). Der Anodenstrom wurde im Steuergerät der Photometereinheit (MSP 21, Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland) in eine Spannung umgewandelt. Die Digitalisierung erfolgte mit einer DAS 1600 A/D Wandlerkarte (Keithley, Germering, Deutschland) im PC. Die Steuerung der Digitalisierung, die Darstellung der Messwerte und die Datenspeicherung wurden durch ein TestPoint-Programm kontrolliert. Als Objektiv diente ein Zeiss Plan Neofluar Immersionsobjektiv 25x/0.8 Imm. Zur mikrofluorometrischen Messung der BCECF-Fluoreszenz wurde ein Programm verwendet, das eine Kurzzeitanregung ermöglichte. Damit wurde die

Ausbleichung des Farbstoffes und die Lichtbelastung des lebenden Präparates gering gehalten. Während eines Experimentes wurde das Präparat alle 5 s für jeweils 20 ms bei den Wellenlängen 490 nm und 439 nm angeregt. In einigen Experimenten wurden Pharmaka verwendet (EIPA und DIDS), die selbst auch fluoreszierten. In diesen Fällen wurde das Präparat alle 5 s für jeweils 20 ms bei den Wellenlängen 490 nm und 450 nm angeregt. Das TestPoint-Programm registrierte die Rohsignale (bei den beiden Wellenlängen angeregte Fluoreszenzintensitäten, in Volt) und berechnete daraus die *ratio*  $F_{490}/F_{439}$  bzw. *ratio*  $F_{490}/F_{450}$  der Fluoreszenzintensitäten. Alle drei Messgrößen wurden in Echtzeit auf dem PC-Bildschirm dargestellt, damit der Versuchsverlauf ständig beobachtet werden konnte.

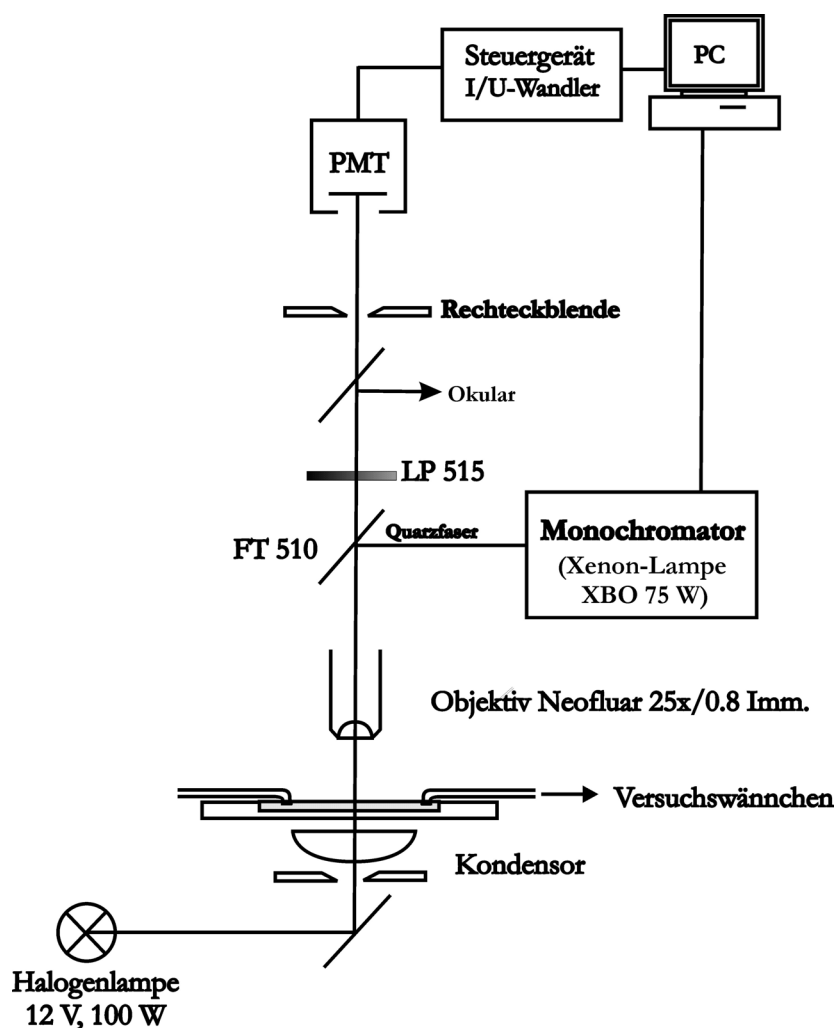


Abb. 2.3: Aufbau des Messplatzes zur mikrofluorometrischen Messung des  $\text{pH}_i$ -Wertes

#### 2.4.4 Kalibrierung des Fluoreszenzsignals

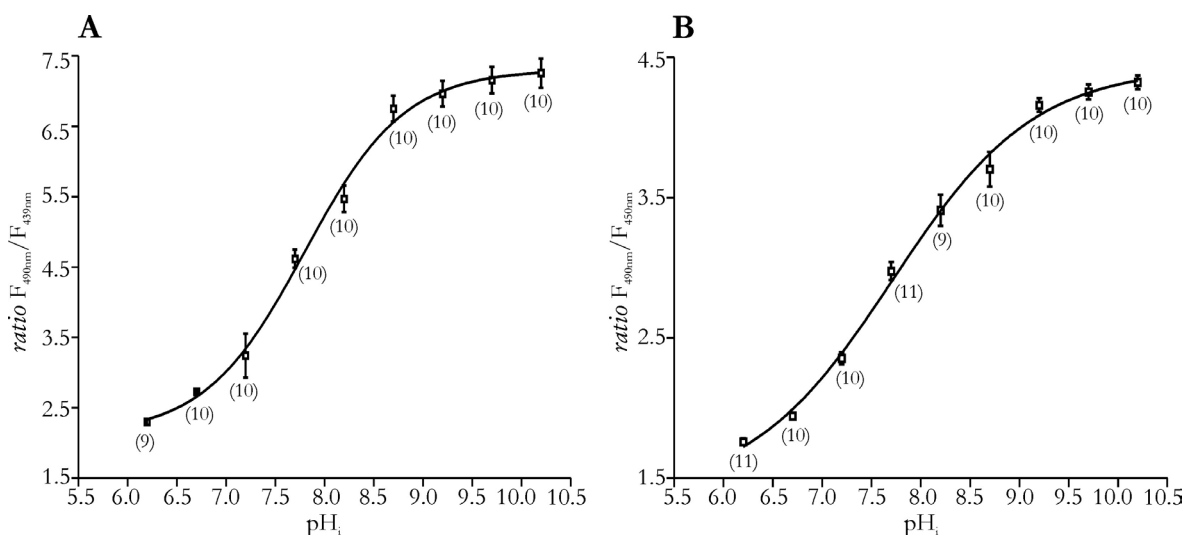
Die Kalibrierung des Fluoreszenzsignals wurde mit Hilfe der Nigericin-Methode vorgenommen. Dazu verwendet man eine extrazelluläre Ringerlösung deren  $\text{K}^+$ -Konzentration der intrazellulären  $\text{K}^+$ -Konzentration entspricht und die zusätzlich Nigericin enthält (Thomas et al. 1979, Hegyi et al. 2004). Nigericin ist ein

Kationenaustauscher, der sich in die Plasmamembran einlagert und  $K^+$  gegen  $H^+$  über die Membran transportiert. Wenn die extrazelluläre  $K^+$ -Konzentration ( $[K^+]_o$ ) der intrazellulären  $K^+$ -Konzentration ( $[K^+]_i$ ) entspricht werden solange Protonen über die Membran transportiert bis der extrazelluläre pH-Wert ( $pH_o$ ) dem  $pH_i$  entspricht.

$$[H^+]_o/[H^+]_i = [K^+]_o/[K^+]_i$$

Damit entspricht der in der Badlösung vorgegebene pH-Wert dem  $pH_i$ -Wert und die entsprechenden *ratio*  $F_{490}/F_{439}$ - bzw. *ratio*  $F_{490}/F_{450}$ -Werte können genau diesem  $pH_i$ -Wert zugeordnet werden (Deitmer & Schild 2000).

Zur Erstellung der Kalibrierungskurve wurden die präparierten Speicheldrüsen jeweils 200 s lang mit der Nigericin-haltigen Badlösung mit definiertem pH-Wert überspült. Es wurde eine Kalibrierungskurve für pH-Werte zwischen pH 6.2 - pH 10.2 in 0.5-er Schritten erstellt (Abb. 2.4 A & B).



**Abb. 2.4: Kalibrierung des Fluoreszenzsignals**

(A) Kalibrierungskurve für den Quotienten der Fluoreszenzintensitäten bei den Anregungswellenlängen 490 nm und 439 nm (*ratio*  $F_{490}/F_{439}$ ). Messwerte dargestellt als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. Anzahl der Messungen ist in Klammern angegeben. (B) Kalibrierungskurve für den Quotienten der Fluoreszenzintensitäten bei den Anregungswellenlängen 490 nm und 450 nm (*ratio*  $F_{490}/F_{450}$ ). Messwerte dargestellt als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. Die Anzahl der Messungen ist in Klammern angegeben.

## 2.5 Analyse der räumlichen Muster 5-HT-induzierter intrazellulärer $Ca^{2+}$ - & $pH_i$ -Änderungen

### 2.5.1 Verwendete Farbstoffe

Für diesen experimentellen Ansatz wurde der pH-empfindliche Fluoreszenzfarbstoff BCECF (siehe 2.4.1) und der  $Ca^{2+}$ -empfindliche Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 verwendet. Die BCECF-Fluoreszenz wurde hier alle 2 s für 5-40 ms bei 470 nm und 410 nm

angeregt und aus den bei beiden Wellenlängen angeregten Fluoreszenzintensitäten der Quotient *ratio*  $F_{470}/F_{410}$  berechnet.

Das Anregungsmaximum für die Fura-2-Fluoreszenz liegt bei 380 nm und verschiebt sich bei Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zu 340 nm. Dabei steigt die bei 340 nm gemessene Fluoreszenzintensität, und sinkt bei 380 nm. Die Anregung von Fura-2 erfolgte bei den Anregungswellenlängen 340 nm und 380 nm alle 2-15 s für 150-200 ms. Aus den gemessenen Fluoreszenzintensitäten bei den beiden Anregungswellenlängen wurde der Quotient *ratio*  $F_{340}/F_{380}$  gebildet. Am Ende eines Experiments wurde das Präparat mit 20 mM  $\text{MnCl}_2$  überspült.  $\text{MnCl}_2$  verdrängt  $\text{Ca}^{2+}$  von Fura-2 und löscht so die Fura-2-Fluoreszenz aus. Damit kann vorhandene Hintergrund- und Autofluoreszenz nachträglich herausgerechnet werden. Fura-2 wurde in der AM-Ester-Form, in einer Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  verwendet. Die Beladung der Speicheldrüsen erfolgte für 60 min bei RT auf einem Schüttler.

### 2.5.2 Aufnahme von Raum-Zeit-Diagrammen

Zur Analyse der räumlichen Muster 5-HT-induzierter intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{pH}_i$ -Änderungen wurden Raum-Zeit-Diagramme angefertigt. Die Aufnahme der dazu erforderlichen Daten erfolgte mit einem bildgebenden Verfahren (*Ratiometric Imaging*). Dazu wurden die Drüsen wie in 2.4.2 und 2.5.1 beschrieben beladen und das Versuchswännchen auf dem Tisch eines inversen Mikroskops befestigt (Axiovert 135TV, Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland). Als Objektiv wurde ein Fluar 20x/0.75 (Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland) verwendet. Zur Anregung der Fluoreszenz stand eine 75 Watt Xenon-Kurzbogenlampe zur Verfügung (Ushio, Steinhöring, Deutschland). Definierte Anregungswellenlängen wurden mit einem VisiChrom High-Speed Polychromator erzeugt (Visitron Systems, Puchheim, Deutschland). Das Anregungslicht wurde über einen Farbteiler FT 485 durch das Objektiv auf das Präparat gelenkt. Das vom Präparat abgestrahlte Fluoreszenzlicht gelangte über einen Emissionsfilter Bandpass 515-565 zu einer gekühlten CCD-Kamera (Cool Snap-HQ, Roper Scientific Inc., Tucson, USA). Die CCD-Kamera diente der Bildaufnahme und Digitalisierung der Messdaten. Sie besitzt eine Bildtiefe von 12 bit. Bei der Bildaufnahme wurden jeweils 16 Bildpunkte miteinander verrechnet (4 x 4 *binning*). Die Steuerung des Polychromators und der Bildaufnahme erfolgte über einen PC mit Hilfe des Programms MetaFluor 6.1 (Universal Imaging Corp., Downingtown, USA). Zur deskriptiven Auswertung dieser Daten wurden mittels SigmaPlot 10 (Version 10.0, Systat Software, Inc., 2006) Raum-Zeit-Diagramme angefertigt. In diesen wurden die intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ - oder  $\text{pH}_i$ -Änderungen über der Zeit und der Länge des betrachteten Drüsenabschnittes dargestellt. Die Darstellung erfolgte in Falschfarben. In Raum-Zeit-Diagrammen wurden Oszillationen durch gerade weiße Linien gekennzeichnet. Schräge weiße Linien kennzeichnen interzelluläre Wellen.



Zur Darstellung der Messkurven wurde in die digitalen Bilder eine *region of interest* gelegt, die ca. 2-3 nebeneinander liegende Zellen umfasste.

Auf eine Kalibrierung der Messwerte wurde hier verzichtet, da bei diesen Messungen der qualitative Aspekt im Vordergrund stand. Zudem sind die Beiträge von  $\text{pH}_i$  und  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in ruhenden und stimulierten Zellen bekannt (Zimmermann & Walz 1997 & 1999, Schewe et al. 2008).

## 2.6 Molekularbiologische Methoden

### 2.6.1 Zusammensetzung von Pufferlösungen für die Molekularbiologie

Tab. 2.5: Zusammensetzung von Puffern und Lösungen für die Molekularbiologie

<i>Firma</i>	<i>Lösung</i>	<i>Konzentration</i>	<i>Substanz</i>
Roth* <sup>1</sup>	Diethylpyrocarbonat (DEPC)-H <sub>2</sub> O	0.1%	DEPC
	Tris-acetat-EDTA (TAE)-Puffer (50x konzentriert)	1.5 M 5.71% 60 mM	Tris-Base Essigsäure EDTA
	Tris-EDTA (TE)-Puffer	10 mM 1 mM	Tris EDTA
	DNA-Gelladungspuffer	0.25% 0.25% 30%	Bromphenolblau Xylencyanol Glycerol
Roth* <sup>1</sup>	LB-Medium	10 g/l 5 g/l 10 g/l	Trypton Hefeextrakt NaCl
Roth* <sup>1</sup>	LB-Agar	10 g/l 5 g/l 10 g/l 15 g/l	Trypton Hefeextrakt NaCl Agar
Roboklon* <sup>2</sup>	Reaktionspuffer B	500 mM 0.1% 15 mM	Tris-HCl, pH 9.1 Triton X-100 MgCl <sub>2</sub>
Promega* <sup>3</sup>	Puffer D	6 mM 6 mM 150 mM 1 mM	Tris-HCl, pH 7.9 Mg <sub>2</sub> Cl NaCl DTT
Ambion / Applied Biosystems* <sup>4</sup>	DNase I-Puffer	100 mM 25 mM 5 mM	Tris-HCl, pH 7.5 Mg <sub>2</sub> Cl CaCl <sub>2</sub>

Firma: \*1) Roth (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland), \*2) Roboklon (Roboklon GmbH, Berlin, Deutschland)

\*3) Promega (Promega GmbH, Mannheim, Deutschland) \*4) Ambion / Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland \*5) Invitrogen

(Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland)

Tab. 2.6: Zusammensetzung der verwendeten *Kits* für die Molekularbiologie

<i>Kit</i>	<i>Firma</i>	<i>Lösung</i>	<i>Konzentration</i>	<i>Substanz</i>
<i>Mirco-Fast Track™ Kit 2.0</i>	Invitrogen* <sup>5</sup>	Stammpuffer	200 ml	NaCl
			200 mM	Tris-Cl, pH 7.5
		Lysepuffer	1.5 mM	MgCl <sub>2</sub>
			2%	Natriumdodecylsulfat (SDS)
		Bindungspuffer	20 µl	<i>Protein/RNase Degradier</i>
			1 ml	Stammpuffer
Waschpuffer	500 mM	NaCl		
	10 mM	Tris-Cl, pH 7.5		
Elutionspuffer	250 mM	NaCl		
	10 mM	Tris-Cl, pH 7.5		
<i>Superscript™ First Strand Synthesis System for RT-PCR</i>	Invitrogen* <sup>5</sup>	10x Reaktionspuffer	200 mM	Tris-Cl, pH 8.4
		dNTP-Mix	500 mM	KCl
			10 mM	je dATP, dCTP, dGTP, dTTP
<i>Superscript™ One-Step RT-PCR</i>	Invitrogen* <sup>5</sup>	2x Reaktionspuffer	0.4 mM	je dATP, dCTP, dGTP, dTTP
			2.4 mM	MgSO <sub>4</sub>
		RT/Platinum <sup>®</sup> Taq Mix		
<i>pGEM<sup>®</sup>-T-Vektor-System</i>	Promega* <sup>3</sup>	2x Ligationspuffer	60 mM	Tris-HCl, pH 7.8
			20 mM	MgCl <sub>2</sub>
			20 mM	Dithiothreitol (DTT)
			2 mM	ATP
			10%	Polyethylene Glycol
<i>peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I</i>	Peqlab* <sup>6</sup>	Lösung I/RNase A	k.A.	k.A.
		Lösung II	k.A.	k.A.
		Lösung III	k.A.	k.A.
		DNA-Waschpuffer	k.A.	k.A.

Firma: \*1) Roth (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland), \*2) Roboklon (Roboklon GmbH, Berlin, Deutschland)

\*3) Promega (Promega GmbH, Mannheim, Deutschland) \*4) Ambion / Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland \*5) Invitrogen

(Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) \*6) Peqlab (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland), k.A. = keine Angaben

zur Zusammensetzung der Lösungen seitens des Herstellers.

## 2.6.2 Gesamt-RNA-Extraktion

Für die Extraktion von Gesamt-RNA wurden 80 Speicheldrüsen von *Calliphora vicina* präpariert und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Die Proben wurden mit 750 µl Trizol™ (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) versetzt und homogenisiert (10 Streiche mit einem Glas-Teflon-Homogenisator). Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei RT wurden 200 µl Chloroform hinzugegeben und kurz geschüttelt. Es folgte eine Inkubation von 10 min bei RT. Anschließend wurden die Proben für 15 min bei 12000 g und 4°C zentrifugiert (Biofuge 15R, Heraeus, Hanau, Deutschland). Die wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und 500 µl Isopropanol hinzugegeben. Nach einer 10-minütigen Inkubation bei RT wurde für 10 min bei 12000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und verworfen. Zu dem verbleibenden RNA-Pellet wurde 1 ml 75% Ethanol (EtOH) gegeben und 5 min bei 7500 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das RNA-Pellet 10 min luftgetrocknet. Anschließend wurde die RNA in 50 µl DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst. Die Konzentration der extrahierten Gesamt-RNA wurde photometrisch durch Messung der Extinktion bei 260 nm bestimmt (Spektralphotometer Cary 50, Varian, Darmstadt,

Deutschland).

### 2.6.3 mRNA-Extraktion

Aus der Gesamt-RNA wurde die poly(A)<sup>+</sup>-RNA (mRNA) extrahiert. Dazu wurde das *Mirco-Fast Track™ Kit 2.0* der Firma Invitrogen (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) verwendet. Die Isolierung der mRNA erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Die gefällte Gesamt-RNA wurde 15 min bei 13000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das RNA-Pellet mit 100 µl 75% EtOH gewaschen. Die RNA wurde in 10 µl Elutionspuffer resuspendiert und 1 ml Lysepuffer hinzugefügt. Der Ansatz wurde 5 min bei 65°C erhitzt und anschließend 1 min auf Eis gestellt. Es wurden 65 µl 5 mM NaCl hinzugegeben. Die gesamte RNA-Lösung wurde auf Oligo(dT)-Cellulose pipettiert und 2 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Cellulose resuspendiert und 20 min auf einem Wippschüttler (CAT Ingenieurbüro M. Zipperer GmbH, Staufen, Deutschland) inkubiert. Der Ansatz wurde 5 min bei 4000 g und RT zentrifugiert (Biofuge Pico, Heraeus, Hanau, Deutschland). Der Überstand wurde entfernt, 1.3 ml Bindungspuffer hinzugegeben, die Cellulose resuspendiert und 5 min bei 7000 g zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde 2-fach wiederholt. Danach wurden 0.3 ml Bindungspuffer hinzugefügt, das Ganze vorsichtig auf eine Säule übertragen und 10 s bei 4000 g und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde aus dem Reaktionsgefäß entfernt und 500 µl Bindungspuffer auf die Säule pipettiert. Dieser Vorgang wurde 3-fach wiederholt. Die gebundene mRNA wurde mit 200 µl Waschpuffer gewaschen. Die Säule wurde in ein neues steriles Eppendorfgefäß überführt und die mRNA mit 200 µl Elutionspuffer eluiert. Die mRNA wurde mit 9 µl 2 mg/ml *Glycogen Carrier*, 27 µl 2 M Na-acetat und 540 µl 100% EtOH bei -80°C gefällt. Die Konzentration der extrahierten mRNA wurde photometrisch durch Messung der Extinktion bei 260 nm bestimmt (Spektralphotometer Cary 50, Varian, Darmstadt, Deutschland).

### 2.6.4 cDNA-Synthese

Zur cDNA-Synthese aus mRNA wurde das *Superscript™ First Strand Synthesis System for RT-PCR* der Firma Invitrogen (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) verwendet. Die extrahierte mRNA wurde in einer Konzentration von 0.5 µg/µl eingesetzt. Die cDNA-Synthese erfolgte durch den Einsatz von Oligo(dT)-Primern oder den Einsatz von Zufallshexameren. Ein Reaktionsansatz enthielt: 1 µl mRNA, 1 µl 10 mM dNTP-Mix, 1 µl 12-18 Nukleotid-lange Oligo(dT)-Primer oder 1 µl Zufallshexamere und 7 µl DEPC-H<sub>2</sub>O. Die Ansätze wurden 5 min auf 65°C erhitzt und anschließend für 1 min auf Eis gestellt. Es wurden 9 µl Reaktionslösung hinzugefügt. Oligo(dT)-Primer-Ansätze wurden 2 min bei 42°C inkubiert, Ansätze mit Zufallshexameren für 2 min bei 25°C. Es wurden 1 µl *Superscript™ II* Reverse Transkriptase hinzugegeben. Die Synthese der cDNA erfolgte in einem Thermoblock

(T3 Thermocycler, Biometra, Göttingen, Deutschland) unter folgenden Bedingungen: Ansätze mit Oligo(dT)-Primer 42°C für 50 min, Ansätze mit Zufallshexameren 25°C für 10 min und 42°C für 50 min. Anschließend 70°C für 15 min. Danach wurden die Ansätze auf Eis gekühlt. Es wurden 1 µl RNase H hinzupipettiert und bei 37°C für 20 min inkubiert. Die synthetisierte cDNA wurde bei -20°C aufbewahrt.

### 2.6.5 PCR mit degenerierten Primern

Zur Amplifizierung von spezifischen DNA-Sequenzabschnitten wurde die Polymeraseketten-Reaktion (PCR) eingesetzt. Ein Ansatz enthielt: 2 µl cDNA, 5 µl 10x Reaktionspuffer B der Firma Roboklon (Roboklon GmbH, Berlin, Deutschland), 0.5 µl 20 mM dNTPs, 1 µl Vorwärts-Primer (100 µM), 1 µl Rückwärts-Primer (100 µM), 40 µl DEPC-H<sub>2</sub>O. Die PCR erfolgte unter folgenden Bedingungen (Thermoblock, T3 Thermocycler, Biometra, Göttingen, Deutschland): 1 Zyklus Denaturierung der cDNA für 90 s bei 94°C, 35 Zyklen: 40 s Denaturierung bei 94°C, Anlagerung der Primer für 40 s bei 40 - 60°C (je nach verwendeter Primerkombination), Verlängerung 1 min pro Kilobase (kb) bei 72°C, 1 Zyklus 10 min bei 72°C für die abschließende Verlängerung.

Das Genom der Fliege *Calliphora vicina* ist noch nicht sequenziert und es liegen kaum Sequenzinformationen vor. Daher konnten für die Amplifikation der gesuchten DNA-Sequenzen keine spezifischen Primer verwendet werden. Für die gesuchten Sequenzinformationen wurden degenerierte Primer entwickelt. Dazu wurden bekannte Sequenzen von Insekten miteinander verglichen und nach konservierten Bereichen gesucht. In diesen Bereichen wurden die Primer ausgewählt. Die Synthese der degenerierten Primer erfolgte durch die Firma Tib MolBiol (Tib MolBiol GmbH, Berlin, Deutschland). Die genauen Primersequenzen sind im Anhang aufgeführt.

### 2.6.6 Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Agarosegelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wurde ein 1%-iges Agarosegel (Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf, Deutschland) in 1 x TAE-Puffer verwendet. Um die DNA-Fragmente sichtbar zu machen wurde der Agarose 1 µg/ml Ethidiumbromid hinzugefügt. Die DNA-Proben wurden mit 0.3 Vol. DNA-Ladungspuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Zur Größenbestimmung der Fragmente wurde ein 100 bp Marker (New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland) verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte bei einer Spannung von 75 Volt in mit Ethidiumbromid versetztem 1 x TAE-Puffer (Agarose-Horizontalgelelektrophorese, Hoefer™ HE33, Amersham Bioscience, Freiburg, Deutschland). Die Visualisierung der DNA-Banden erfolgte mittels einer Gel-Dokumentations-Anlage (Biostep, Jahnsdorf, Deutschland).

### 2.6.7 Fragmentisolierung

Die zu isolierenden Fragmente wurden elektrophoretisch aufgetrennt (siehe 2.6.6). Das Agarosegel wurde auf einen Transilluminator (TCP-26.LM, UV-Tisch 365/312 nm, Vilber Lormat, Eberhardzell, Deutschland) gelegt und die Fluoreszenz des Ethidiumbromids bei 312 nm angeregt. Die gewünschten Fragmente wurden mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und in eine vorbereitete Säule überführt. Die Säule bestand aus einem Eppendorfgefäß und einem darin befindlichen halben Reaktionsgefäß. Darin wurde mit einer heißen Kanüle ein Loch gestochen und mit silanisierter Glaswatte verschlossen. Die Proben wurden 2 min bei 6000 g und RT zentrifugiert. Die eluierte DNA wurde mit 1/10 Vol. 3 M Na-acetat und 2.5 Vol. 100 % EtOH gefällt.

### 2.6.8 Ligation und Transformation

Die isolierten DNA-Fragmente wurden in einen pGEM<sup>®</sup>-T-Vektor (pGEM<sup>®</sup>-T Vector-System, Promega GmbH, Mannheim, Deutschland) kloniert. Ein Ligationsansatz enthielt: 5 µl 2 x Ligationspuffer, 0.5 µl pGEM<sup>®</sup>-T-Vektor (50 ng), 3.5 µl isolierte DNA und 1 µl T4 DNA Ligase (3 Weiss Einheiten/µl). Die Inkubation erfolgte in einem Eisbad bei 4°C über Nacht.

Der Vektor, in den die Ligation erfolgte, wurde in *E.coli* transformiert. 100 µl kompetente *E.coli*-Zellen wurden mit 10 µl Ligationsansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Zur Aufnahme des Plasmids in die Zellen erfolgte ein Hitzeschock von 42°C für 45 s und folgend 2 min auf Eis. Die Zellen wurden in 900 µl LB-Medium überführt und 45 min bei 37°C und 350 rpm auf dem Schüttler (Thermomixer Comfort, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 2 min bei 6000 g pelletiert und in 100 µl LB-Medium resuspendiert. Dieser Ansatz wurde auf LB-Agar-Platten mit Carbenicillin (100 µg/ml) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### 2.6.9 Blau-Weiß-Selektion

Den LB-Agar-Platten (siehe 2.6.8) wurde zusätzlich der Farbstoff 5-Brom-4-Chlor-3-indolyl-β-D-galaktopyranosid (X-Gal) und der Induktor Isopropyl-Thio-D-Galaktopyranosid (IPTG) zugesetzt. Der pGEM<sup>®</sup>-T-Vektor enthält das lacZ-Gen, in dessen Region die Klonierungsstelle des Vektors liegt. Das lacZ-Gen kodiert für das Enzym β-Galaktosidase. Wird kein DNA-Fragment in den Vektor eingebaut bleibt das lacZ-Gen intakt und die β-Galaktosidase kann exprimiert werden. β-Galaktosidase setzt den farblosen Farbstoff X-Gal um und überführt ihn in ein entsprechendes Indoxylderivat, welches sich an der Luft blau färbt. Ist die Ligation in den Vektor erfolgreich ist das lacZ-Gen unterbrochen und kann nicht exprimiert werden. Die entsprechenden Kolonien bleiben weiß, da X-Gal hier nicht

umgewandelt werden kann. Weiße Kolonien wurden gepickt und in 5 ml LB-Medium mit 10  $\mu\text{l}$  50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Carbenicillin überführt. Die Ansätze wurden über Nacht auf dem Schüttler (*Environmental Shaker* ES-20, Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) bei 37°C inkubiert.

#### 2.6.10 Plasmidisolierung und Restriktionsverdau

Zur Plasmidisolierung wurde das *peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I* (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) verwendet und nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Es wurden 3.6 ml der Übernachtskultur in ein Eppendorfgefäß überführt und 1 min bei 10000 g und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in 250  $\mu\text{l}$  Lösung I/RNase A resuspendiert. Es wurden 250  $\mu\text{l}$  Lösung II hinzugefügt und durch vier- bis sechsmaliges Invertieren des Eppendorfgefäßes gemischt. Das entstehende klare Lysat wurde mit 350  $\mu\text{l}$  Lösung III versetzt und durch mehrmaliges Invertieren gemischt. Die Ansätze wurden 10 min bei 10000 g und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine HiBind<sup>®</sup>-Miniprep-Zentrifugensäule gegeben und 1 min bei 10000 g und RT zentrifugiert. Der Säulendurchfluss wurde verworfen und die gebundene Plasmid-DNA mehrmals mit Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurde die Plasmid-DNA mit 70  $\mu\text{l}$  DEPC-H<sub>2</sub>O eluiert.

Um die durch Ligation in den Vektor eingebrachten DNA-Fragmente zu überprüfen wurde ein Restriktionsverdau durchgeführt. Der verwendete pGEM<sup>®</sup>-T-Vektor enthält Schnittstellen für das Restriktionsenzym BstZ I. Damit kann das eingeführte DNA-Fragment herausgeschnitten werden. Ein Ansatz enthielt: 4  $\mu\text{l}$  isolierte Plasmid-DNA, 0.3  $\mu\text{l}$  BstZ I, 2  $\mu\text{l}$  Puffer D, 0.2  $\mu\text{l}$  Bovines Serumalbumin (BSA) und 13.5  $\mu\text{l}$  DEPC-H<sub>2</sub>O. Die Ansätze wurden 2 Stunden bei 50°C inkubiert, anschließend elektrophoretisch aufgetrennt (siehe 2.6.6) und die Größe überprüft.

Die Sequenzierung der klonierten DNA-Fragmente erfolgte durch die Firma GATC Biotech (GATC Biotech AG, Konstanz, Deutschland).

#### 2.6.11 RT-PCR

Die Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) wurde eingesetzt, um die mRNA der klonierten Fragmente spezifisch im Speicheldrüsengewebe nachzuweisen. Dazu wurde die RNA aus den Speicheldrüsen wie unter 2.6.2 beschrieben isoliert. Um Kontamination durch genomische DNA zu vermeiden wurde eine DNase-Behandlung durchgeführt. Ein Ansatz enthielt 1.1  $\mu\text{g}$  RNA gelöst in 5  $\mu\text{l}$  DEPC-H<sub>2</sub>O, 1  $\mu\text{l}$  10x DNase-Puffer (Ambion / Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland), 1  $\mu\text{l}$  DNase I (Ambion / Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) und 2.5  $\mu\text{l}$  DEPC-H<sub>2</sub>O. Für Negativkontrollen erfolgte zusätzlich eine kombinierte DNase / RNase-Behandlung (1.1  $\mu\text{g}$  RNA gelöst in 5  $\mu\text{l}$  DEPC-H<sub>2</sub>O, 1  $\mu\text{l}$  10x DNase-

Puffer, 1  $\mu\text{l}$  DNase I, 1  $\mu\text{l}$  RNase und 1.5  $\mu\text{l}$  DEPC-H<sub>2</sub>O). Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 37°C wurden jeweils 1  $\mu\text{l}$  DNase-Inaktivator (*DNase Inactivation Reagent*) hinzugegeben.

Für die RT-PCR wurden ausgehend von den sequenzierten Fragmenten spezifische Primer entwickelt. Diese wurden durch die Firma Tib MolBiol (Tib MolBiol GmbH, Berlin, Deutschland) hergestellt. Zur Durchführung der RT-PCR wurde das *Superscript™ One-Step RT-PCR Kit* der Firma Invitrogen (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) verwendet. Ein RT-PCR-Ansatz enthielt 100 ng/ $\mu\text{l}$  RNA (Positivkontrolle: DNase-behandelt, Negativkontrolle: DNase- & RNase-behandelt), 25  $\mu\text{l}$  Reaktionsmix, 1  $\mu\text{l}$  Vorwärts-Primer (10  $\mu\text{M}$ ), 1  $\mu\text{l}$  Rückwärts-Primer (10  $\mu\text{M}$ ), 1  $\mu\text{l}$  RT/Platinum® *Taq* Mix und 20  $\mu\text{l}$  DEPC-H<sub>2</sub>O. Die PCR erfolgte unter folgenden Bedingungen (Thermoblock, T3 Thermocycler, Biometra, Göttingen, Deutschland): 1 Zyklus cDNA-Synthese für 30 min bei 50°C, 1 Zyklus Denaturierung für 2 min bei 94°C, 35 Zyklen: 40 s Denaturierung bei 94°C, Anlagerung der Primer für 40 s bei 40 - 60°C (je nach verwendeter Primerkombination), Verlängerung 1 min pro kb bei 72°C, 1 Zyklus 10 min bei 72°C für die abschließende Verlängerung. Die elektrophoretische Auftrennung der Fragmente erfolgte wie unter 2.6.6 beschrieben.

## 2.7 Datenanalyse und Statistik

### 2.7.1 Bioinformatische Methoden

Zur Recherche von Sequenzinformationen und für BLAST-Analysen wurde die Datenbank des *National Center of Biotechnology Information* (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) genutzt. Die Bearbeitung und Analyse von Sequenzen erfolgte mit dem Programm BioEdit (Version 7.0.5.3, BioEdit Sequence Alignment Editor, Tom Hall, 1997).

### 2.7.2 Darstellung der Ergebnisse und Statistik

Zur graphischen Darstellung der Messwerte wurde das Programm SigmaPlot 10 (Version 10.0, Systat Software, Inc., 2006) verwendet. Die statistische Auswertung der pH<sub>i</sub>-Änderungen erfolgte mit Hilfe des Programms GraphPad Prism 4 (Version 4.01, GraphPad Software, Inc., 2004). Negative Werte stellen eine Ansäuerung dar, während positive Werte für eine Alkalisierung stehen. Die Datensätze wurden auf Normalverteilung getestet. Im Falle einer Normalverteilung wurden zwei abhängige Datensätze durch einen parametrischen gepaarten *t*-Test miteinander verglichen. Lag keine Normalverteilung vor wurden nicht-parametrische Tests verwendet. Bei zwei gepaarten Datensätzen wurde ein nicht-parametrischer *t*-Test (*Wilcoxon*-Test) angewendet. Bei mehr als zwei ungepaarten Datensätzen wurde eine *Ein-Wege-Anova* mit anschließendem *Dunn's post hoc*-Test durchgeführt. In allen Fällen

---

wurde das Signifikanzniveau auf  $P < 0.05$  festgelegt. Alle Werte wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (MW  $\pm$  SE) dargestellt.



## 3 Ergebnisse

### 3.1 Intrazellulärer pH-Wert in der unstimulierten Speicheldrüse von *Calliphora vicina*

Wesentliches Ziel dieser Arbeit war die Identifikation aller Transporter, die an der  $\text{pH}_i$ -Regulation in den Speicheldrüsen von *Calliphora vicina* mitwirken. Die  $\text{pH}_i$ -regulierenden Transporter sind teilweise an der Aufrechterhaltung des Ruhe- $\text{pH}_i$  in der unstimulierten Drüse beteiligt, als auch an Hormon-induzierten  $\text{pH}_i$ -Änderungen. Dieser Umstand erschwert die nachvollziehbare Präsentation der Fülle zu berücksichtigender Einzelergebnisse. Deshalb wurde bei der Präsentation der Ergebnisse wie folgt vorgegangen.

1. Viele Transporter nutzen den elektrochemischen Gradienten, der für ein Ion über der Plasmamembran besteht als Energiequelle zum Transport anderer Ionen. Derartige Transporter kann man experimentell identifizieren, wenn man durch Ionensubstitutionen in der Ringerlösung den betreffenden elektrochemischen Gradienten beeinflusst. Zudem existieren für viele Transporter teils hochselektive Hemmstoffe. Im ersten Abschnitt wird deshalb der Einfluss von Ionensubstitutionen und ausgewählten Hemmstoffen auf den Ruhe- $\text{pH}_i$  in der unstimulierten Drüse beschrieben.
2. Eine weitere Strategie zur Identifizierung und Charakterisierung  $\text{pH}_i$ -regulierender Transporter besteht darin, den  $\text{pH}_i$  experimentell zu verändern und anschließend zu messen, mit welcher Geschwindigkeit der Ruhe- $\text{pH}_i$  wieder hergestellt wird. Im zweiten Abschnitt wird deshalb die Charakterisierung der Wiederherstellung des Ruhe- $\text{pH}_i$  nach einer Ansäuerung bzw. Alkalisierung in der unstimulierten Drüse beschrieben.
3. Im letzten Abschnitt werden Experimente besprochen, die zur Identifizierung von  $\text{pH}_i$ -regulierenden Transportern, die an den 5-HT-induzierten  $\text{pH}_i$ -Änderungen beteiligt sind, beitragen.

Diese Darstellung der Ergebnisse bringt zwangsläufig eine Redundanz von Informationen mit sich. Sie erscheint dennoch sinnvoll, um die Fülle der Einzelbeobachtungen in einen logischen Zusammenhang zu bringen.

#### 3.1.1 Aufrechterhaltung des Ruhe- $\text{pH}_i$

Der Ruhe- $\text{pH}_i$  in den Speicheldrüsen von *Calliphora vicina* beträgt  $7.53 \pm 0.34$  (Schewe 2005). Deshalb existiert in der unstimulierten Drüse ein stark einwärts gerichteter elektrochemischer  $\text{H}^+$ -Gradient. Die Zellen müssen also einer schleichenden Ansäuerung durch  $\text{pH}_i$ -regulierende Mechanismen entgegenwirken. Eine aktive

pH<sub>i</sub>-Regulation erfolgt durch verschiedene Transportsysteme und der Ruhe-pH<sub>i</sub>-Wert ist das Ergebnis von alkalisierenden und ansäuernden Prozessen. In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Inhibitoren und Ionensubstitutionen verwendet, um pH<sub>i</sub>-regulierende Transportsysteme zu identifizieren. Diese Ergebnisse gaben erste Hinweise auf die Identität der Transporter, die in den Speicheldrüsen von *Calliphora vicina* an der pH<sub>i</sub>-Regulation beteiligt sind.

Alkalisierende pH<sub>i</sub>-regulierende Transporter (*acid extruder*, Abb. 1.1 A) sind, bis auf die V-ATPase, in erster Linie, Na<sup>+</sup>-abhängig. Die Energie des einwärts gerichteten elektrochemischen Na<sup>+</sup>-Gradienten wird genutzt, um H<sup>+</sup> aus der Zelle heraus oder HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> in die Zelle hinein zu transportieren. Dazu zählen der Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Antiporter (NHE), ein einwärts gerichteter Na<sup>+</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Cotransporter (NBC) und der Na<sup>+</sup>-getriebene Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Antiporter (NDCBE). In Na<sup>+</sup>-freier Lösung sind diese Transporter blockiert, und es ist eine intrazelluläre Ansäuerung zu erwarten. Abb. 3.3 A, 3.15 A, 3.19 A und Abb. 3.1 zeigen, dass unter Na<sup>+</sup>-freien Bedingungen entgegen dieser Erwartung eine intrazelluläre Alkalisierung von 0.19 ± 0.03 pH-Einheiten (n = 29) auftrat. Weiterführende Untersuchungen ergaben, dass diese ganz ungewöhnliche Beobachtung auf einen Na<sup>+</sup>-abhängigen Glutamat-Transporter zurückzuführen ist. Dieser Transporter wird in Kapitel 3.2 gesondert dargestellt.

Der NHE kann mit dem Hemmstoff 5-(N-Ethyl-N-isopropyl)-Amiloride (EIPA) spezifisch blockiert werden (Vigne et al. 1983). Wäre der NHE entscheidend an der Regulation des Ruhe-pH<sub>i</sub> beteiligt, müsste eine Blockierung mit EIPA zu einer intrazellulären Ansäuerung führen. Dieser Effekt trat jedoch nicht auf. Die durch EIPA hervorgerufene pH<sub>i</sub>-Änderung betrug lediglich 0.05 ± 0.06 pH-Einheiten (n = 11, Abb. 3.4 A, Abb. 3.19 C & Abb. 3.1). Der NHE hat somit keinen messbaren Einfluss auf den Ruhe-pH<sub>i</sub>.

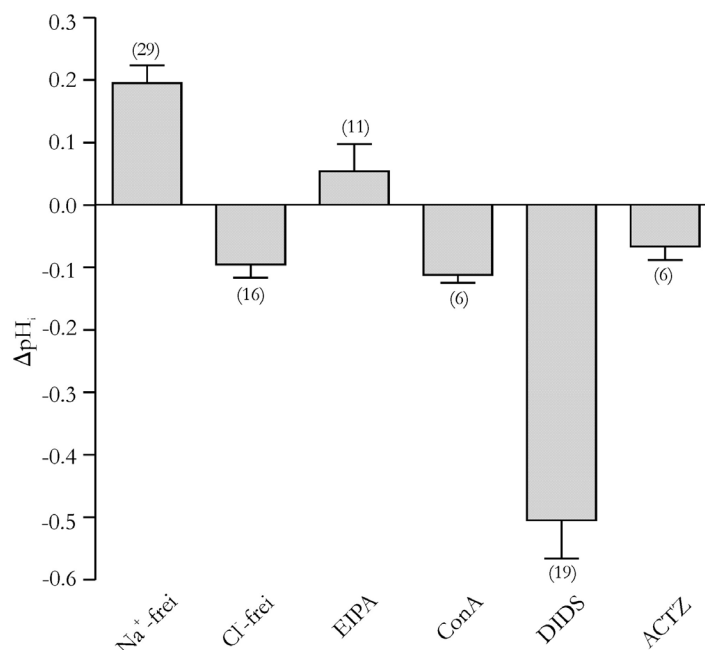
Der einwärts gerichtete NBC und NDCBE transportieren Na<sup>+</sup>-abhängig, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> in die Zelle hinein. Eine charakteristische Eigenschaft HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-abhängiger Transportsysteme ist, dass die Mehrzahl (jedoch nicht alle) durch die Verwendung des Stilbenderivats 4,4-Diisothiocyano-2,2-disulfonat (DIDS) blockierbar ist (Boron 2001). Die Applikation von DIDS induzierte eine starke Ansäuerung von -0.50 ± 0.06 pH-Einheiten (n = 19, Abb. 3.5 A, Abb. 3.9 E, Abb. 3.20 C & Abb. 3.1). Das Ergebnis deutet darauf hin, dass HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-abhängige Transporter in den Speicheldrüsen von *Calliphora vicina* eine wichtige Rolle bei der Regulation des pH<sub>i</sub>-Wertes spielen. Da DIDS zu einer Ansäuerung führte, kommen dafür alkalisierende Transportsysteme, wie der einwärts gerichtete NBC und der NDCBE, in Frage.

Die apikal lokalisierte V-ATPase ist ebenfalls ein alkalisierendes Transportsystem. Um zu testen, ob die V-ATPase an der pH<sub>i</sub>-Regulation in der unstimulierten Speicheldrüse beteiligt ist, wurde zur Blockierung der V-ATPase der spezifische

Hemmstoff Concanamycin A appliziert (Dröse & Altendorf 1997, Huss et al. 2002). Concanamycin A verursachte eine Ansäuerung von  $-0.11 \pm 0.01$  pH-Einheiten ( $n = 6$ , Abb. 3.3 E & Abb. 3.1). Dies zeigt eindeutig, dass die V-ATPase in der unstimulierten Drüse an der Regulation des  $\text{pH}_i$ -Wertes beteiligt ist.

Wichtige ansäuernde  $\text{pH}_i$ -Regulationsmechanismen (*acid loader*, Abb. 1.1 B) sind der  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Antiporter (AE) und der auswärts gerichtete NBC. Unter Kontrollbedingungen transportiert der AE  $\text{HCO}_3^-$  aus der Zelle heraus und parallel  $\text{Cl}^-$  in die Zelle hinein. Er wirkt damit ansäuernd. Entfernt man  $\text{Cl}^-$  aus der Badlösung wird der auswärts gerichtete Gradient für  $\text{Cl}^-$  verstärkt und der AE würde in diesem Fall  $\text{HCO}_3^-$  in die Zelle hinein transportieren. Daraus resultierend wäre eine intrazelluläre Alkalisierung zu erwarten. In den *Calliphora* Speicheldrüsen war in  $\text{Cl}^-$ -freier Lösung keine Alkalisierung, sondern eine intrazelluläre Ansäuerung von  $-0.10 \pm 0.02$  pH-Einheiten ( $n = 16$ ) (Abb. 3.1) zu beobachten. Auffällig war zudem, dass die auftretende Ansäuerung nicht schnell erfolgte, sondern der  $\text{pH}_i$  über die Zeit nur langsam abnahm (siehe Abb. 3.6 A, Abb. 3.9 A & Abb. 3.20 A).

AE und NBC transportieren  $\text{HCO}_3^-$  aus der Zelle heraus. Dabei spielt die Carboanhydrase eine entscheidende Rolle, denn dieses Enzym katalysiert die reversible Hydratation von  $\text{CO}_2$  zu  $\text{H}_2\text{CO}_3$ . Der Zerfall von  $\text{H}_2\text{CO}_3$  in  $\text{HCO}_3^-$  und  $\text{H}^+$  erfolgt spontan (Breton 2001, Tripp et al. 2001). Deshalb kann die Carboanhydrase intrazellulär  $\text{HCO}_3^-$  bereitstellen.  $\text{HCO}_3^-$  dient zum einen als intrazellulärer Puffer und zum anderen als Substrat für ansäuernde Transporter, wie den AE und den auswärts gerichteten NBC. Eine Blockierung der Carboanhydrase mit Acetazolamid (Supuran et al. 2003, Nishimori et al. 2005) reduziert die Verfügbarkeit von intrazellulärem  $\text{HCO}_3^-$ . In den *Calliphora* Speicheldrüsen induzierte die Applikation von Acetazolamid eine schwache Ansäuerung von  $-0.07 \pm 0.02$  pH-Einheiten ( $n = 6$ , Abb. 3.10 A & Abb. 3.1). Die Aktivität der Carboanhydrase hat somit keinen messbaren Einfluss auf den Ruhe- $\text{pH}_i$ .



**Abb. 3.1:** Einfluss von extrazellulärem Na<sup>+</sup> & Cl<sup>-</sup> und von Hemmstoffen für den NHE, die V-ATPase, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Transporter und die Carboanhydrase auf den Ruhe-pH<sub>i</sub>-Wert in der unstimulierten Speicheldrüse von *Calliphora vicina*

Die Wegnahme von extrazellulärem Na<sup>+</sup> führte zu einer intrazellulären Alkalisierung. Cl<sup>-</sup>-freie Bedingungen führten zu einer intrazellulären Ansäuerung. Concanamycin A (Con A), DIDS und Acetazolamid (ACTZ) führten ebenfalls zu einer intrazellulären Ansäuerung. EIPA hatte keinen messbaren Effekt auf den Ruhe-pH<sub>i</sub>. Die Anzahl der Experimente ist in Klammern angegeben, MW ± SE.

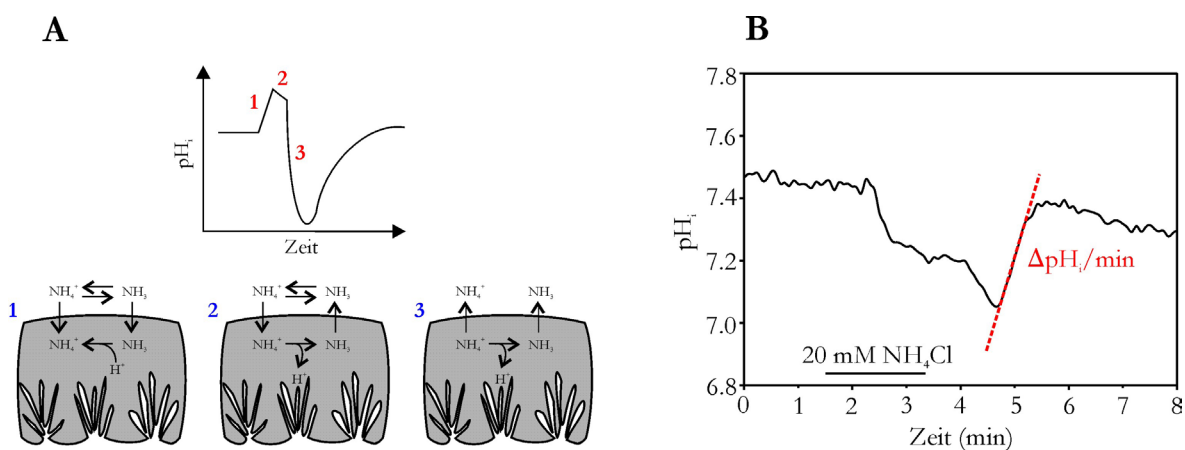
Zusammenfassend lieferten diese Ergebnisse erste Informationen über die Identität der Transporter, die in den unstimulierten *Calliphora* Speicheldrüsen an der pH<sub>i</sub>-Regulation beteiligt sind. Der Ruhe-pH<sub>i</sub> war zum großen Teil DIDS-sensitiv. Dies gab einen ersten Hinweis auf eine HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-abhängige pH<sub>i</sub>-Regulation. Zudem ist die V-ATPase an der Aufrechterhaltung des Ruhe-pH<sub>i</sub> beteiligt. Der NHE hingegen hat bei der Aufrechterhaltung des Ruhe-pH<sub>i</sub> keinen messbaren Einfluss.

### 3.1.2 Erholung von einer intrazellulären Ansäuerung - NH<sub>4</sub>Cl-Vorpuls-Methode

Die oben beschriebenen Ergebnisse ermöglichten eine erste Orientierung über die Transportmechanismen, die an der pH<sub>i</sub>-Regulation unstimulierter Drüsen beteiligt sein könnten. Eine bewährte Strategie zur Identifizierung an der pH<sub>i</sub>-Regulation beteiligter Transporter besteht darin, der Zelle experimentell eine pH<sub>i</sub>-Änderung aufzuzwingen und den Einfluss definierter Parameter auf die Geschwindigkeit zu untersuchen, mit der sich der Ruhe-pH<sub>i</sub> wieder einstellt. Mit dieser Strategie wurde zunächst untersucht, welche Mechanismen entscheidend sind um nach einer intrazellulären Ansäuerung den Ruhe-pH<sub>i</sub> wieder herzustellen. Die künstliche Ansäuerung wurde durch Anwendung der NH<sub>4</sub>Cl-Vorpuls-Methode hervorgerufen. Die *Calliphora* Speicheldrüsen wurden mit Ringerlösung überspült die 20 mM NH<sub>4</sub>Cl enthielt. In NH<sub>4</sub>Cl-haltiger Lösung dissoziiert NH<sub>4</sub><sup>+</sup> in NH<sub>3</sub> und H<sup>+</sup>. NH<sub>3</sub> diffundiert in die Zellen und verursacht in vielen Zellen eine intrazelluläre Alkalisierung, weil es in der Zelle durch Aufnahme eines Protons zu

$\text{NH}_4^+$  ionisiert wird (Abb. 3.2 A 1). Da auch  $\text{NH}_4^+$  langsam über die Zellmembran in die Zelle diffundiert, kommt es nachfolgend zu einer schleichenden Ansäuerung (Abb. 3.2 A 2). Nach dem Ausspülen des  $\text{NH}_4\text{Cl}$  verlässt  $\text{NH}_3$  die Zelle sehr schnell wieder.  $\text{H}^+$  bleiben in der Zelle zurück und es kommt zu einer starken intrazellulären Ansäuerung (Abb. 3.2 A 3). Von dieser Ansäuerung kann sich die Zelle nur durch aktive  $\text{pH}_i$ -Regulation erholen (Roos & Boron 1981, Deitmer & Schild 2000, Boron 2004).

In den Speicheldrüsen von *Calliphora vicina* kam es beim Einspülen des  $\text{NH}_4\text{Cl}$  nicht zu der meist beobachteten Alkalisierung. 20 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  induzierten eine intrazelluläre Ansäuerung von  $-0.26 \pm 0.02$  pH-Einheiten ( $n = 69$ , Abb. 3.2 B). Dieses Phänomen beobachtet man, wenn die Zellmembran für  $\text{NH}_4^+$  permeabel ist. Nach dem Auswaschen des  $\text{NH}_4\text{Cl}$  kam es zu einer weiteren Ansäuerung von  $-0.20 \pm 0.02$  pH-Einheiten ( $n = 69$ , Abb. 3.2 B). Die Erholung von dieser Ansäuerung wurde unter Kontrollbedingungen und unter veränderten Bedingungen (Ionensubstitutionen und Hemmstoffe) gemessen und ausgewertet. Zur Bestimmung der Erholungsrate wurde eine lineare Regression durchgeführt (innerhalb der ersten 3 min nach Beginn der Erholung). Die Erholungsrate wird in  $\Delta\text{pH}_i/\text{min}$  angegeben (Abb. 3.2 B). Die Zellen erholten sich mit einer durchschnittlichen Geschwindigkeit von  $0.32 \pm 0.03$   $\Delta\text{pH}_i/\text{min}$  von der intrazellulären Ansäuerung. Zusätzlich wurden die folgenden Parameter ausgewertet: der Betrag der Ansäuerung beim Einspülen von 20 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  in  $\Delta\text{pH}_i$ , der Betrag der Ansäuerung beim Auswaschen von  $\text{NH}_4\text{Cl}$  in  $\Delta\text{pH}_i$  und die Zeit der halbmaximalen Erholung  $t_{1/2}$  in s (Zeitspanne in der die Hälfte des  $\text{pH}_i$ -Ausgangswertes erreicht wurde).  $t_{1/2}$  betrug unter Kontrollbedingungen durchschnittlich  $94 \pm 12$  s. Die numerischen Werte der ausgewerteten Parameter sind in den entsprechenden Abschnitten, zur besseren Übersicht, tabellarisch dargestellt.



**Abb. 3.2:**  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Vorpuls-Methode in den Speicheldrüsen von *Calliphora vicina*

(A) Mechanismus der  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Vorpuls-Methode (nach Deitmer & Schild 2000).  $\text{NH}_4^+$  dissoziiert in  $\text{NH}_3$  und  $\text{H}^+$ .  $\text{NH}_3$  diffundiert in die Zelle und induziert eine intrazelluläre Alkalisierung<sup>1)</sup>.  $\text{NH}_4^+$  gelangt nur langsam über die Zellmembran und ist für die schleichende Ansäuerung verantwortlich<sup>2)</sup>. Nach dem Auswaschen des  $\text{NH}_4\text{Cl}$  verlässt  $\text{NH}_3$  die Zelle rasch und es kommt zu einer starken intrazellulären Ansäuerung<sup>3)</sup>. (B) In den Speicheldrüsen von *Calliphora vicina* induzierte 20 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  eine intrazelluläre Ansäuerung. Nach dem Auswaschen des  $\text{NH}_4\text{Cl}$  erfolgte eine weitere Ansäuerung.  $\Delta\text{pH}_i/\text{min}$  kennzeichnet die Erholungsrate von der  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -induzierten Ansäuerung.

Transporter die einer intrazellulären Ansäuerung entgegenwirken, sind bis auf die V-ATPase, überwiegend  $\text{Na}^+$ -abhängig. Um eine Beteiligung dieser Transportsysteme zu untersuchen wurde die  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Vorpuls-Methode unter  $\text{Na}^+$ -freien Bedingungen durchgeführt (Tab. 3.1, Abb. 3.3 A). Der Betrag der  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -induzierten Ansäuerung war unter  $\text{Na}^+$ -freien Bedingungen signifikant größer als unter Kontrollbedingungen ( $n = 6$ , gepaarter  $t$ -Test,  $P < 0.01$ , Abb. 3.3 B). Auffällig war, dass bei Abwesenheit von  $\text{Na}^+$ , beim Einspülen des  $\text{NH}_4\text{Cl}$  eine transiente Alkalisierung zu beobachten war. Dies könnte bedeuten, dass der Transport von  $\text{NH}_4^+$  über die Membran,  $\text{Na}^+$ -abhängig erfolgt. Auch die Ansäuerung nach dem Auswaschen des  $\text{NH}_4\text{Cl}$  war in  $\text{Na}^+$ -freiem Ringer signifikant stärker als unter Kontrollbedingungen ( $n = 6$ , gepaarter  $t$ -Test,  $P < 0.05$ , Abb. 3.3 B). Die Erholungsrate war unter diesen Bedingungen signifikant schneller ( $n = 6$ , gepaarter  $t$ -Test,  $P < 0.05$ , Abb. 3.3 C), während  $t_{1/2}$  statistisch nicht signifikant beeinflusst wurde ( $n = 6$ , *Wilcoxon*-Test,  $P > 0.05$ , Abb. 3.3 D).

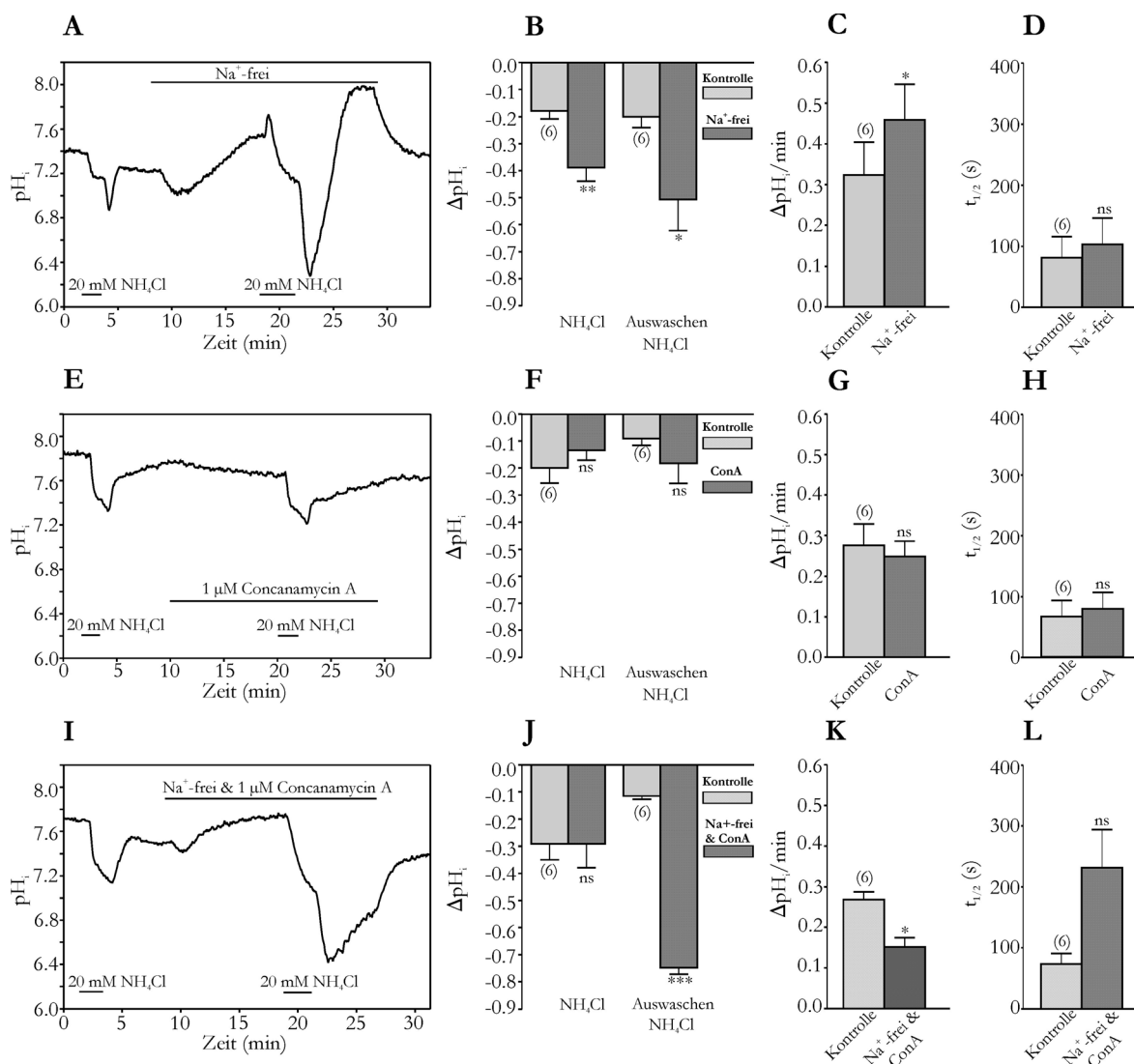
Der Beitrag der V-ATPase zur aktiven  $\text{pH}_i$ -Regulation wurde durch die Verwendung von Concanamycin A untersucht (Tab. 3.1, Abb. 3.3 E). 1  $\mu\text{M}$  Concanamycin A hatte keinen Effekt auf die  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -induzierte Ansäuerung und die auftretende Ansäuerung nach dem Auswaschen des  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ( $n = 6$ , gepaarter  $t$ -Test,  $P > 0.05$ , Abb. 3.3 F). Auch die Erholungsrate ( $n = 6$ , gepaarter  $t$ -Test,  $P > 0.05$ , Abb. 3.3 G) und  $t_{1/2}$  ( $n = 6$ , *Wilcoxon*-Test,  $P > 0.05$ , Abb. 3.3 H) wurden durch Concanamycin A nicht signifikant beeinflusst.

Wird die V-ATPase unter  $\text{Na}^+$ -freien Bedingungen gehemmt sind alle bekannten alkalisierenden Transportmechanismen blockiert (Tab. 3.1, Abb. 3.3 I). Unter diesen Bedingungen war die intrazelluläre Ansäuerung nach Zugabe von  $\text{NH}_4\text{Cl}$  nicht verstärkt ( $n = 6$ , gepaarter  $t$ -Test,  $P > 0.05$ , Abb. 3.3 J). Die nach dem Auswaschen von  $\text{NH}_4\text{Cl}$  auftretende Ansäuerung war jedoch signifikant größer ( $n = 6$ , gepaarter  $t$ -Test,  $P < 0.0001$ , Abb. 3.3 J). Die Blockierung der V-ATPase unter  $\text{Na}^+$ -freien Bedingungen führte zudem zu einer signifikanten Verlangsamung der Erholungsrate ( $n = 6$ , gepaarter  $t$ -Test,  $P < 0.05$ , Abb. 3.3 K).  $t_{1/2}$  wurde unter diesen experimentellen Bedingungen nicht signifikant beeinflusst ( $n = 6$ , gepaarter  $t$ -Test,  $P > 0.05$ , Abb. 3.3 L), obgleich eine Tendenz zu einer Erhöhung von  $t_{1/2}$  zweifelsfrei zu erkennen ist.

Diese Ergebnisse zeigen, dass in der unstimulierten Drüse u.a. die V-ATPase und eine  $\text{Na}^+$ -abhängige Komponente an der aktiven  $\text{pH}_i$ -Regulation beteiligt sind. Wird ein System blockiert, ist das andere in der Lage, die „Lücke zu füllen“ und die  $\text{pH}_i$ -Regulation aufrecht zu erhalten. Der Anteil der V-ATPase an der  $\text{pH}_i$ -Regulation wird unter  $\text{Na}^+$ -freien Bedingungen sichtbar.

Tab. 3.1:  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Vorpuls: Einfluss von extrazellulärem  $\text{Na}^+$  und Concanamycin A

	Ansäuerung $\text{NH}_4\text{Cl}$ ( $\Delta\text{pH}_i$ )	Ansäuerung Auswaschen $\text{NH}_4\text{Cl}$ ( $\Delta\text{pH}_i$ )	$\Delta\text{pH}_i/\text{min}$	$t_{1/2}$ (s)
Kontrolle	$-0.18 \pm 0.03$	$-0.20 \pm 0.04$	$0.32 \pm 0.08$	$82 \pm 34$
$\text{Na}^+$ -frei	$-0.39 \pm 0.05^{**}$	$-0.50 \pm 0.11^*$	$0.46 \pm 0.09^*$	$103 \pm 43$
Kontrolle	$-0.20 \pm 0.06$	$-0.09 \pm 0.03$	$0.28 \pm 0.05$	$67 \pm 26$
ConA	$-0.13 \pm 0.04$	$-0.18 \pm 0.07$	$0.25 \pm 0.04$	$79 \pm 27$
Kontrolle	$-0.29 \pm 0.06$	$-0.12 \pm 0.01$	$0.26 \pm 0.02$	$73 \pm 18$
$\text{Na}^+$ -frei & ConA	$-0.29 \pm 0.09$	$-0.75 \pm 0.02^{**}$	$0.15 \pm 0.02^*$	$232 \pm 63$

Abb. 3.3:  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Vorpuls: Beitrag der V-ATPase und  $\text{Na}^+$ -abhängiger Transportsysteme zur aktiven  $\text{pH}_i$ -Regulation in den Speicheldrüsen von *Calliphora vicina*

(A)-(D) Effekt von  $\text{Na}^+$ -freiem Ringer,  $n = 6$ . (B)  $\text{Na}^+$ -Abhängigkeit der  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -induzierten Ansäuerung (gepaarter  $t$ -Test,  $P < 0.01$ ) und der Ansäuerung nach dem Ausspülen von  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (gepaarter  $t$ -Test,  $P < 0.05$ ) in pH-Einheiten. (C)  $\text{Na}^+$ -Abhängigkeit der Erholungsrate  $\Delta\text{pH}_i/\text{min}$  (gepaarter  $t$ -Test,  $P < 0.05$ ). (D)  $\text{Na}^+$ -Abhängigkeit von  $t_{1/2}$  in s (Wilcoxon-Test,  $P > 0.05$ ). (E)-(H) Beitrag der V-ATPase zur aktiven  $\text{pH}_i$ -Regulation,  $n = 6$ . Hemmung der V-ATPase mit  $1 \mu\text{M}$  Concanamycin A (F) Effekt von Concanamycin A auf die  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -induzierte Ansäuerung (gepaarter  $t$ -Test,  $P > 0.05$ ) und die Ansäuerung nach dem Ausspülen von  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (gepaarter  $t$ -Test,  $P > 0.05$ ) in pH-Einheiten. (G) Effekt von Concanamycin A auf die Erholungsrate  $\Delta\text{pH}_i/\text{min}$  (gepaarter  $t$ -Test,  $P > 0.05$ ). (H) Effekt von Concanamycin A auf  $t_{1/2}$  in s (Wilcoxon-Test,  $P > 0.05$ ). (I)-(L) Beitrag der V-ATPase zur aktiven  $\text{pH}_i$ -Regulation unter  $\text{Na}^+$ -freien Bedingungen,  $n = 6$ . (J) Effekt von Concanamycin A in  $\text{Na}^+$ -freiem Ringer auf die  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -induzierte Ansäuerung (gepaarter  $t$ -Test,  $P > 0.05$ ) und die Ansäuerung nach dem Ausspülen von  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (gepaarter  $t$ -Test,  $P < 0.0001$ ) in pH-Einheiten. (K) Effekt von Concanamycin A in  $\text{Na}^+$ -freiem Ringer auf die Erholungsrate  $\Delta\text{pH}_i/\text{min}$  (gepaarter  $t$ -Test,  $P < 0.05$ ). (L) Effekt von Concanamycin A in  $\text{Na}^+$ -freiem Ringer auf  $t_{1/2}$  in s (gepaarter  $t$ -Test,  $P > 0.05$ ). (A)-(L) MW  $\pm$  SE, Anzahl der Experimente ist in Klammern angegeben.

Es gibt mehrere  $\text{Na}^+$ -abhängige Transportsysteme, die einer intrazellulären Ansäuerung entgegenwirken können. Dazu zählen NHE, einwärts gerichteter NBC und NDCBE. Diese können pharmakologisch unterschieden werden. EIPA ist ein selektiver Hemmstoff für den NHE. In der Gegenwart von 50  $\mu\text{M}$  EIPA (Tab. 3.2, Abb. 3.4 A) war die  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -induzierte Ansäuerung signifikant größer ( $n = 6$ , gepaarter  $t$ -Test,  $P < 0.01$ , Abb. 3.4 B). Auch die folgende Ansäuerung durch das Auswaschen des  $\text{NH}_4\text{Cl}$  war in Gegenwart von EIPA signifikant stärker als unter Kontrollbedingungen ( $n = 6$ , gepaarter  $t$ -Test,  $P < 0.05$ , Abb. 3.4 B).  $t_{1/2}$  war in der Gegenwart von EIPA ebenfalls signifikant größer ( $n = 6$ , gepaarter  $t$ -Test,  $P < 0.05$ , Abb. 3.4 D). EIPA hatte jedoch keinen Einfluss auf die Erholungsrate von der durch  $\text{NH}_4\text{Cl}$  hervorgerufenen Ansäuerung ( $n = 6$ , gepaarter  $t$ -Test,  $P > 0.05$ , Abb. 3.4 C).

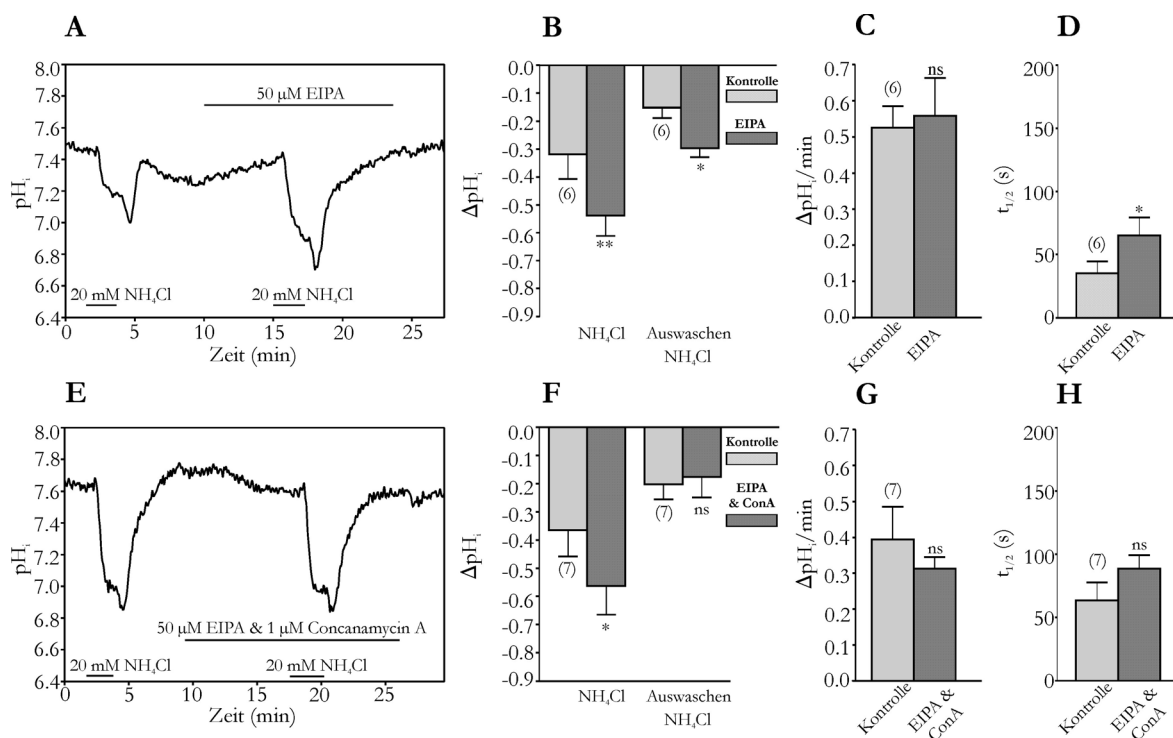
Vorangegangene Experimente hatten gezeigt, dass die aktive  $\text{pH}_i$ -Regulation in den Speicheldrüsen von *Calliphora vicina* unter  $\text{Na}^+$ -freien Bedingungen Concanamycin A-sensitiv war. Aus diesem Grund wurde überprüft welchen Einfluss die Kombination von EIPA & Concanamycin A auf die  $\text{pH}_i$ -Regulation hat (Tab. 3.2, Abb. 3.4 E). In der Gegenwart von EIPA & Concanamycin A war die  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -induzierte Ansäuerung signifikant verstärkt ( $n = 7$ , *Wilcoxon*-Test,  $P < 0.05$ , Abb. 3.4 F). Die auftretende Ansäuerung nach dem Auswaschen von  $\text{NH}_4\text{Cl}$  war jedoch nicht beeinflusst ( $n = 7$ , *Wilcoxon*-Test,  $P > 0.05$ , Abb. 3.4 F). Auch die Erholungsrate und  $t_{1/2}$  waren nicht signifikant verschieden ( $n = 7$ , gepaarter  $t$ -Test,  $P > 0.05$ , Abb. 3.4 G & H).

Die Verstärkung der Ansäuerung in Gegenwart von EIPA bzw. EIPA & Concanamycin A deutet ein Vorhandensein des NHE an. Bei der aktiven  $\text{pH}_i$ -Regulation in der unstimulierten Drüse spielt der NHE aber offenbar keine entscheidende Rolle.

**Tab. 3.2:  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Vorpuls: Einfluss von EIPA und Concanamycin A**

	Ansäuerung $\text{NH}_4\text{Cl}$ ( $\Delta\text{pH}_i$ )	Ansäuerung Auswaschen $\text{NH}_4\text{Cl}$ ( $\Delta\text{pH}_i$ )	$\Delta\text{pH}_i/\text{min}$	$t_{1/2}$ (s)
Kontrolle	$-0.32 \pm 0.09$	$-0.15 \pm 0.03$	$0.53 \pm 0.06$	$35 \pm 10$
EIPA	$-0.54 \pm 0.07^{**}$	$-0.30 \pm 0.03^*$	$0.56 \pm 0.10$	$65 \pm 14^*$
Kontrolle	$-0.36 \pm 0.10$	$-0.20 \pm 0.05$	$0.39 \pm 0.09$	$64 \pm 14$
EIPA & ConA	$-0.56 \pm 0.10$	$-0.18 \pm 0.07$	$0.31 \pm 0.03$	$89 \pm 11$





**Abb. 3.4: NH<sub>4</sub>Cl-Vorpuls: Beitrag des NHE und der V-ATPase zur aktiven pH<sub>i</sub>-Regulation in den Speicheldrüsen von *Calliphora vicina***

(A)-(D) Beitrag des NHE an der aktiven pH<sub>i</sub>-Regulation, n = 6. Hemmung des NHE mit 50 μM EIPA (B) Effekt von EIPA auf die NH<sub>4</sub>Cl-induzierte Ansäuerung (gepaarter *t*-Test,  $P < 0.01$ ) und die Ansäuerung nach dem Ausspülen von NH<sub>4</sub>Cl (gepaarter *t*-Test,  $P < 0.05$ ) in pH-Einheiten. (C) Effekt von EIPA auf die Erholungsrate ΔpH<sub>i</sub>/min (gepaarter *t*-Test,  $P > 0.05$ ). (D) Effekt von EIPA auf t<sub>1/2</sub> in s (gepaarter *t*-Test,  $P < 0.05$ ). (E)-(H) Beitrag des NHE und der V-ATPase zur aktiven pH<sub>i</sub>-Regulation, n = 7. (F) Effekt von EIPA & Concanamycin A auf die NH<sub>4</sub>Cl-induzierte Ansäuerung (*Wilcoxon*-Test,  $P < 0.05$ ) und die Ansäuerung nach dem Ausspülen von NH<sub>4</sub>Cl (*Wilcoxon*-Test,  $P > 0.05$ ) in pH-Einheiten. (G) Effekt von EIPA & Concanamycin A auf die Erholungsrate ΔpH<sub>i</sub>/min (gepaarter *t*-Test,  $P > 0.05$ ). (H) Effekt von EIPA & Concanamycin A auf t<sub>1/2</sub> in s (gepaarter *t*-Test,  $P > 0.05$ ). (A)-(H) MW ± SE, Anzahl der Experimente ist in Klammern angegeben.

Weitere Na<sup>+</sup>-abhängige pH<sub>i</sub>-regulierende Transporter (einwärts gerichteter NBC & NDCBE) können durch DIDS blockiert werden (Tab. 3.3, Abb. 3.5 A). DIDS erzeugte bereits in der ruhenden Zelle eine starke Ansäuerung, so dass eine Beteiligung an der aktiven pH<sub>i</sub>-Regulation nahe lag. Die NH<sub>4</sub>Cl-induzierte Ansäuerung war in der Gegenwart von 500 μM DIDS signifikant größer als unter Kontrollbedingungen (n = 6, gepaarter *t*-Test,  $P < 0.05$ , Abb. 3.5 B). Die nach dem Auswaschen des NH<sub>4</sub>Cl auftretende Ansäuerung war nicht signifikant beeinflusst (n = 6, gepaarter *t*-Test,  $P > 0.05$ , Abb. 3.5 B). DIDS verlangsamte jedoch die Erholungsrate gegenüber der Kontrolle signifikant (n = 6, gepaarter *t*-Test,  $P < 0.01$ , Abb. 3.5 C). t<sub>1/2</sub> war in der Gegenwart von DIDS gegenüber der Kontrolle ebenfalls erhöht. Dieser Effekt war jedoch nicht statistisch signifikant (n = 6, gepaarter *t*-Test,  $P > 0.05$ , Abb. 3.5 D). Wurde in der Gegenwart von DIDS die V-ATPase mit Concanamycin A blockiert (Tab. 3.3, Abb. 3.5 E) war weder die Ansäuerung durch NH<sub>4</sub>Cl noch die Ansäuerung nach dem Auswaschen von NH<sub>4</sub>Cl signifikant beeinflusst (n = 5, gepaarter *t*-Test,  $P > 0.05$ , Abb. 3.5 F). Die Erholungsrate unter Kontrollbedingungen war in der Gegenwart von DIDS & Concanamycin A nahezu vollständig blockiert (n = 5, gepaarter *t*-Test,  $P < 0.05$ , Abb. 3.5 G). Dies führte auch zu einer Erhöhung von t<sub>1/2</sub>. Aufgrund

der Strenge des angewendeten Testes ergab sich keine statistische Signifikanz, die Erhöhung von  $t_{1/2}$  ist aber nicht zu übersehen ( $n = 5$ , *Wilcoxon*-Test,  $P > 0.05$ , Abb. 3.5 H).

Damit wird deutlich, dass in der unstimulierten Speicheldrüse ein  $\text{Na}^+$ -abhängiger  $\text{HCO}_3^-$ -Transporter an der aktiven  $\text{pH}_i$ -Regulation in der unstimulierten Drüse beteiligt ist. In Frage kommen dafür der einwärts gerichtete NBC und / oder der NDCBE.

Tab. 3.3:  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Vorpuls: Einfluss von DIDS und Concanamycin A

	Ansäuerung $\text{NH}_4\text{Cl}$ ( $\Delta\text{pH}_i$ )	Ansäuerung Auswaschen $\text{NH}_4\text{Cl}$ ( $\Delta\text{pH}_i$ )	$\Delta\text{pH}_i/\text{min}$	$t_{1/2}$ (s)
Kontrolle	$-0.31 \pm 0.07$	$-0.54 \pm 0.11$	$0.67 \pm 0.08$	$43 \pm 5$
DIDS	$-0.41 \pm 0.06^{**}$	$-0.45 \pm 0.10$	$0.39 \pm 0.09^{**}$	$123 \pm 34$
Kontrolle	$-0.31 \pm 0.07$	$-0.25 \pm 0.06$	$0.45 \pm 0.08$	$57 \pm 30$
DIDS & ConA	$-0.24 \pm 0.16$	$-0.42 \pm 0.14$	$0.04 \pm 0.04^*$	$236 \pm 45$

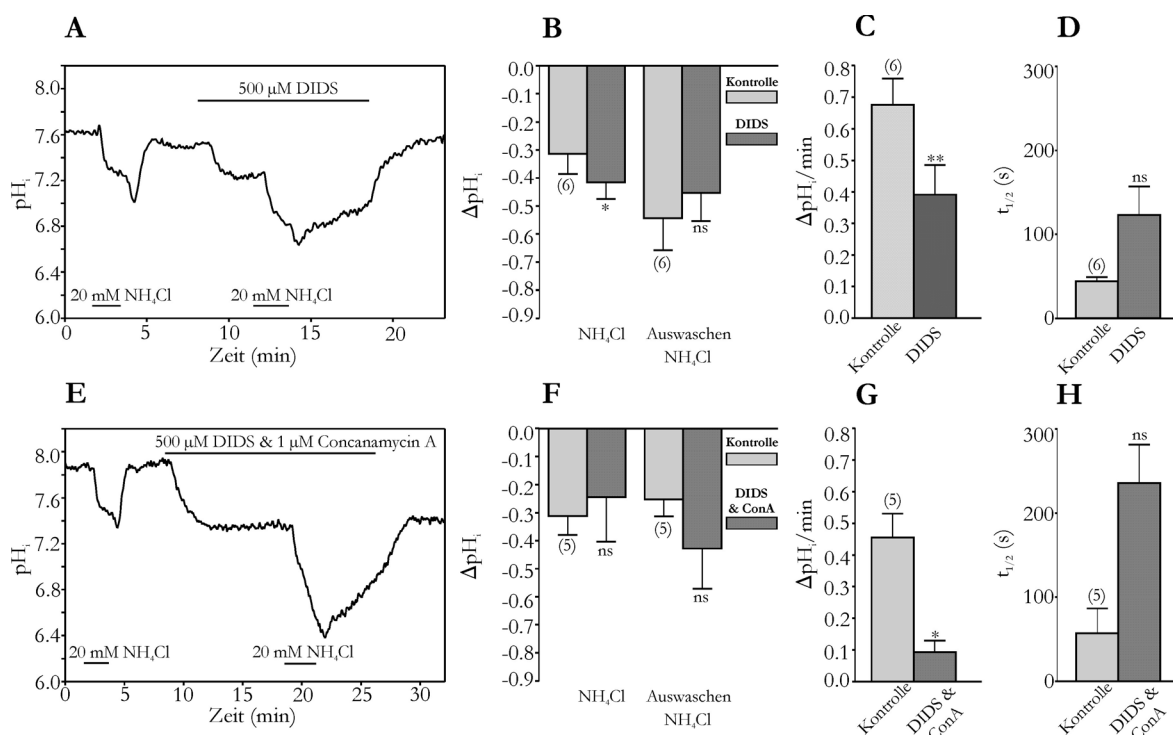


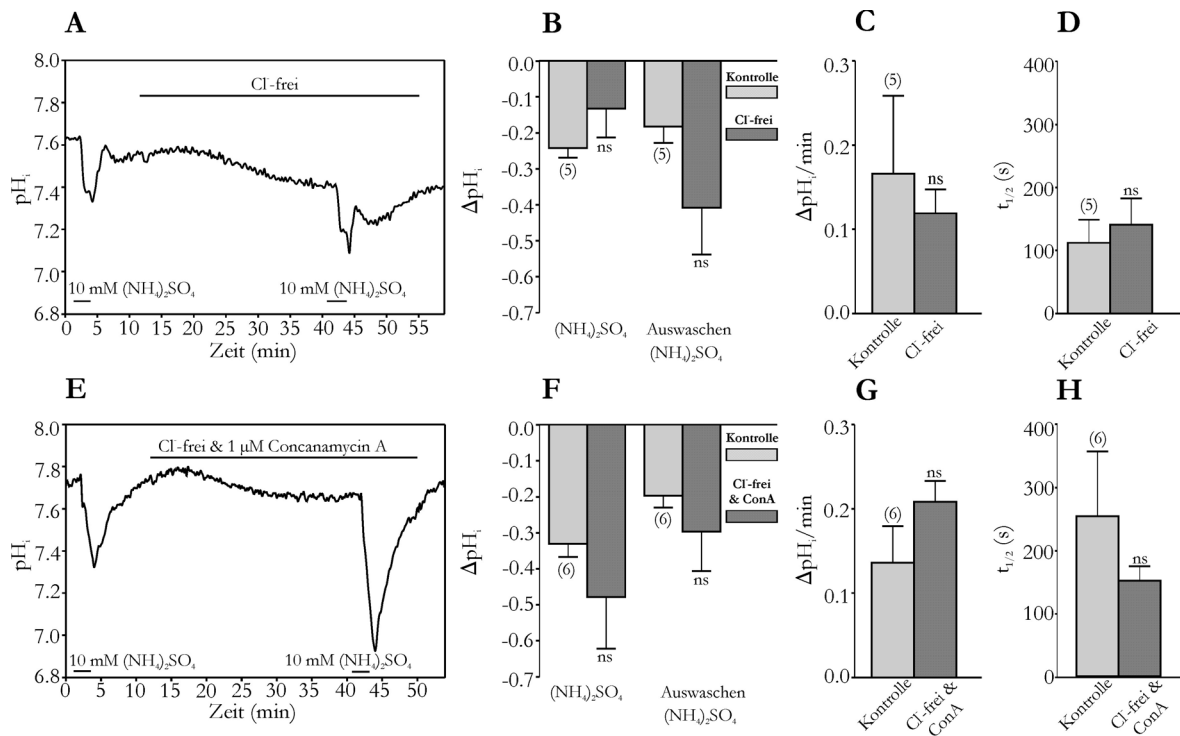
Abb. 3.5:  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Vorpuls: Beitrag  $\text{Na}^+$ -abhängiger  $\text{HCO}_3^-$ -Transporter und der V-ATPase zur aktiven  $\text{pH}_i$ -Regulation in den Speicheldrüsen von *Calliphora vicina*

(A)-(D) Beitrag  $\text{Na}^+$ -abhängiger  $\text{HCO}_3^-$ -Transporter an der aktiven  $\text{pH}_i$ -Regulation,  $n = 6$ . Hemmung  $\text{Na}^+$ -abhängiger  $\text{HCO}_3^-$ -Transporter mit  $500 \mu\text{M}$  DIDS (B) Effekt von DIDS auf die  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -induzierte Ansäuerung (gepaarter  $t$ -Test,  $P < 0.05$ ) und die Ansäuerung nach dem Ausspülen von  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (gepaarter  $t$ -Test,  $P > 0.05$ ) in  $\text{pH}$ -Einheiten. (C) Effekt von DIDS auf die Erholungsrate  $\Delta\text{pH}_i/\text{min}$  (gepaarter  $t$ -Test,  $P < 0.01$ ). (D) Effekt von DIDS auf  $t_{1/2}$  in s (gepaarter  $t$ -Test,  $P > 0.05$ ). (E)-(H) Beitrag  $\text{Na}^+$ -abhängiger  $\text{HCO}_3^-$ -Transporter und der V-ATPase zur aktiven  $\text{pH}_i$ -Regulation,  $n = 5$ . (F) Effekt von DIDS & Concanamycin A auf die  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -induzierte Ansäuerung (gepaarter  $t$ -Test,  $P > 0.05$ ) und die Ansäuerung nach dem Ausspülen von  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (gepaarter  $t$ -Test,  $P > 0.05$ ) in  $\text{pH}$ -Einheiten. (G) Effekt von DIDS & Concanamycin A auf die Erholungsrate  $\Delta\text{pH}_i/\text{min}$  (gepaarter  $t$ -Test,  $P < 0.05$ ). (H) Effekt von DIDS & Concanamycin A auf  $t_{1/2}$  in s (*Wilcoxon*-Test,  $P > 0.05$ ). (A)-(H) MW  $\pm$  SE, Anzahl der Experimente ist in Klammern angegeben.

Der einwärts gerichtete NBC und der NDCBE können pharmakologisch nicht voneinander unterschieden werden. Da der NDCBE jedoch, im Gegensatz zum einwärts gerichteten NBC, auch  $\text{Cl}^-$  transportiert, wurde die  $\text{Cl}^-$ -Abhängigkeit der  $\text{pH}_i$ -Regulation untersucht. Dazu wurden als Vorpuls anstelle von 20 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  10 mM Ammoniumsulfat  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  verwendet. Die  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -induzierte Ansäuerung, die Ansäuerung nach dem Auswaschen des  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , die Erholungsrate und  $t_{1/2}$  waren in  $\text{Cl}^-$ -freier Lösung nicht signifikant beeinflusst ( $n = 5$ , gepaarter  $t$ -Test,  $P > 0.05$ , Tab. 3.4, Abb. 3.6 A-D). Auch die Blockierung der V-ATPase unter  $\text{Cl}^-$ -freien Bedingungen hatte keinen signifikanten Einfluss auf diese Parameter ( $n = 6$ , gepaarter  $t$ -Test,  $P > 0.05$ , Tab. 3.4, Abb. 3.6 E-H). Die fehlende  $\text{Cl}^-$ -Abhängigkeit gab einen Hinweis darauf, dass in der unstimulierten Speicheldrüse von *Calliphora vicina* ein einwärts gerichteter NBC an der  $\text{pH}_i$ -Regulation beteiligt ist.

**Tab. 3.4:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Vorpuls: Einfluss von extrazellulärem  $\text{Cl}^-$  und Concanamycin A**

	Ansäuerung $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ( $\Delta\text{pH}_i$ )	Ansäuerung Auswaschen $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ( $\Delta\text{pH}_i$ )	$\Delta\text{pH}_i/\text{min}$	$t_{1/2}$ (s)
Kontrolle	$-0.24 \pm 0.03$	$-0.18 \pm 0.04$	$0.17 \pm 0.10$	$112 \pm 37$
$\text{Cl}^-$ -frei	$-0.13 \pm 0.08$	$-0.41 \pm 0.13$	$0.12 \pm 0.03$	$141 \pm 42$
Kontrolle	$-0.33 \pm 0.04$	$-0.20 \pm 0.03$	$0.14 \pm 0.04$	$253 \pm 101$
$\text{Cl}^-$ -frei & ConA	$-0.47 \pm 0.14$	$-0.30 \pm 0.11$	$0.21 \pm 0.02$	$151 \pm 23$



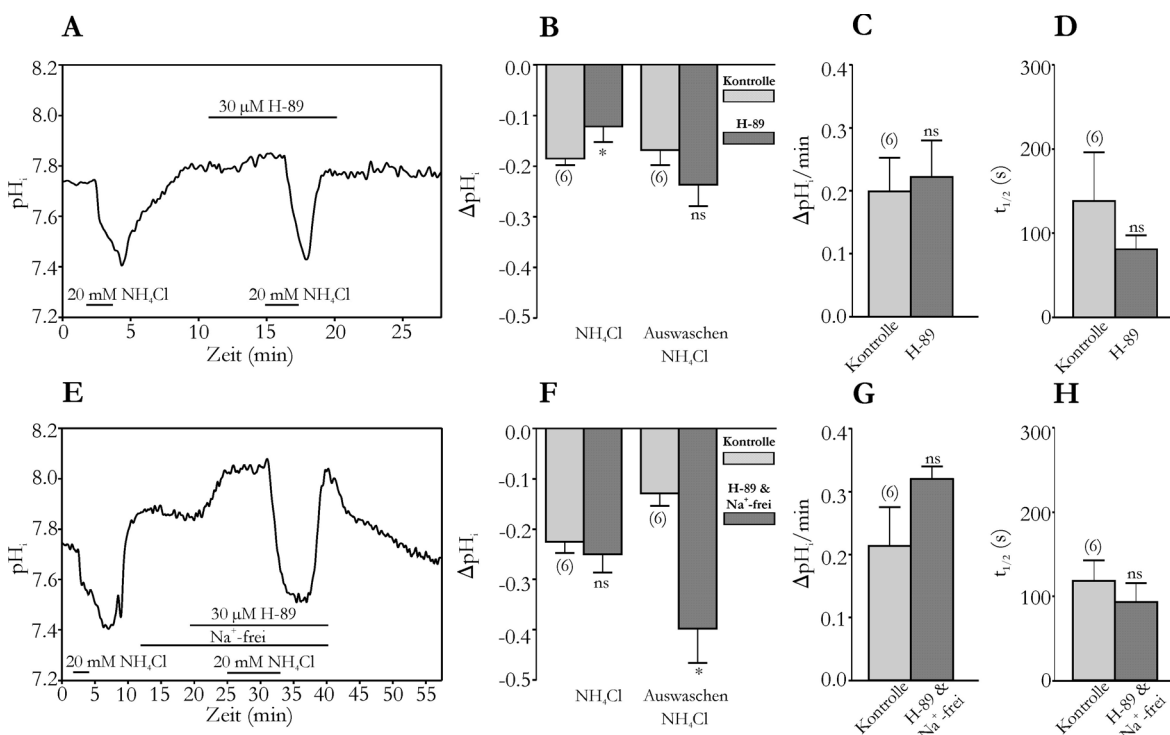
**Abb. 3.6:** (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Vorpuls: Beitrag Cl<sup>-</sup>-abhängiger Transporter und der V-ATPase zur aktiven pH<sub>i</sub>-Regulation in den Speicheldrüsen von *Calliphora vicina*

(A)-(D) Cl<sup>-</sup>-Abhängigkeit der aktiven pH<sub>i</sub>-Regulation, n = 5. (B) Cl<sup>-</sup>-Abhängigkeit der (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-induzierten Ansäuerung (gepaarter *t*-Test, *P* > 0.05) und der Ansäuerung nach dem Ausspülen von (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (gepaarter *t*-Test, *P* > 0.05) in pH-Einheiten. (C) Cl<sup>-</sup>-Abhängigkeit der Erholungsrate ΔpH<sub>i</sub>/min (gepaarter *t*-Test, *P* > 0.05). (D) Cl<sup>-</sup>-Abhängigkeit von t<sub>1/2</sub> in s (gepaarter *t*-Test, *P* > 0.05). (E)-(H) Beitrag Cl<sup>-</sup>-abhängiger Transporter und der V-ATPase zur aktiven pH<sub>i</sub>-Regulation, n = 5. (F) Effekt von Concanamycin A in Cl<sup>-</sup>-freiem Ringer auf die (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-induzierte Ansäuerung (gepaarter *t*-Test, *P* > 0.05) und die Ansäuerung nach dem Ausspülen von (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (gepaarter *t*-Test, *P* > 0.05) in pH-Einheiten. (G) Effekt von Concanamycin A in Cl<sup>-</sup>-freiem Ringer auf die Erholungsrate ΔpH<sub>i</sub>/min (gepaarter *t*-Test, *P* > 0.05). (H) Effekt von Concanamycin A in Cl<sup>-</sup>-freiem Ringer auf t<sub>1/2</sub> in s (gepaarter *t*-Test, *P* > 0.05). (A)-(H) MW ± SE, Anzahl der Experimente ist in Klammern angegeben.

Die Beteiligung der V-ATPase an der aktiven pH<sub>i</sub>-Regulation konnte oben bereits gezeigt werden. Bei 5-HT-Stimulierung wird die V-ATPase PKA-vermittelt aktiviert (Rein et al. 2008). An dieser Stelle sollte untersucht werden, inwieweit die V-ATPase auch bei der pH<sub>i</sub>-Regulation in der unstimulierten Drüse durch die PKA beeinflusst wird. Dazu wurde die PKA mit 30 μM H-89 blockiert (Tab. 3.5, Abb. 3.7 A-L). Unter diesen Bedingungen war die NH<sub>4</sub>Cl-induzierte Ansäuerung gegenüber der Kontrolle signifikant vermindert (n = 6, gepaarter *t*-Test, *P* < 0.05, Abb. 3.7 B). Die Ansäuerung nach dem Auswaschen des NH<sub>4</sub>Cl, die Erholungsrate und t<sub>1/2</sub> waren jedoch nicht signifikant beeinflusst (Abb. 3.7 C & D). Unter Na<sup>+</sup>-freien Bedingungen führte H-89 zu einer signifikanten Verstärkung der Ansäuerung nach dem Auswaschen des NH<sub>4</sub>Cl (n = 6, *Wilcoxon*-Test, *P* < 0.05, Abb. 3.7 F). Alle anderen Parameter wurden unter diesen experimentellen Bedingungen nicht beeinflusst (Abb. 3.7 F-H). Unter Ruhe-Bedingungen ist somit offenbar eine Erhöhung der [H<sup>+</sup>]<sub>i</sub> ausreichend, um die Aktivität der apikalen V-ATPase zu steigern.

Tab. 3.5:  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Vorpuls: Einfluss von H-89 und Concanamycin A

	Ansäuerung $\text{NH}_4\text{Cl}$ ( $\Delta\text{pH}_i$ )	Ansäuerung Auswaschen $\text{NH}_4\text{Cl}$ ( $\Delta\text{pH}_i$ )	$\Delta\text{pH}_i/\text{min}$	$t_{1/2}$ (s)
Kontrolle	$-0.19 \pm 0.01$	$-0.17 \pm 0.03$	$0.20 \pm 0.05$	$138 \pm 58$
H-89	$-0.12 \pm 0.03^*$	$-0.24 \pm 0.04$	$0.22 \pm 0.06$	$81 \pm 17$
Kontrolle	$-0.23 \pm 0.02$	$-0.12 \pm 0.03$	$0.21 \pm 0.06$	$118 \pm 25$
$\text{Na}^+$ -frei & H-89	$-0.25 \pm 0.04$	$-0.40 \pm 0.07^*$	$0.32 \pm 0.02$	$93 \pm 23$

Abb. 3.7:  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Vorpuls: Beitrag der PKA zur aktiven  $\text{pH}_i$ -Regulation in den Speicheldrüsen von *Calliphora vicina*

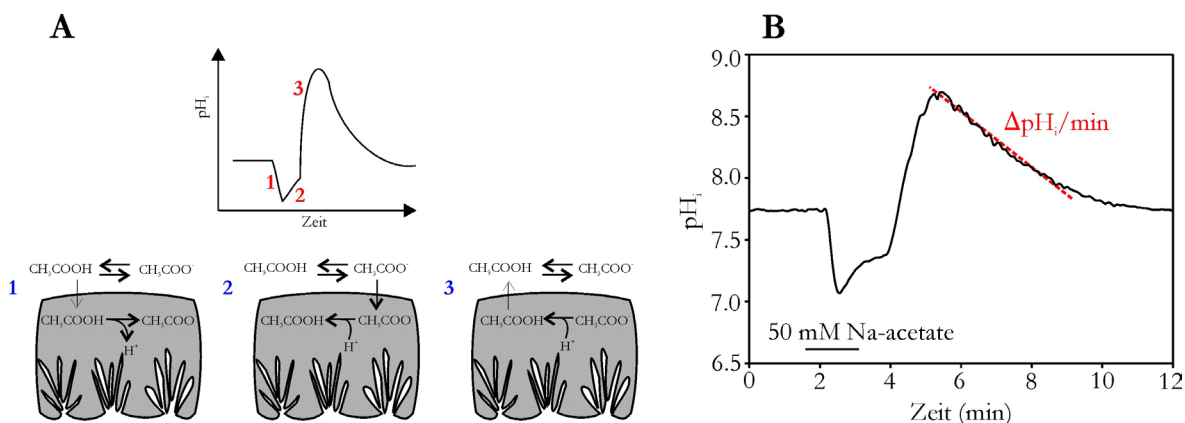
(A)-(D) Beitrag der PKA an der aktiven  $\text{pH}_i$ -Regulation,  $n = 6$ . Hemmung der PKA mit  $30 \mu\text{M}$  H-89. (B) Effekt von H-89 auf die  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -induzierte Ansäuerung (gepaarter  $t$ -Test,  $P < 0.05$ ) und die Ansäuerung nach dem Ausspülen von  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (*Wilcoxon*-Test,  $P > 0.05$ ) in pH-Einheiten. (C) Effekt von H-89 auf die Erholungsrate  $\Delta\text{pH}_i/\text{min}$  (gepaarter  $t$ -Test,  $P > 0.05$ ). (D) Effekt von H-89 auf  $t_{1/2}$  in s (*Wilcoxon*-Test,  $P > 0.05$ ). (E)-(H) Beitrag der PKA zur aktiven  $\text{pH}_i$ -Regulation unter  $\text{Na}^+$ -freien Bedingungen,  $n = 6$ . (F) Effekt von H-89 in  $\text{Na}^+$ -freiem Ringer auf die  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -induzierte Ansäuerung (gepaarter  $t$ -Test,  $P > 0.05$ ) und die Ansäuerung nach dem Ausspülen von  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (*Wilcoxon*-Test,  $P < 0.05$ ) in pH-Einheiten. (G) Effekt von H-89 in  $\text{Na}^+$ -freiem Ringer auf die Erholungsrate  $\Delta\text{pH}_i/\text{min}$  (*Wilcoxon*-Test,  $P > 0.05$ ). (A)-(H) MW  $\pm$  SE, Anzahl der Experimente ist in Klammern angegeben.

Die Experimente der  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Vorpuls-Methode zeigen zusammenfassend, dass vor allem die V-ATPase und ein  $\text{Na}^+$ -abhängiges Transportsystem, an der Erholung von einer intrazellulären Ansäuerung beteiligt sind. Die  $\text{Na}^+$ -abhängige Komponente war DIDS-empfindlich. Aufgrund der fehlenden  $\text{Cl}^-$ -Sensitivität, scheint hier also ein einwärts gerichteter NBC eine entscheidende Rolle zu spielen.

### 3.1.3 Erholung von einer intrazellulären Alkalisierung - Na-acetat-Vorpuls-Methode

Im Folgenden wurde untersucht, welche Mechanismen mitwirken, um den Ruhe- $\text{pH}_i$  nach einer intrazellulären Alkalisierung wieder herzustellen. Um in den Zellen

experimentell eine Alkalisierung hervorzurufen, wurde die Na-acetat-Vorpuls-Methode angewendet. 50 mM Na-acetat in der Ringerlösung induzieren intrazellulär eine Ansäuerung, weil Essigsäure ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) in die Zelle eintritt. Intrazellulär gibt  $\text{CH}_3\text{COOH}$  ein  $\text{H}^+$  ab und der  $\text{pH}_i$  fällt (Abb. 3.8 A 1). Die langsame Diffusion des Acetat-Anions ( $\text{CH}_3\text{COO}^-$ ) über die Membran führt zu einer schleichenden Alkalisierung (Abb. 3.8 A 2). Nach dem Auswaschen des Na-acetats verlässt  $\text{CH}_3\text{COOH}$  die Zelle rasch und es entsteht intrazellulär eine starke Alkalisierung (Abb. 3.8 A 3). In den Speicheldrüsen von *Calliphora vicina* trat eine Alkalisierung, ausgehend vom Ruhe- $\text{pH}_i$ , von  $0.69 \pm 0.03$  pH-Einheiten ( $n = 86$ ) auf (Abb. 3.8 B). Die Zellen erholten sich von dieser Alkalisierung mit einer Geschwindigkeit von  $-0.31 \pm 0.02$   $\Delta\text{pH}_i/\text{min}$  und einer halbmaximalen Geschwindigkeit von  $80 \pm 4$  s ( $n = 86$ ). Die Erholungsrate  $\Delta\text{pH}_i/\text{min}$  wurde wiederum durch lineare Regression (Abb. 3.8 B) ermittelt (innerhalb der ersten 3 min nach Beginn der Erholung). Sie wird in Form von negativen Werten dargestellt, da sie eine Abnahme des  $\text{pH}_i$ -Wertes beschreibt. Der Einfluss von Hemmstoffen und/oder Ionensubstitutionen auf die ausgewerteten Parameter wurde systematisch untersucht. Wie im vorherigen Abschnitt wurden die numerischen Werte der betrachteten Parameter in den entsprechenden Textabschnitten tabellarisch dargestellt.



**Abb. 3.8:** Na-acetat-Vorpuls-Methode in den Speicheldrüsen von *Calliphora vicina*

(A) Mechanismus der Na-acetat-Vorpuls-Methode. Essigsäure ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) diffundiert in die Zelle und induziert eine intrazelluläre Ansäuerung<sup>1</sup>, durch die Abgabe von  $\text{H}^+$ . Das Acetat-Anion gelangt nur langsam über die Zellmembran und ist für die schleichende Alkalisierung verantwortlich<sup>2</sup>. Nach dem Auswaschen von Na-acetat verlässt  $\text{CH}_3\text{COOH}$  die Zelle rasch und es kommt zu einer starken intrazellulären Alkalisierung<sup>3</sup>. (B) In den Speicheldrüsen von *Calliphora vicina* induzierte 50 mM Na-acetat eine intrazelluläre Ansäuerung. Nach dem Auswaschen von Na-acetat erfolgte eine intrazelluläre Alkalisierung.  $\Delta\text{pH}_i/\text{min}$  kennzeichnet die Erholungsrate von der durch den Na-acetat-Vorpuls induzierten Alkalisierung.

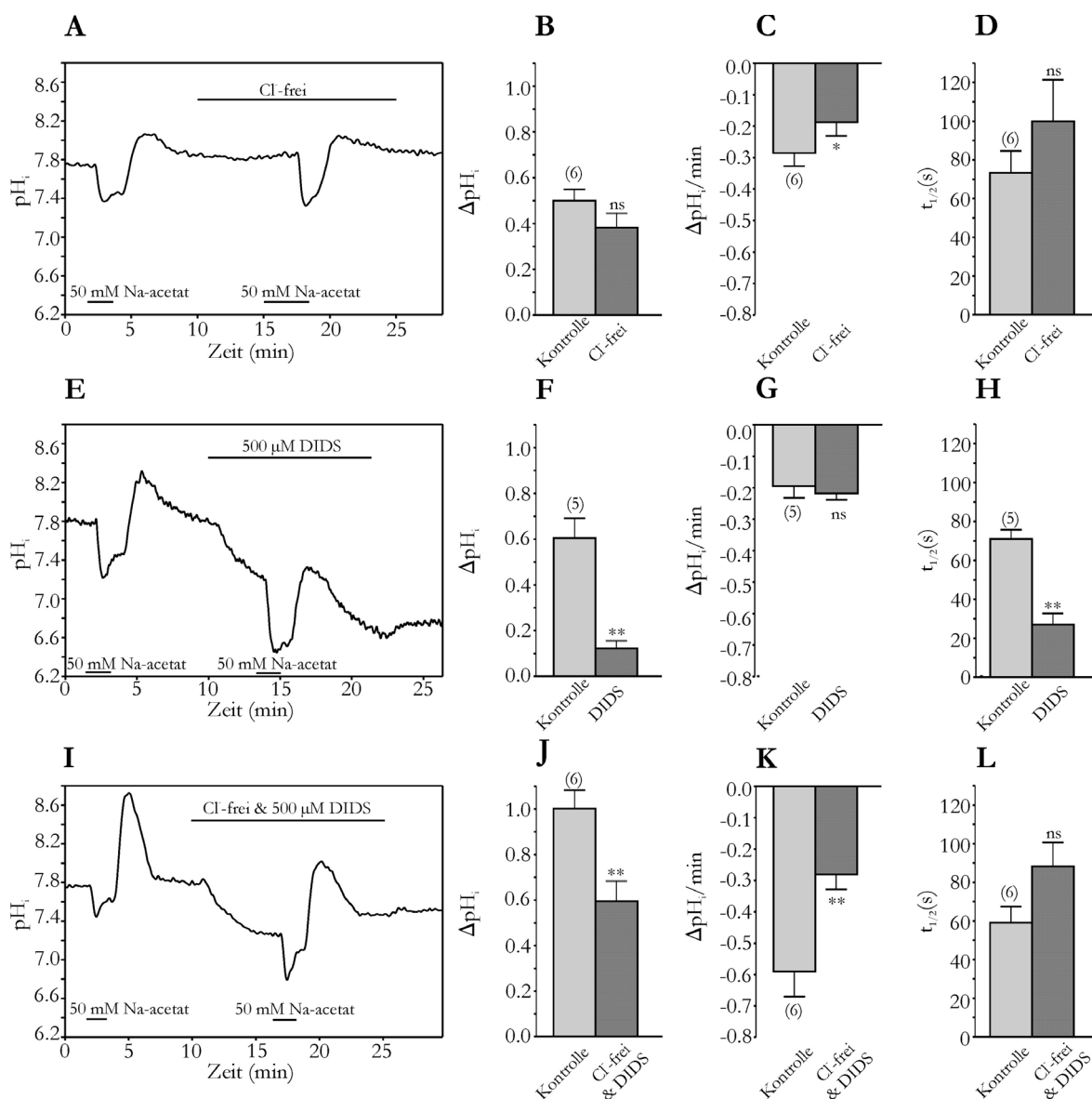
Ansäuernde Transportmechanismen transportieren in erster Linie  $\text{HCO}_3^-$  aus der Zelle heraus. Ein weit verbreiteter Mechanismus ist der  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Antiporter (AE). Dessen Aktivität wurde durch die Wegnahme von extrazellulärem  $\text{Cl}^-$  beeinflusst bzw. durch die Verwendung von DIDS blockiert (Tab. 3.6, Abb. 3.9). Unter  $\text{Cl}^-$ -freien Bedingungen (Tab. 3.6, Abb. 3.9 A) unterschied sich die Alkalisierung nach einem Na-acetat-Vorpuls nicht signifikant von der Kontrolle ( $n = 6$ , gepaarter  $t$ -Test,  $P > 0.05$ , Abb. 3.9 B). Die Erholungsrate war unter  $\text{Cl}^-$ -freien Bedingungen signifikant

verlangsamt ( $n = 6$ , gepaarter  $t$ -Test,  $P < 0.05$ , Abb. 3.9 C). Daraus resultierend war auch  $t_{1/2}$  unter  $\text{Cl}^-$ -freien Bedingungen tendenziell erhöht. Dieser Effekt war jedoch statistisch nicht signifikant ( $n = 6$ , gepaarter  $t$ -Test,  $P > 0.05$ , Abb. 3.9 D). DIDS (Tab. 3.6, Abb. 3.9 E) reduzierte die auftretende Alkalisierung nach einem Na-acetat-Vorpuls signifikant ( $n = 5$ , gepaarter  $t$ -Test,  $P < 0.01$ , Abb. 3.9 F). Auch  $t_{1/2}$  war unter diesen Bedingungen signifikant kleiner ( $n = 5$ , gepaarter  $t$ -Test,  $P < 0.01$ , Abb. 3.9 H). DIDS hatte jedoch keinen Einfluss auf die Erholungsrate  $\Delta\text{pH}_i/\text{min}$  ( $n = 5$ , gepaarter  $t$ -Test,  $P > 0.05$ , Abb. 3.9 G). Da Transporter existieren, die  $\text{Cl}^-$ -abhängig aber nicht DIDS-sensitiv sind bzw. umgekehrt, wurde der Einfluss von DIDS auch unter  $\text{Cl}^-$ -freien Bedingungen untersucht (Tab. 3.6, Abb. 3.9 I). Dieser Ansatz sollte sowohl die Aktivität eines AE beeinflussen, als auch weitere DIDS-sensitive  $\text{HCO}_3^-$ -abhängige Transporter blockieren. DIDS unter  $\text{Cl}^-$ -freien Bedingungen führte zu einer deutlich reduzierten Alkalisierung nach einem Na-acetat-Vorpuls ( $n = 6$ , gepaarter  $t$ -Test,  $P < 0.01$ , Abb. 3.9 J). Auch die Erholungsrate war unter diesen experimentellen Bedingungen signifikant verlangsamt ( $n = 6$ , gepaarter  $t$ -Test,  $P < 0.01$ , Abb. 3.9 K), was jedoch auch schon unter  $\text{Cl}^-$ -freien Bedingungen ohne DIDS auftrat. Die halbmaximale Geschwindigkeit  $t_{1/2}$  war hier tendenziell erhöht. Es ergab sich jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied zu Kontrollbedingungen ( $n = 6$ , gepaarter  $t$ -Test,  $P > 0.05$ , Abb. 3.9 L).

Die Ergebnisse deuten eine  $\text{Cl}^-$ -Abhängigkeit der *acid loader* an und geben somit einen Hinweis auf eine Aktivität des AE. DIDS hatte einen Effekt auf die durch den Na-acetat-Vorpuls verursachte Alkalisierung und auf  $t_{1/2}$ . Die Erholungsrate war durch DIDS jedoch nicht beeinflusst. Daraus resultierend war die  $\text{Cl}^-$ -Sensitivität der Erholungsrate nicht eindeutig einem DIDS-empfindlichen Transporter zuzuordnen. Dies ist ein erster Hinweis auf einen DIDS-insensitiven  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Antiporter.

**Tab. 3.6: Na-acetat-Vorpuls: Einfluss von extrazellulärem  $\text{Cl}^-$  und DIDS**

	Alkalisierung $\Delta\text{pH}_i$	$\Delta\text{pH}_i/\text{min}$	$t_{1/2}$ (s)
Kontrolle $\text{Cl}^-$ -frei	$0.50 \pm 0.05$ $0.38 \pm 0.06$	$-0.29 \pm 0.04$ $-0.18 \pm 0.04^*$	$73.33 \pm 11.30$ $100.00 \pm 21.45$
Kontrolle DIDS	$0.60 \pm 0.09$ $0.12 \pm 0.03^{**}$	$-0.19 \pm 0.04$ $-0.21 \pm 0.02$	$71.00 \pm 4.85$ $27.00 \pm 5.83^{**}$
Kontrolle $\text{Cl}^-$ -frei & DIDS	$1.00 \pm 0.08$ $0.56 \pm 0.09^{**}$	$-0.59 \pm 0.08$ $-0.28 \pm 0.05^*$	$59.17 \pm 8.31$ $88.33 \pm 12.36$



**Abb. 3.9: Na-acetat-Vorpuls: Beitrag  $\text{Cl}^-$ - und  $\text{HCO}_3^-$ -abhängiger Transporter zur aktiven  $\text{pH}_i$ -Regulation in den Speicheldrüsen von *Calliphora vicina***

(A)-(D) Effekt von  $\text{Cl}^-$ -freiem Ringer,  $n = 6$ . (B)  $\text{Cl}^-$ -Abhängigkeit der Alkalisierung nach dem Auswaschen von Na-acetat (gepaarter  $t$ -Test,  $P > 0.05$ ) in pH-Einheiten. (C)  $\text{Cl}^-$ -Abhängigkeit der Erholungsrate  $\Delta\text{pH}_i/\text{min}$  (gepaarter  $t$ -Test,  $P < 0.05$ ). (D)  $\text{Cl}^-$ -Abhängigkeit von  $t_{1/2}$  in s (gepaarter  $t$ -Test,  $P > 0.05$ ). (E)-(H) Beitrag  $\text{HCO}_3^-$ -abhängiger Transporter zur aktiven  $\text{pH}_i$ -Regulation,  $n = 5$ . Hemmung  $\text{HCO}_3^-$ -abhängiger Transporter mit 500  $\mu\text{M}$  DIDS. (F) Effekt von DIDS auf die Alkalisierung nach dem Auswaschen von Na-acetat (gepaarter  $t$ -Test,  $P < 0.01$ ) in pH-Einheiten. (G) Effekt von DIDS auf die Erholungsrate  $\Delta\text{pH}_i/\text{min}$  (gepaarter  $t$ -Test,  $P > 0.05$ ). (H) Effekt von DIDS auf  $t_{1/2}$  in s (gepaarter  $t$ -Test,  $P < 0.01$ ). (I)-(L) Beitrag  $\text{HCO}_3^-$ -abhängiger Transporter unter  $\text{Cl}^-$ -freien Bedingungen zur aktiven  $\text{pH}_i$ -Regulation,  $n = 6$ . (J) Effekt von DIDS unter  $\text{Cl}^-$ -freien Bedingungen auf die Alkalisierung nach dem Ausspülen von Na-acetat (gepaarter  $t$ -Test,  $P < 0.01$ ) in pH-Einheiten. (K) Effekt von DIDS unter  $\text{Cl}^-$ -freien Bedingungen auf die Erholungsrate  $\Delta\text{pH}_i/\text{min}$  (gepaarter  $t$ -Test,  $P < 0.01$ ). (L) Effekt von DIDS unter  $\text{Cl}^-$ -freien Bedingungen auf  $t_{1/2}$  in s (gepaarter  $t$ -Test,  $P > 0.05$ ). (A)-(L) MW  $\pm$  SE, Anzahl der Experimente ist in Klammern angegeben.

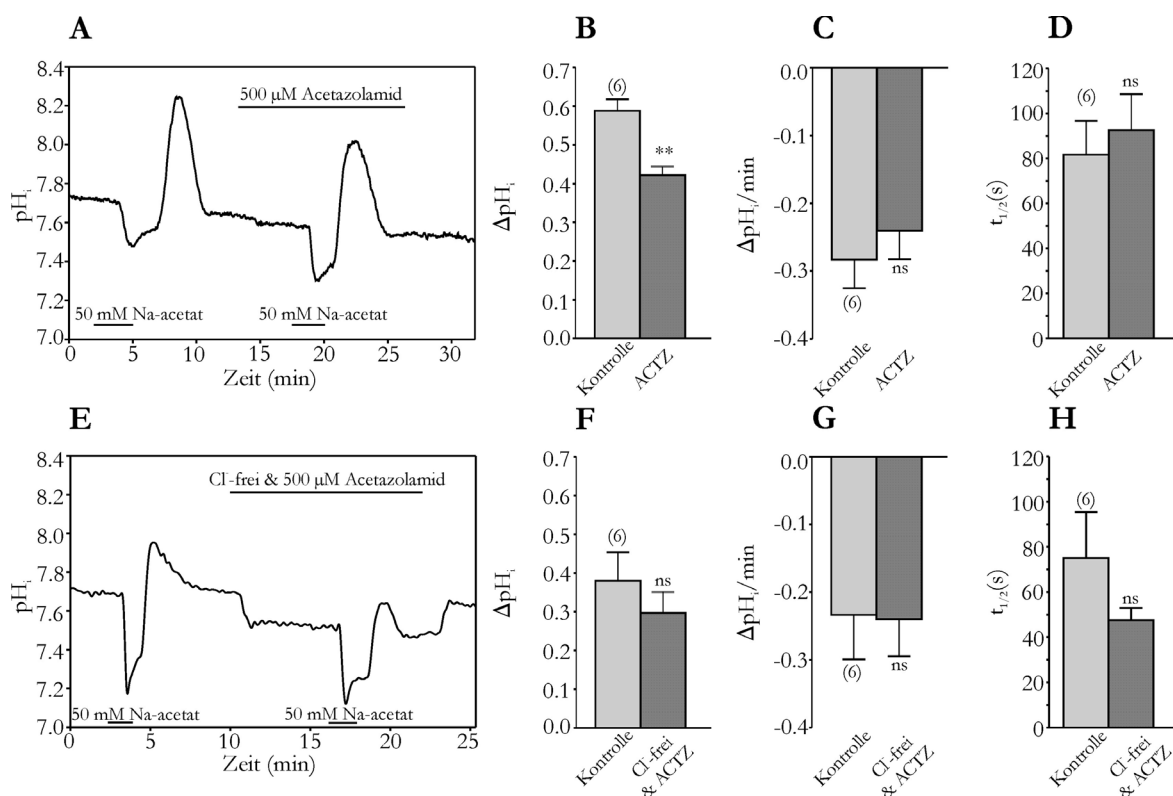
Die Carboanhydrase stellt intrazellulär  $\text{HCO}_3^-$  bereit.  $\text{HCO}_3^-$  dient zum einen als intrazellulärer Puffer und zum anderen als Substrat für ansäuernde Transportmechanismen wie den AE und den auswärts gerichteten NBC. Eine Blockierung der Carboanhydrase reduziert intrazellulär die Verfügbarkeit von  $\text{HCO}_3^-$ . Die Carboanhydrase wurde mit 500  $\mu\text{M}$  Acetazolamid blockiert (Tab. 3.7, Abb. 3.10 A). Acetazolamid reduzierte die durch die Na-acetat-Vorpuls hervorgerufene Alkalisierung signifikant ( $n = 6$ , gepaarter  $t$ -Test,  $P < 0.01$ , Abb. 3.10 B). Die Erholungsrate



$\Delta\text{pH}_i/\text{min}$  ( $n = 6$ , gepaarter  $t$ -Test,  $P > 0.05$ , Abb. 3.10 C) und  $t_{1/2}$  ( $n = 6$ , *Wilcoxon*-Test,  $P > 0.05$ , Abb. 3.10 D) wurden dadurch aber nicht beeinflusst. Durch die Blockierung der Carboanhydrase mit Acetazolamid wird die Verfügbarkeit von intrazellulärem  $\text{HCO}_3^-$  gesenkt. Unter  $\text{Cl}^-$ -freien Bedingungen sollten deshalb sowohl der AE als auch der auswärts gerichtete NBC blockiert sein, da beide  $\text{HCO}_3^-$  aus der Zelle heraustransportieren. Wurde die Carboanhydrase unter  $\text{Cl}^-$ -freien Bedingungen blockiert (Tab. 3.7, Abb. 3.10 E) waren keine Effekte auf die ausgewerteten Parameter zu beobachten ( $n = 6$ , gepaarter  $t$ -Test,  $P > 0.05$ , Abb. 3.10 F-H). Dies bedeutet aber auch, dass der Effekt von  $\text{Cl}^-$ -freiem Ringer, nämlich die Verlangsamung der Erholungsrate (s.o.), durch Acetazolamid aufgehoben wurde.

**Tab. 3.7: Na-acetat-Vorpuls: Einfluss von Acetazolamid**

	Alkalisierung $\Delta\text{pH}_i$	$\Delta\text{pH}_i/\text{min}$	$t_{1/2}$ (s)
Kontrolle	$0.59 \pm 0.03$	$-0.28 \pm 0.04$	$81.67 \pm 15.04$
ACTZ	$0.42 \pm 0.02^{**}$	$-0.24 \pm 0.04$	$92.50 \pm 16.06$
Kontrolle	$0.38 \pm 0.07$	$-0.23 \pm 0.07$	$75.00 \pm 20.45$
$\text{Cl}^-$ -frei & ACTZ	$0.30 \pm 0.05$	$-0.24 \pm 0.05$	$47.50 \pm 5.43$



**Abb. 3.10: Na-acetat-Vorpuls: Beitrag der Carboanhydrase zur aktiven  $pH_i$ -Regulation in den Speicheldrüsen von *Calliphora vicina***

(A)-(D) Beitrag der Carboanhydrase,  $n = 6$ . Blockierung der Carboanhydrase mit  $500 \mu\text{M}$  ACTZ. (B) Effekt von ACTZ auf die Alkalisierung nach dem Auswaschen von Na-acetat (gepaarter  $t$ -Test,  $P < 0.01$ ) in pH-Einheiten. (C) Effekt von ACTZ auf die Erholungsrate  $\Delta pH_i/\text{min}$  (gepaarter  $t$ -Test,  $P > 0.05$ ). (D) Effekt von ACTZ auf  $t_{1/2}$  in s (Wilcoxon-Test,  $P > 0.05$ ). (E)-(H) Beitrag der Carboanhydrase unter  $\text{Cl}^-$ -freien Bedingungen zur aktiven  $pH_i$ -Regulation,  $n = 6$ . (F) Effekt von ACTZ unter  $\text{Cl}^-$ -freien Bedingungen auf die Alkalisierung nach dem Auswaschen von Na-acetat (gepaarter  $t$ -Test,  $P > 0.05$ ) in pH-Einheiten. (G) Effekt von ACTZ unter  $\text{Cl}^-$ -freien Bedingungen auf die Erholungsrate  $\Delta pH_i/\text{min}$  (gepaarter  $t$ -Test,  $P > 0.05$ ). (H) Effekt von ACTZ unter  $\text{Cl}^-$ -freien Bedingungen auf  $t_{1/2}$  in s (gepaarter  $t$ -Test,  $P > 0.05$ ). (A)-(H) MW  $\pm$  SE, Anzahl der Experimente ist in Klammern angegeben.

Die Speicheldrüsen von *Calliphora vicina* enthalten einen  $\text{Na}^+$ -abhängigen Glutamat-Transporter (*Cv EAAT*) (siehe 3.2). Die Wegnahme von extrazellulärem Glutamat induzierte in den Drüsen eine intrazelluläre Alkalisierung. Aus diesem Grund ist eine Beteiligung des *Cv EAAT* an der  $pH_i$ -Regulation denkbar. Unter Glutamat-freien Bedingungen (Tab. 3.8, Abb. 3.11 A) war die durch den Na-acetat-Vorpuls induzierte Alkalisierung signifikant verringert ( $n = 6$ , gepaarter  $t$ -Test,  $P < 0.05$ , Abb. 3.11 B). Die Erholungsrate und  $t_{1/2}$  war bei einer Wegnahme von extrazellulärem Glutamat nicht beeinflusst ( $n = 6$ , gepaarter  $t$ -Test,  $P > 0.05$ , Abb. 3.11 C & D). Wird unter Glutamat-freien Bedingungen  $\text{Cl}^-$  aus der Badlösung entfernt, sollte der *Cv EAAT* blockiert und die Aktivität des AE verändert sein (Tab. 3.8, Abb. 3.11 E). Unter  $\text{Cl}^-$ - und Glutamat-freien Bedingungen war die hervorgerufene Alkalisierung signifikant kleiner ( $n = 6$ , gepaarter  $t$ -Test,  $P < 0.05$ , Abb. 3.11 F). Die Erholungsrate wurde unter diesen Bedingungen signifikant verlangsamt ( $n = 6$ , gepaarter  $t$ -Test,  $P < 0.01$ , Abb. 3.11 G).  $t_{1/2}$  wurde, aus der geringeren Alkalisierung und der verlangsamteten Erholungsrate resultierend, signifikant kürzer ( $n = 6$ , gepaarter  $t$ -Test,  $P < 0.05$ , Abb. 3.11 H).

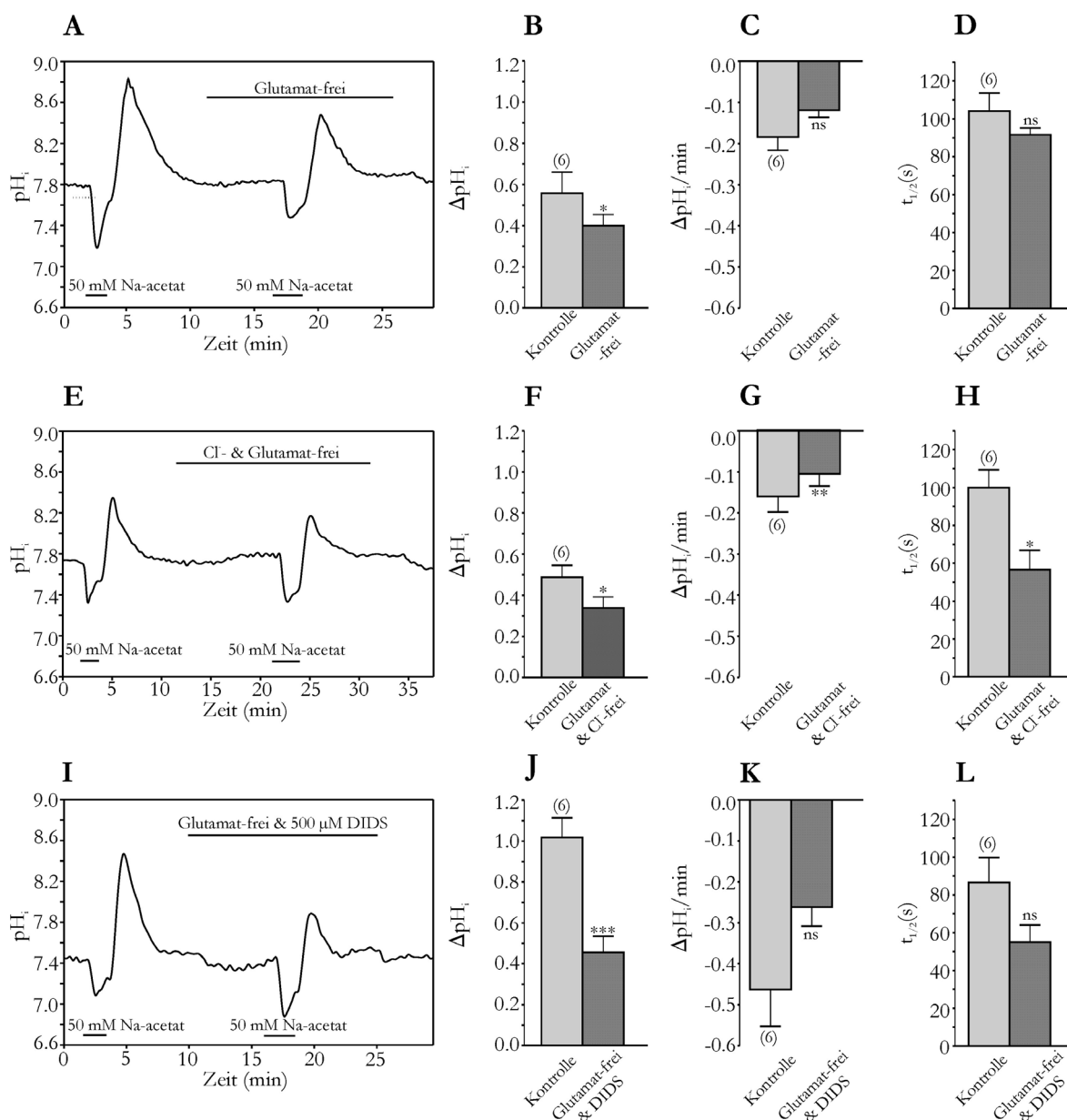
Die Verwendung von DIDS in Abwesenheit von Glutamat soll zusätzlich zum *Cv EAAT*,  $\text{HCO}_3^-$ -Transporter blockieren (Tab. 3.8, Abb. 3.11 I). DIDS unter Glutamat-

freien Bedingungen führte zu einer geringeren Alkalisierung hervorgerufen durch den Na-acetat-Vorpuls ( $n = 6$ , gepaarter  $t$ -Test,  $P < 0.001$ , Abb. 3.11 J). Die Erholungsrate und  $t_{1/2}$  wurden unter diesen experimentellen Bedingungen jedoch nicht beeinflusst ( $n = 6$ , gepaarter  $t$ -Test,  $P > 0.05$ , Abb. 3.11 K & L).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Aktivität des *Cv EAAT* den Ruhe-pH<sub>i</sub> beeinflusst. An der Wiederherstellung des Ruhe-pH<sub>i</sub> nach einer intrazellulären Alkalisierung ist er aber nicht messbar beteiligt.

**Tab. 3.8: Na-acetat-Vorpuls: Einfluss von extrazellulärem Cl<sup>-</sup>, Glutamat und DIDS**

	Alkalisierung $\Delta\text{pH}_i$	$\Delta\text{pH}_i/\text{min}$	$t_{1/2}$ (s)
Kontrolle	$0.56 \pm 0.10$	$-0.18 \pm 0.03$	$104.20 \pm 9.52$
Glutamat-frei	$0.40 \pm 0.05^*$	$-0.12 \pm 0.02$	$91.67 \pm 3.58$
Kontrolle	$0.49 \pm 0.06$	$-0.16 \pm 0.04$	$100.00 \pm 9.30$
Cl <sup>-</sup> & Glutamat-frei	$0.34 \pm 0.05^*$	$-0.11 \pm 0.03^{**}$	$56.67 \pm 10.14^*$
Kontrolle	$1.02 \pm 0.10$	$-0.46 \pm 0.10$	$86.67 \pm 13.08$
Glutamat-frei & DIDS	$0.47 \pm 0.08^{**}$	$-0.26 \pm 0.05$	$55.00 \pm 9.13$



**Abb. 3.11: Na-acetat-Vorpuls: Beitrag Glutamat-abhängiger Transporter zur aktiven  $pH_i$ -Regulation in den Speicheldrüsen von *Calliphora vicina***

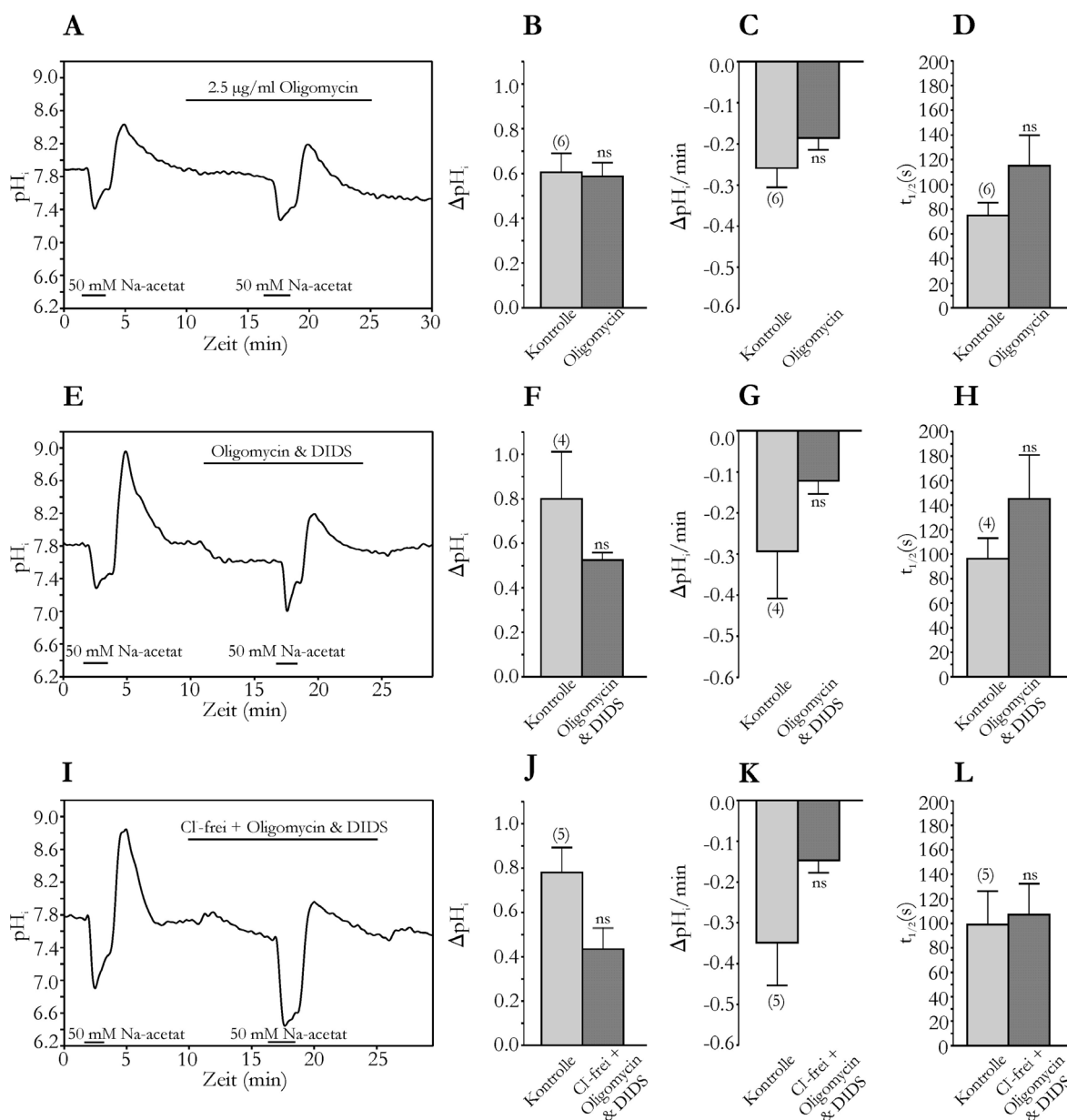
(A)-(D) Effekt von Glutamat-freiem Ringer,  $n = 6$ . (B) Glutamat-Abhängigkeit der Alkalisierung nach dem Auswaschen von Na-acetat (gepaarter  $t$ -Test,  $P < 0.05$ ) in pH-Einheiten. (C) Glutamat-Abhängigkeit der Erholungsrate  $\Delta pH_i/\text{min}$  (gepaarter  $t$ -Test,  $P > 0.05$ ). (D) Glutamat-Abhängigkeit von  $t_{1/2}$  in s (gepaarter  $t$ -Test,  $P > 0.05$ ). (E)-(H) Beitrag  $Cl^-$  & Glutamat-abhängiger Transporter zur aktiven  $pH_i$ -Regulation,  $n = 6$ . (F) Effekt von  $[Cl^-$  & Glutamat-freiem Ringer auf die Alkalisierung nach dem Auswaschen von Na-acetat (gepaarter  $t$ -Test,  $P < 0.05$ ) in pH-Einheiten. (G) Effekt von  $Cl^-$  & Glutamat-freiem Ringer auf die Erholungsrate  $\Delta pH_i/\text{min}$  (gepaarter  $t$ -Test,  $P < 0.01$ ). (H) Effekt von  $Cl^-$  & Glutamat-freiem Ringer auf  $t_{1/2}$  in s (gepaarter  $t$ -Test,  $P < 0.05$ ). (I)-(L) Beitrag  $HCO_3^-$ -abhängiger Transporter unter Glutamat-freien Bedingungen zur aktiven  $pH_i$ -Regulation,  $n = 6$ . (J) Effekt von DIDS unter Glutamat-freien Bedingungen auf die Alkalisierung nach dem Ausspülen von Na-acetat (gepaarter  $t$ -Test,  $P < 0.001$ ) in pH-Einheiten. (K) Effekt von DIDS unter Glutamat-freien Bedingungen auf die Erholungsrate  $\Delta pH_i/\text{min}$  (gepaarter  $t$ -Test,  $P > 0.05$ ). (L) Effekt von DIDS unter Glutamat $^-$ -freien Bedingungen auf  $t_{1/2}$  in s (gepaarter  $t$ -Test,  $P > 0.05$ ). (A)-(L) MW  $\pm$  SE, Anzahl der Experimente ist in Klammern angegeben.

Nicht bekannt war, ob ATP-verbrauchende Prozesse einen Einfluss, auf die Erholungsrate von einer intrazellulären Alkalisierung, haben. In roten Blutzellen und Zellen der glatten Muskulatur ist u.a. beschrieben, dass die membranständige  $Ca^{2+}$ -ATPase, unter ATP-Verbrauch auch als  $Ca^{2+}/H^+$ -Austauscher arbeitet (Zhang et al. 1992, Daugirdas et al. 1995). Um diesen Aspekt zu untersuchen, wurde die

Verfügbarkeit von intrazellulärem ATP herabgesetzt. Dazu wurde die F-ATPase in den Mitochondrien mit Oligomycin blockiert (Whittam et al. 1964). Ein wichtiger Aspekt bei der  $\text{pH}_i$ -Regulation ist zudem die intrazelluläre Pufferkapazität. Diese kann eine intrazelluläre Alkalisierung durch eine Freisetzung von Protonen aus intrazellulären Puffern abfangen. In Insekten zählen dazu vor allem Proteine, Phosphate und organische Säuren (Harrison 2001). Daraus resultierend kann angenommen werden, dass eine verminderte Verfügbarkeit von ATP auch die Pufferkapazität beeinflussen kann. In der Gegenwart von 2.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Oligomycin (Tab. 3.9, Abb. 3.12 A) war die durch den Na-acetat-Vorpuls auftretende Alkalisierung nicht signifikant beeinflusst ( $n = 6$ , gepaarter  $t$ -Test,  $P > 0.05$ , Abb. 3.12 B). Auch die Erholungsrate und  $t_{1/2}$  wurden nicht signifikant verändert ( $n = 6$ , gepaarter  $t$ -Test,  $P > 0.05$ , Abb. 3.12 C & D). Oligomycin wurde auch in der Gegenwart von DIDS ( $n = 4$ , Tab. 3.9, Abb. 3.12 E), und in der Gegenwart von DIDS unter  $\text{Cl}^-$ -freien Bedingungen ( $n = 5$ , Tab. 3.9, Abb. 3.12 I) getestet. In keinem dieser Ansätze konnte ein signifikanter Effekt von Oligomycin auf die Erholung von einer intrazellulären Alkalisierung beobachtet werden (gepaarter  $t$ -Test,  $P > 0.05$ , Abb. 3.12 E-L).

**Tab. 3.9: Na-acetat-Vorpuls: Einfluss von Oligomycin**

	Alkalisierung $\Delta\text{pH}_i$	$\Delta\text{pH}_i/\text{min}$	$t_{1/2}$ (s)
Kontrolle	$0.61 \pm 0.09$	$-0.26 \pm 0.05$	$75.00 \pm 10.25$
Oligomycin	$0.59 \pm 0.06$	$-0.19 \pm 0.03$	$115.00 \pm 24.90$
Kontrolle	$0.80 \pm 0.21$	$-0.29 \pm 0.11$	$96.25 \pm 16.63$
Oligomycin & DIDS	$0.53 \pm 0.03$	$-0.12 \pm 0.03$	$145.00 \pm 35.88$
Kontrolle	$0.78 \pm 0.11$	$-0.35 \pm 0.10$	$99.00 \pm 27.22$
$\text{Cl}^-$ -frei + Oligomycin & DIDS	$0.43 \pm 0.10$	$-0.15 \pm 0.03$	$107.00 \pm 25.38$



**Abb. 3.12: Na-acetat-Vorpuls: ATP-Abhängigkeit der aktiven  $pH_i$ -Regulation in den Speicheldrüsen von *Calliphora vicina***

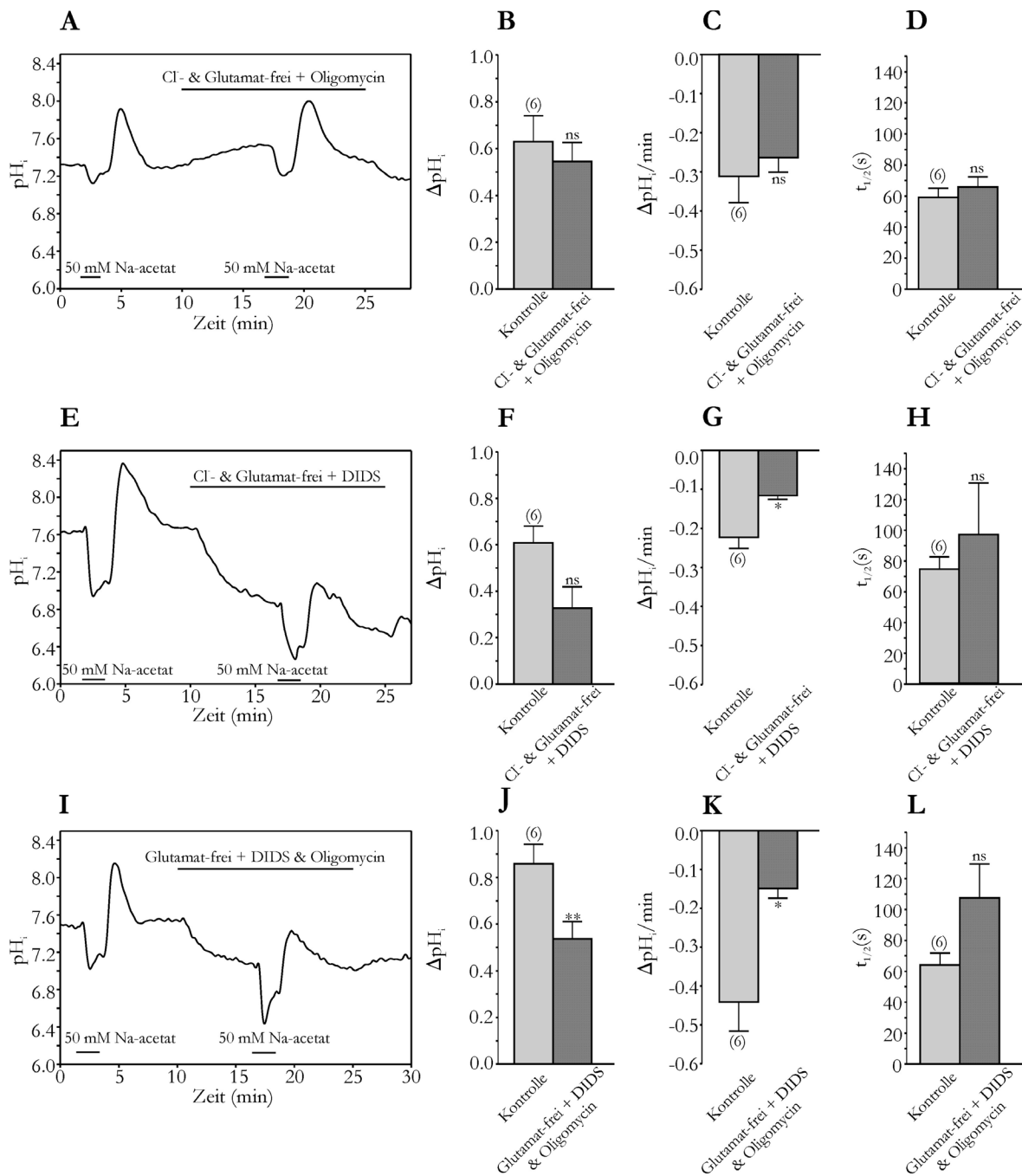
(A)-(D) Effekt von 2.5  $\mu\text{g/ml}$  Oligomycin,  $n = 6$ . (B) Effekt von Oligomycin auf die Alkalisierung nach dem Auswaschen von Na-acetat (gepaarter  $t$ -Test,  $P > 0.05$ ) in  $pH$ -Einheiten. (C) Effekt von Oligomycin auf die Erholungsrate  $\Delta pH_i/\text{min}$  (gepaarter  $t$ -Test,  $P > 0.05$ ). (D) Effekt von Oligomycin auf  $t_{1/2}$  in s (gepaarter  $t$ -Test,  $P > 0.05$ ). (E)-(H) Beitrag ATP-verbrauchender Transporter und  $\text{HCO}_3^-$ -abhängiger Transporter zur aktiven  $pH_i$ -Regulation,  $n = 4$ . (F) Effekt von Oligomycin & DIDS auf die Alkalisierung nach dem Auswaschen von Na-acetat (gepaarter  $t$ -Test,  $P > 0.05$ ) in  $pH$ -Einheiten. (G) Effekt von Oligomycin & DIDS auf die Erholungsrate  $\Delta pH_i/\text{min}$  (gepaarter  $t$ -Test,  $P > 0.05$ ). (H) Effekt von Oligomycin & DIDS auf  $t_{1/2}$  in s (gepaarter  $t$ -Test,  $P > 0.05$ ). (I)-(L) Beitrag ATP-verbrauchender Transporter und  $\text{HCO}_3^-$ -abhängiger Transporter unter  $\text{Cl}^-$ -freien Bedingungen zur aktiven  $pH_i$ -Regulation,  $n = 5$ . (J) Effekt von Oligomycin & DIDS unter  $\text{Cl}^-$ -freien Bedingungen auf die Alkalisierung nach dem Ausspülen von Na-acetat (gepaarter  $t$ -Test,  $P > 0.05$ ) in  $pH$ -Einheiten. (K) Effekt von Oligomycin & DIDS unter  $\text{Cl}^-$ -freien Bedingungen auf die Erholungsrate  $\Delta pH_i/\text{min}$  (gepaarter  $t$ -Test,  $P > 0.05$ ). (L) Effekt von Oligomycin & DIDS unter  $\text{Cl}^-$ -freien Bedingungen auf  $t_{1/2}$  in s (gepaarter  $t$ -Test,  $P > 0.05$ ). (A)-(L) MW  $\pm$  SE, Anzahl der Experimente ist in Klammern angegeben.

An der Erholung von einer intrazellulären Alkalisierung können parallel mehrere Transportsysteme beteiligt sein. Deshalb ist denkbar, dass der Ausfall eines Transportes durch andere Mechanismen ausgeglichen wird. In den folgenden Experimenten wurden aus diesem Grund jeweils verschiedene Ionensubstitutionen und/oder Inhibitoren miteinander kombiniert (Tab. 3.10). Die Verwendung von Oligomycin unter  $\text{Cl}^-$ - &

Glutamat-freien Bedingungen (Abb. 3.13 A) sollte den Na<sup>+</sup>-abhängigen Glutamat-Transporter und den AE hemmen. Oligomycin reduziert zudem die intrazelluläre ATP-Konzentration. Dies hatte keine Effekte auf die durch den Na-acetat-Vorpuls hervorgerufene Alkalisierung (gepaarter *t*-Test,  $P > 0.05$ , Abb. 3.13 B), die Erholungsrate (*Wilcoxon-Test*,  $P > 0.05$ , Abb. 3.13 C) oder  $t_{1/2}$  (gepaarter *t*-Test,  $P > 0.05$ , Abb. 3.13 D). Die Verwendung von DIDS unter Cl<sup>-</sup>- & Glutamat-freien Bedingungen blockiert gleichzeitig HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-abhängige Transporter und den Na<sup>+</sup>-abhängigen Glutamat-Transporter. Diese Bedingungen führten zu einer signifikanten Verlangsamung der Erholungsrate (gepaarter *t*-Test,  $P < 0.05$ , Abb. 3.13 G). Effekte auf die ausgelöste Alkalisierung und  $t_{1/2}$  konnten nicht beobachtet werden (gepaarter *t*-Test,  $P > 0.05$ , Abb. 3.13 F & H). DIDS & Oligomycin wurden auch unter Glutamat-freien Bedingungen verwendet. Hierbei sind HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-abhängige und ATP-verbrauchende Prozesse negativ beeinflusst und der Na<sup>+</sup>-abhängige Glutamat-Transporter blockiert. Auch hier konnte ein verlangsamender Effekt auf die Erholungsrate festgestellt werden (gepaarter *t*-Test,  $P < 0.05$ , Abb. 3.13 K). Auch die hervorgerufene Alkalisierung wurde signifikant verringert (gepaarter *t*-Test,  $P < 0.01$ , Abb. 3.13 J), während  $t_{1/2}$  unbeeinflusst blieb (*Wilcoxon-Test*,  $P > 0.05$ ).

**Tab. 3.10: Na-acetat-Vorpuls: Einfluss von extrazellulärem Cl<sup>-</sup> und/oder Glutamat & DIDS und/oder Oligomycin**

	Alkalisierung $\Delta\text{pH}_i$	$\Delta\text{pH}_i/\text{min}$	$t_{1/2}$ (s)
Kontrolle	0.63 ± 0.11	-0.31 ± 0.07	59.17 ± 5.97
Cl <sup>-</sup> & Glutamat-frei + Oligomycin	0.55 ± 0.08	-0.26 ± 0.04	65.83 ± 6.51
Kontrolle	0.61 ± 0.07	-0.22 ± 0.03	74.17 ± 7.90
Cl <sup>-</sup> & Glutamat-frei + DIDS	0.33 ± 0.09	-0.12 ± 0.01*	96.67 ± 33.56
Kontrolle	0.86 ± 0.08	-0.44 ± 0.07	64.17 ± 7.68
Glutamat + Oligomycin & DIDS	0.54 ± 0.07**	-0.15 ± 0.02*	107.50 ± 22.01



**Abb. 3.13: Na-acetat-Vorpuls: Additive Effekte auf die aktive  $pH_i$ -Regulation in den Speicheldrüsen von *Calliphora vicina***

(A)-(D) Effekt von  $Cl^-$ - & Glutamat-freiem Ringer + Oligomycin,  $n = 6$ . (B) Effekt von  $Cl^-$ - & Glutamat-freiem Ringer + Oligomycin auf die Alkalisierung nach dem Auswaschen von Na-acetat (gepaarter  $t$ -Test,  $P > 0.05$ ) in pH-Einheiten. (C) Effekt von  $Cl^-$ - & Glutamat-freiem Ringer + Oligomycin auf die Erholungsrate  $\Delta pH_i/min$  (*Wilcoxon*-Test,  $P > 0.05$ ). (D) Effekt von  $Cl^-$ - & Glutamat-freiem Ringer + Oligomycin auf  $t_{1/2}$  in s (gepaarter  $t$ -Test,  $P > 0.05$ ). (E)-(H) Effekt von  $Cl^-$ - & Glutamat-freiem Ringer + DIDS,  $n = 6$ . (F) Effekt von  $Cl^-$ - & Glutamat-freiem Ringer + DIDS auf die Alkalisierung nach dem Auswaschen von Na-acetat (gepaarter  $t$ -Test,  $P > 0.05$ ) in pH-Einheiten. (G) Effekt von  $Cl^-$ - & Glutamat-freiem Ringer + DIDS auf die Erholungsrate  $\Delta pH_i/min$  (gepaarter  $t$ -Test,  $P < 0.05$ ). (H) Effekt von  $Cl^-$ - & Glutamat-freiem Ringer + DIDS auf  $t_{1/2}$  in s (gepaarter  $t$ -Test,  $P > 0.05$ ). (I)-(L) Effekt von Glutamat-freiem Ringer + Oligomycin & DIDS,  $n = 6$ . (J) Effekt von Glutamat-freiem Ringer + Oligomycin & DIDS auf die Alkalisierung nach dem Ausspülen von Na-acetat (gepaarter  $t$ -Test,  $P < 0.01$ ) in pH-Einheiten. (K) Effekt von Glutamat-freiem Ringer + Oligomycin & DIDS auf die Erholungsrate  $\Delta pH_i/min$  (gepaarter  $t$ -Test,  $P < 0.05$ ). (L) Effekt von Glutamat-freiem Ringer + Oligomycin & DIDS auf  $t_{1/2}$  in s (*Wilcoxon*-Test,  $P > 0.05$ ). (A)-(L) MW  $\pm$  SE, Anzahl der Experimente ist in Klammern angegeben.

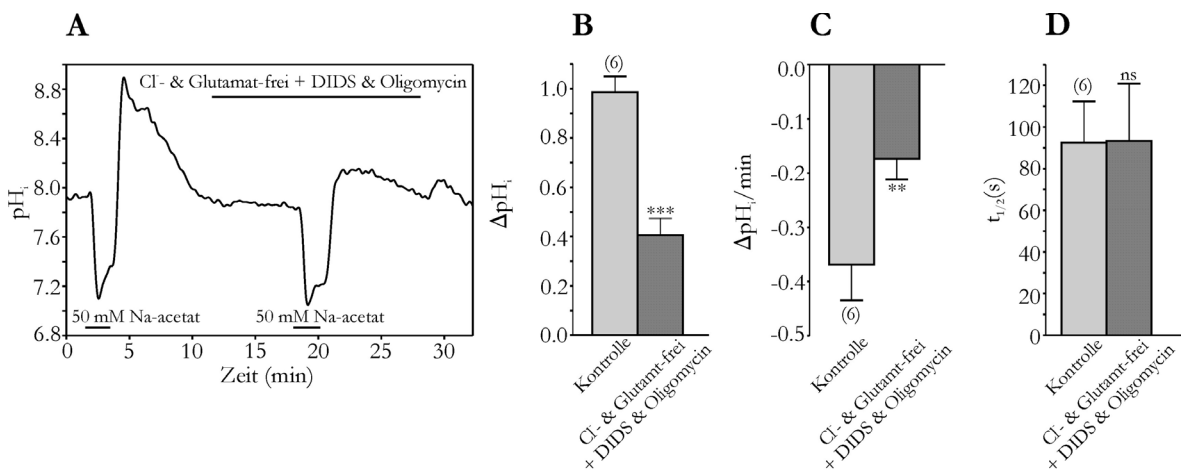
Im Folgenden sollte untersucht werden, inwieweit die Zellen in der Lage sind, einer intrazellulären Alkalisierung unter extremen Bedingungen entgegenzuwirken.



Die Wegnahme von  $\text{Cl}^-$  sollte die Aktivität eines AE beeinflussen. Weitere  $\text{HCO}_3^-$ -Transporter wurden mit DIDS blockiert. Der nachgewiesene  $\text{Na}^+$ -abhängige Glutamat-Transporter wurde durch das Entfernen von Glutamat gehemmt. Zusätzlich wurde die Verfügbarkeit von intrazellulärem ATP, durch Oligomycin, herabgesetzt. In diesem experimentellen Ansatz sollten die gängigsten ansäuernden Transportmechanismen gehemmt sein. Bemerkenswert hierbei ist, dass dieser pharmakologische Cocktail keinen Einfluss auf den Ruhe- $\text{pH}_i$ -Wert hatte. Die durch den Na-acetat-Vorpuls ausgelöste intrazelluläre Alkalisierung war unter diesen Bedingungen signifikant reduziert ( $n = 6$ , gepaarter  $t$ -Test,  $P < 0.0001$ , Abb. 3.14 B). Die Erholungsrate konnte mit diesen experimentellen Bedingungen signifikant verlangsamt werden ( $n = 6$ , gepaarter  $t$ -Test,  $P < 0.01$ , Abb. 3.14 C). Aufgrund der signifikant verringerten Alkalisierung würde man eine kürzere halbmaximale Erholung erwarten. Durch die stark verlangsamte Erholungsrate wurde dieser Effekt jedoch aufgehoben.  $t_{1/2}$  unterschied sich nicht signifikant von den Kontrollbedingungen ( $n = 6$ , *Wilcoxon*-Test,  $P > 0.05$ , Abb. 3.14 D). Auch unter extremen Bedingungen, waren die Zellen noch in der Lage, sich von einer intrazellulären Alkalisierung zu erholen.

**Tab. 3.11: Na-acetat-Vorpuls: Einfluss von extrazellulärem  $\text{Cl}^-$  & Glutamat und DIDS & Oligomycin**

	Alkalisierung $\Delta\text{pH}_i$	$\Delta\text{pH}_i/\text{min}$	$t_{1/2}$ (s)
Kontrolle	$0.99 \pm 0.07$	$-0.37 \pm 0.07$	$92.50 \pm 19.86$
$\text{Cl}^-$ & Glutamat-frei + DIDS & Oligomycin	$0.40 \pm 0.07^{***}$	$-0.17 \pm 0.04^{**}$	$93.33 \pm 27.53$



**Abb. 3.14: Na-acetat-Vorpuls: ATP-Abhängigkeit und Beitrag  $\text{pH}_i$ -regulierender Transporter zur aktiven  $\text{pH}_i$ -Regulation in den Speicheldrüsen von *Calliphora vicina***

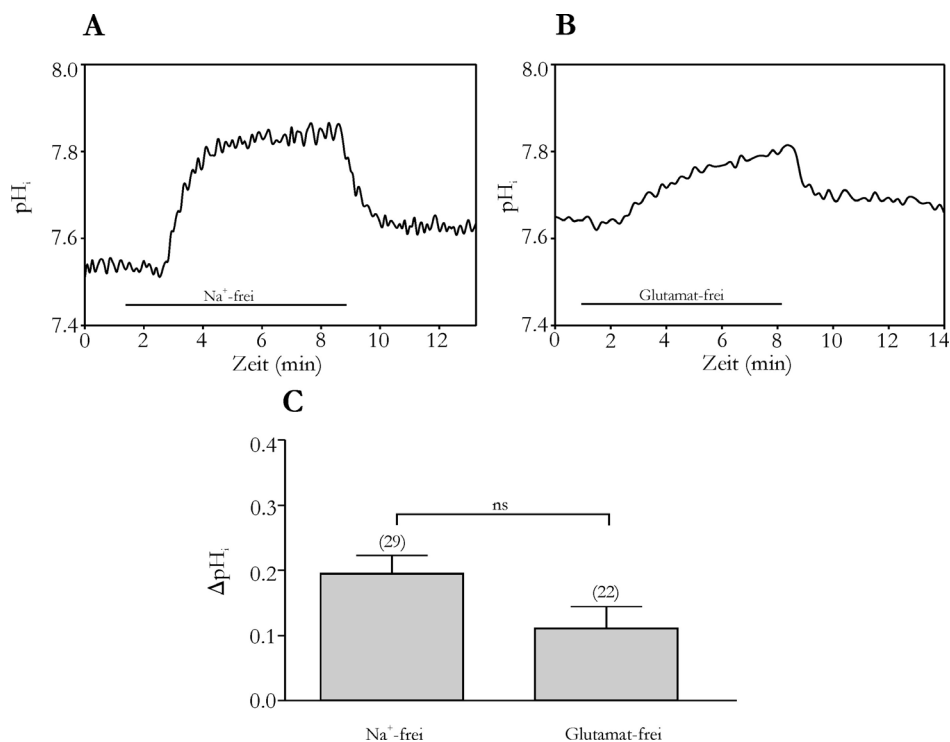
(A)-(D) Beitrag ATP-verbrauchender Transporter und  $\text{pH}_i$ regulierender Transporter,  $n = 6$ . (B) Effekt von Oligomycin & DIDS unter  $\text{Cl}^-$ - und Glutamat-freien Bedingungen auf die Alkalisierung nach dem Auswaschen von Na-acetat (gepaarter  $t$ -Test,  $P < 0.0001$ ) in pH-Einheiten. (C) Effekt von Oligomycin & DIDS unter  $\text{Cl}^-$ - und Glutamat-freien Bedingungen auf die Erholungsrate  $\Delta\text{pH}_i/\text{min}$  (gepaarter  $t$ -Test,  $P < 0.01$ ). (D) Effekt von Oligomycin & DIDS unter  $\text{Cl}^-$ - und Glutamat-freien Bedingungen auf  $t_{1/2}$  in s (*Wilcoxon*-Test,  $P > 0.05$ ). (A)-(D) MW  $\pm$  SE, Anzahl der Experimente ist in Klammern angegeben.

Die Ergebnisse zeigten, dass die Speicheldrüse von *Calliphora vicina* zahlreiche Möglichkeiten hat, einer intrazellulären Alkalisierung entgegenzuwirken. Die Erholung von einer intrazellulären Alkalisierung konnte nicht vollständig einem einzigen Transportsystem zugeordnet werden. Die Ergebnisse geben Hinweise auf eine  $\text{Cl}^-$ -Abhängigkeit und messen der intrazellulären Pufferkapazität entscheidende Bedeutung bei. Eine klare DIDS-Abhängigkeit konnte nicht beobachtet werden. Dies gibt einen ersten Hinweis auf einen  $\text{Cl}^-$ -abhängigen, aber DIDS-insensitiven Transportmechanismus.

## 3.2 Der $\text{Na}^+$ -abhängige Glutamat-Transporter

### 3.2.1 $\text{Na}^+$ - und Glutamatabhängige $\text{pH}_i$ -Änderungen

In den Speicheldrüsen von *Calliphora vicina* induzierte die Wegnahme von extrazellulärem  $\text{Na}^+$  eine intrazelluläre Alkalisierung von  $0.19 \pm 0.03$  pH-Einheiten ( $n = 29$ , Abb. 3.15 A & C). Diese Beobachtung war sehr ungewöhnlich, da  $\text{Na}^+$ -abhängige  $\text{pH}_i$ -regulierende Transportmechanismen entweder  $\text{H}^+$  aus der Zelle heraus transportieren oder  $\text{HCO}_3^-$  in die Zelle hinein. In beiden Fällen würde man in  $\text{Na}^+$ -freier Lösung eine intrazelluläre Ansäuerung erwarten. Da dies hier nicht der Fall war, muss ein weiteres  $\text{Na}^+$ -abhängiges Transportsystem vorhanden sein, das einen Einfluss auf den  $\text{pH}_i$ -Wert hat. Eine Möglichkeit hierfür ist ein  $\text{Na}^+$ -abhängiger Glutamat-Transporter. Dieser transportiert extrazelluläres Glutamat in die Zelle hinein und nutzt dafür die Energie des einwärts gerichteten elektrochemischen  $\text{Na}^+$ -Gradienten. Zudem wird mit jedem Molekül Glutamat ein  $\text{H}^+$  in die Zelle hinein transportiert. Ist der  $\text{Na}^+$ -abhängige Glutamat-Transport blockiert, werden weniger  $\text{H}^+$  in die Zelle hinein transportiert und es kommt intrazellulär zu einer Alkalisierung. Diese Alkalisierung wird bei Wegnahme von extrazellulärem  $\text{Na}^+$  sichtbar. Die Abb. 3.15 B zeigt, dass eine solche Alkalisierung auch bei Entfernen von Glutamat aus der Badlösung auftrat ( $0.11 \pm 0.03$  pH-Einheiten,  $n = 22$ ). Die  $\text{pH}_i$ -Änderungen unter  $\text{Na}^+$ - und Glutamat-freien Bedingungen unterschieden sich nicht signifikant voneinander (ungepaarter  $t$ -Test,  $P > 0.05$ , Abb. 3.15 C). Diese Beobachtungen deuteten darauf hin, dass in den Speicheldrüsen von *Calliphora vicina* ein  $\text{Na}^+$ -abhängiger Glutamat-Transporter aktiv ist.



**Abb. 3.15: Einfluss von extrazellulärem Na<sup>+</sup> und Glutamat auf den pHi-Wert**

(A) Überspülen der Drüsen mit Na<sup>+</sup>-freiem Ringer führte zu einer intrazellulären Alkalisierung (n = 29). (B) Unter Glutamat-freien Bedingungen trat ebenfalls eine intrazelluläre Alkalisierung (n = 22). (C) Die auftretende Alkalisierung unter Na<sup>+</sup>-freien und Glutamat-freien Bedingungen unterschieden sich nicht signifikant voneinander (ungepaarter *t*-Test,  $P > 0.05$ , MW ± SE, Anzahl der Experimente ist in Klammern angegeben).

### 3.2.2 Molekularbiologischer Nachweis des Na<sup>+</sup>-abhängigen Glutamat-Transporters

Mit den oben beschriebenen physiologischen Experimenten lässt sich ein Na<sup>+</sup>-abhängiger Glutamat-Transporter nicht zweifelsfrei nachweisen. Deshalb sollte das Vorhandensein eines Na<sup>+</sup>-abhängigen Glutamat-Transporters auch molekularbiologisch nachgewiesen werden. Dazu wurde eine NCBI-Datenbankrecherche durchgeführt. Aminosäure (AS)-Sequenzen Na<sup>+</sup>-abhängiger Glutamat-Transporter (EAAT) von Insekten wurden verglichen und hochkonservierte Bereiche identifiziert. Vier degenerierte Primer wurden so konstruiert dass sie in den konservierten Bereichen lagen (Abb. 3.16).

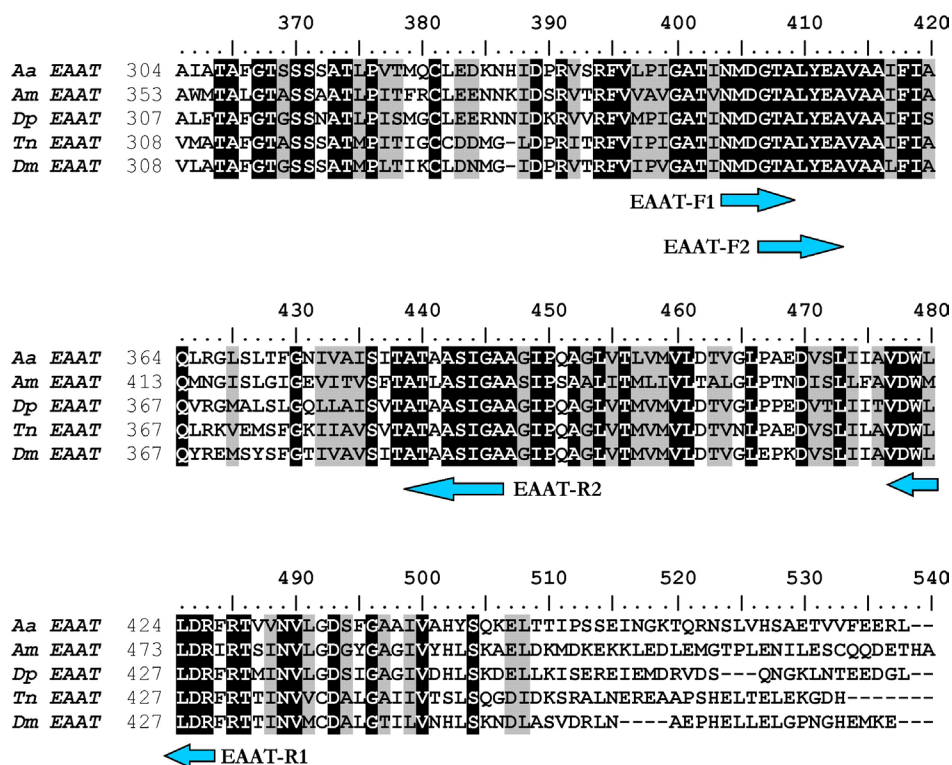


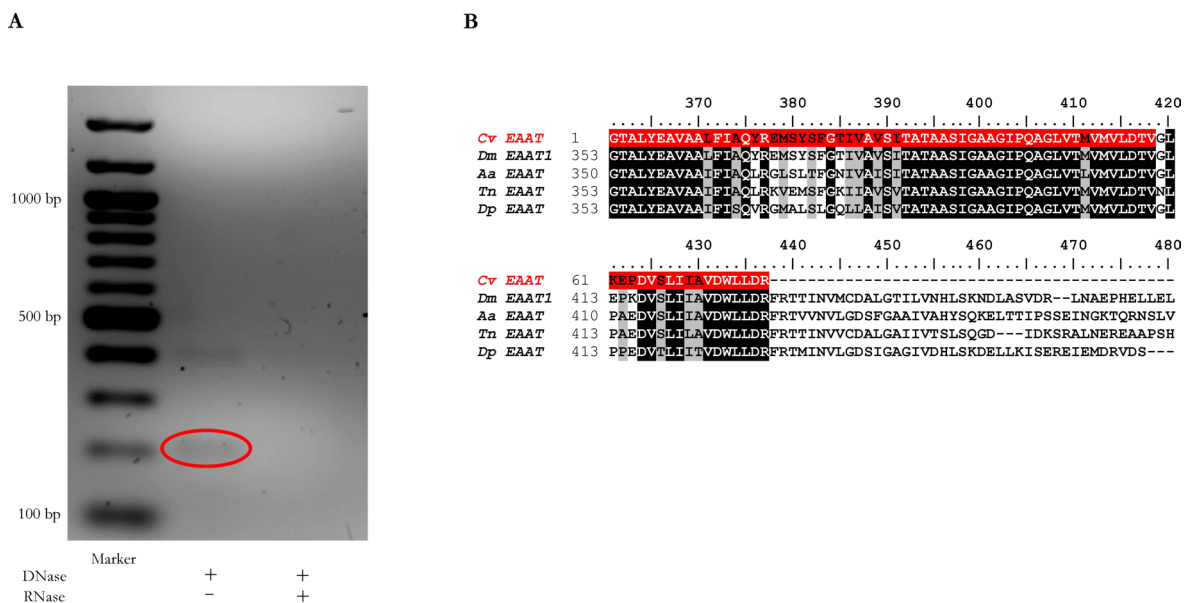
Abb. 3.16: Vergleich der Aminosäuresequenz des  $\text{Na}^+$ -abhängigen Glutamat-Transporters verschiedener Insekten

Die Abbildung zeigt einen Aminosäurevergleich des  $\text{Na}^+$ -abhängigen Glutamat-Transporters (EAAT) von *Aedes aegypti* (Aa EAAT #AAP76304), *Apis mellifera* (Am EAAT #AAD34586), *Diptera punctata* (Dp EAAT #AAF71701), *Trichoplusia ni* (Tn EAAT #AAB84380) und *Drosophila melanogaster* (Dm EAAT #AAD09142). Schwarze Bereiche markieren identische Aminosäuren. Konservativ ausgetauschte Aminosäuren sind grau hinterlegt. Die Pfeile markieren die Position der degenerierten Primer.

Es wurde eine PCR mit degenerierten Primern auf einer cDNA-Bibliothek der Speicheldrüse von *Calliphora vicina* durchgeführt. Dabei konnte mit der Primerkombination EAAT-F2 & EAAT-R1 (Abb. 3.16) ein Fragment amplifiziert werden, das der erwarteten Länge von 231 Basenpaaren (bp) (siehe Anhang Abb. 6.1) entsprach. Dieses Fragment wurde isoliert und in den pGEM<sup>®</sup>-T-Vektor ligiert. Es erfolgte eine Transformation des Plasmids in kompetente *E. coli*-Zellen. Diese wurden auf Agar-Platten ausplattiert. Mittels Blau-Weiß-Selektion wurden positive Klone identifiziert und in LB-Medium umgesetzt. Nach Vermehrung der Bakterien über Nacht wurde das Plasmid aufgereinigt. Die Überprüfung der Länge des eingebauten Fragments erfolgte durch einen Restriktionsverdau. Fragmente der richtigen Größe wurden durch die Firma GATC Biotech sequenziert. Die Expression des EAAT wurde durch eine RT-PCR mit spezifischen Primern nachgewiesen (Abb. 3.17 A). Eine Kontamination mit genomischer DNA kann ausgeschlossen werden, da mit eingesetzter RNA, die einer DNase / RNase-Behandlung unterzogen wurde, kein Produkt amplifiziert werden konnte.

Die abgeleitete AS-Sequenz des klonierten Fragments besteht aus 77 AS und wird im Folgenden *Cv EAAT* genannt. Die AS-Sequenz von *Cv EAAT* wurde durch eine BLAST-Analyse mit anderen AS-Sequenzen verglichen. Dabei ergaben sich hohe Ähnlichkeiten mit AS-Sequenzen  $\text{Na}^+$ -abhängiger Glutamat-Transporter

anderer Insekten (Abb. 3.17 B). Die AS-Sequenz von *Cv EAAT* war 100% identisch zu der AS-Sequenz eines Na<sup>+</sup>-abhängigen Glutamat-Transporters von *Drosophila melanogaster* (Dm EAAT). 79% - 84% Ähnlichkeit bestanden zu EAAT-AS-Sequenzen von *Aedes aegypti* (Aa EAAT) (84%), *Trichoplusia ni* (Tn EAAT) (81%) und *Diptera punctata* (Dp EAAT) (79%). Damit konnte der Nachweis erbracht werden, dass in den Speicheldrüsen von *Calliphora vicina* ein Na<sup>+</sup>-abhängiger Glutamat-Transporter exprimiert wird.

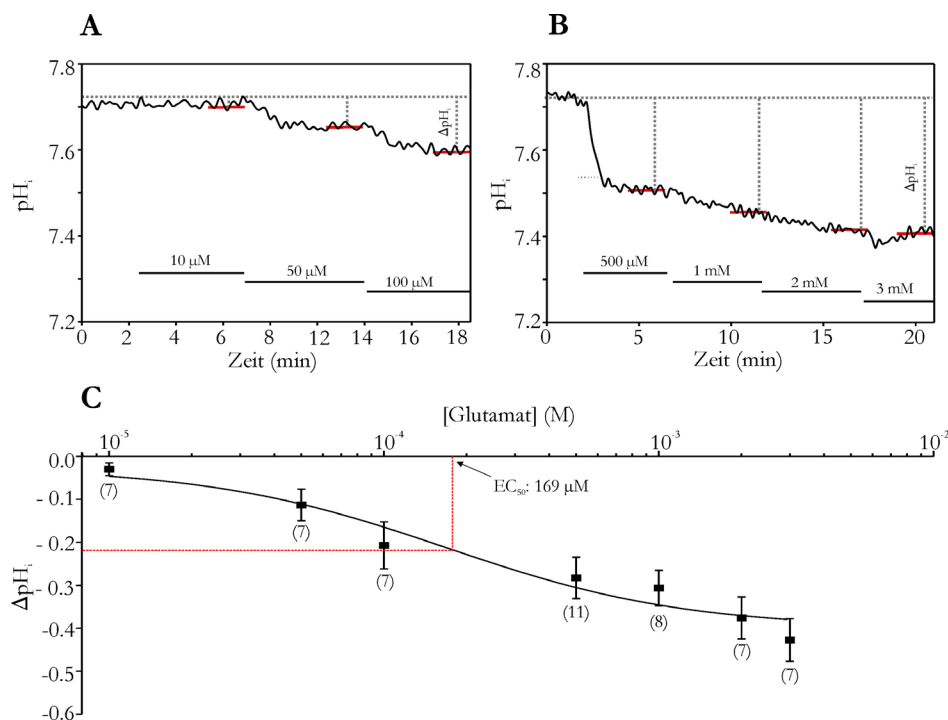


**Abb. 3.17: BLAST-Analyse der *Cv EAAT* - Aminosäuresequenz**

(A) Zeigt die Expression des EAAT in *Calliphora* Speicheldrüsen, nachgewiesen durch eine RT-PCR mit spezifischen Primern. Ausgehend von isolierter RNA aus *Calliphora* Speicheldrüsen konnte mit spezifischen Primern ein Fragment in der erwarteten Größe amplifiziert werden. Als Negativkontrolle diente RNA die vor der RT-PCR einer DNase / RNase-Behandlung unterzogen wurde. (B) Die BLAST-Analyse zeigt eine hohe Ähnlichkeit der EAAT-AS-Sequenz von *Calliphora vicina* (*Cv EAAT*) zu EAAT-AS-Sequenzen von *Drosophila melanogaster* (Dm EAAT1 #AAD47829), *Aedes aegypti* (Aa EAAT #AAP76304), *Trichoplusia ni* (Tn EAAT #AAB84380) und *Diptera punctata* (Dp EAAT #AAF71701). Schwarze Bereiche markieren identische Aminosäuren. Konservativ ausgetauschte Aminosäuren sind grau hinterlegt.

### 3.2.3 Dosis-Wirkungskurve für den Na<sup>+</sup>-abhängigen Glutamat-Transporter

Zur weiteren physiologischen Charakterisierung des Na<sup>+</sup>-abhängigen Glutamat-Transporters aus *Calliphora vicina* wurde eine Dosis-Wirkungskurve für Glutamat erstellt. Die Drüsen wurden zunächst 10 min mit Glutamat-freier Lösung perfundiert. Anschließend wurden die Speicheldrüsen mit steigenden Glutamat-Konzentrationen überspült (Abb. 3.18 A & B) und die dadurch auftretende intrazelluläre Ansäuerung gemessen (ausgehend vom pH<sub>i</sub> nach Inkubation in Glutamat-freier Lösung). Die Auswertung der Dosis-Wirkungskurve, unter diesen experimentellen Bedingungen, ergab einen EC<sub>50</sub>-Wert von 169 μM Glutamat (Abb. 3.18 C).



**Abb. 3.18: Dosis-Wirkungskurve für den Na<sup>+</sup>-abhängigen Glutamat-Transporter in den Speicheldrüsen von *Calliphora vicina***

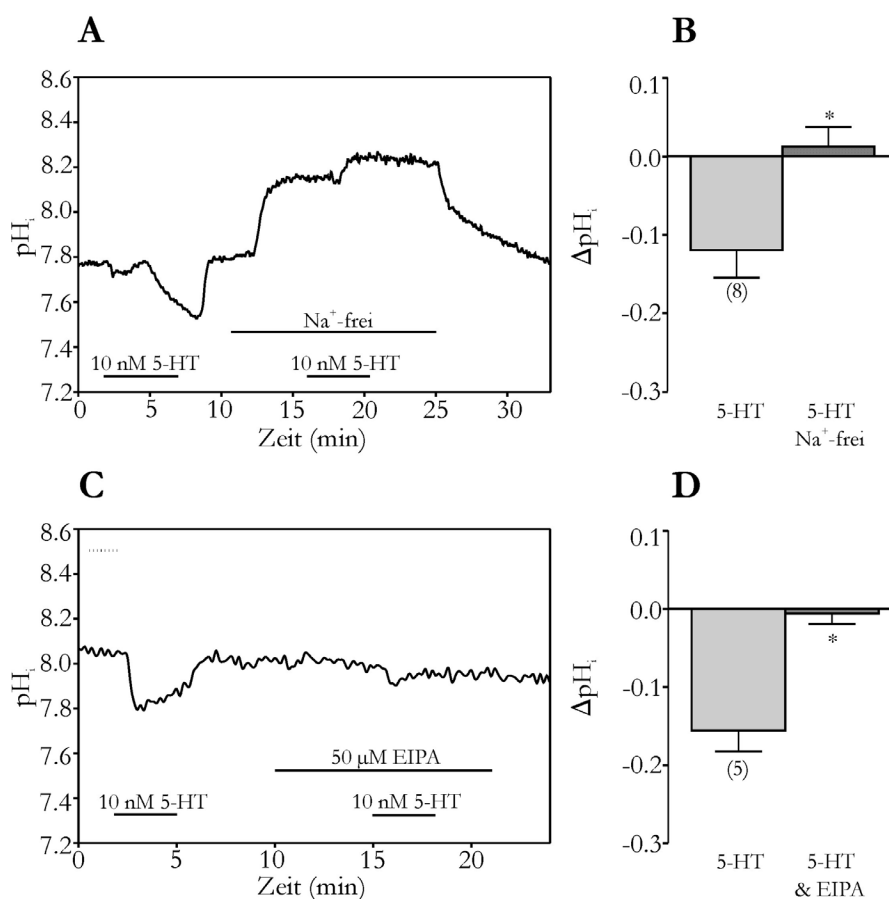
(A) & (B) Die Drüsen wurden zunächst in Glutamat-freier Ringer inkubiert. Aufsteigende Glutamat-Konzentrationen induzierten eine intrazelluläre Ansäuerung. (C) Die Glutamat-induzierte Ansäuerung bei definierten Glutamat-Konzentrationen wurde gemessen und eine Dosis-Wirkungskurve erstellt (*nichtlineare Regression, sigmoidale Dosis-Wirkungskurve*). Es ergibt sich ein EC<sub>50</sub>-Wert von 169 μM Glutamat (Anzahl der Experimente ist in Klammern angegeben, MW ± SE).

### 3.3 5-HT-induzierte pHi-Änderungen

#### 3.3.1 Einfluss von pHi-regulierenden Transportern auf die 5-HT-induzierte intrazelluläre Ansäuerung

Stimulierung mit 5-HT induziert in den Speicheldrüsen von *Calliphora vicina* eine intrazelluläre Ansäuerung. Die Rolle der Carboanhydrase und der V-ATPase, bei dieser Ansäuerung, konnte bereits in einer früheren Arbeit gezeigt werden (Schewe 2005, Schewe et al. 2008). Unbekannt war hingegen die Rolle von weiteren pHi-regulierenden Transportern in diesem Szenario. Es ist bekannt, dass in Säugerzellen der NHE und der AE in Prozesse der Speichelsekretion involviert sind (Turner & Sugiya 2002). Diese Transporter spielen in vielen anderen Zellen zudem eine entscheidende Rolle bei der pHi-Regulation (Boron 1986, Boron 2004). Deshalb wurde geprüft, ob und welche pHi-regulierende Transporter zur Entstehung der 5-HT-induzierten Ansäuerung beitragen. Die Wegnahme von extrazellulärem Na<sup>+</sup> blockiert alkalisierende pHi-regulierende Transporter (NHE, NDBCE und einwärts gerichteter NBC), sowie in den *Calliphora* Speicheldrüsen auch einen Na<sup>+</sup>-abhängigen Glutamat-Transporter. Abb. 3.19 A & B zeigen eine Stimulierung der Drüsen mit 10 nM 5-HT unter Kontrollbedingungen und in Na<sup>+</sup>-freier Ringerlösung (n = 8). Unter Kontrollbedingungen induzierte 10 nM 5-HT eine intrazelluläre Ansäuerung

von  $-0.12 \pm 0.03$  pH-Einheiten. Unter  $\text{Na}^+$ -freien Bedingungen war diese Ansäuerung blockiert und die  $\text{pH}_i$ -Änderung betrug  $0.01 \pm 0.02$  pH-Einheiten (Abb. 3.19 B,  $n = 8$ , gepaarter  $t$ -Test,  $P < 0.05$ ). Um zu prüfen, ob dieser Effekt auf die Aktivität eines NHE zurückgeht, wurde der spezifische Hemmstoff EIPA verwendet. In der Gegenwart von  $50 \mu\text{M}$  EIPA war die 5-HT-induzierte Ansäuerung ebenfalls blockiert. Unter diesen Bedingungen trat keine Ansäuerung mehr auf ( $0.00 \pm 0.01$  pH-Einheiten) gegenüber einer Ansäuerung von  $-0.15 \pm 0.02$  pH-Einheiten unter Kontrollbedingungen (Abb. 3.19 C & D,  $n = 5$ , gepaarter  $t$ -Test,  $P < 0.05$ ). Die  $\text{Na}^+$ -Abhängigkeit der 5-HT-induzierten Ansäuerung war somit vollständig auf die Aktivität eines NHE zurückzuführen. Interessanterweise spielte der NHE in der unstimulierten Drüse keine entscheidende Rolle (siehe 3.1.1 & 3.1.2). Daraus resultierend kann man davon ausgehen, dass der NHE hier stimulus-abhängig aktiviert wird.

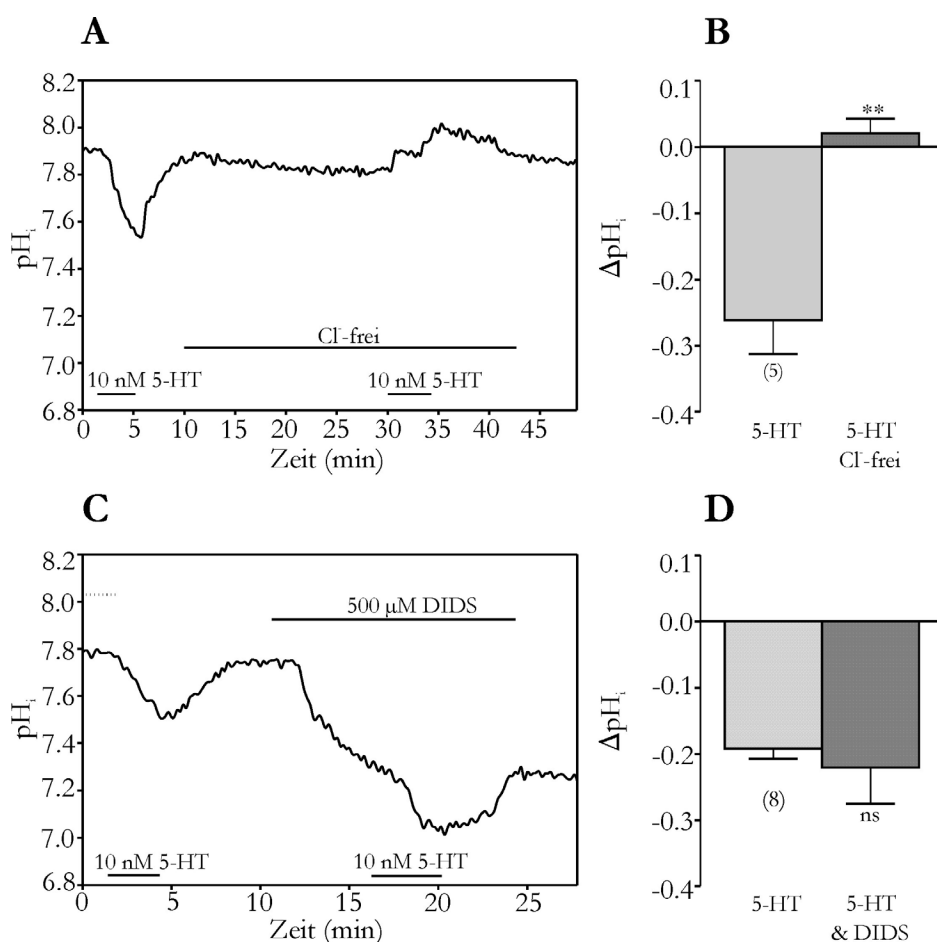


**Abb. 3.19:  $\text{Na}^+$ -Abhängigkeit der 5-HT-induzierten intrazellulären Ansäuerung**

(A) & (B) Stimulierung der Drüsen mit  $10 \text{ nM}$  5-HT unter Kontrollbedingungen und unter  $\text{Na}^+$ -freien Bedingungen. In  $\text{Na}^+$ -freiem Ringer war die unter Kontrollbedingungen induzierte Ansäuerung fast vollständig blockiert ( $n = 8$ ,  $\text{MW} \pm \text{SE}$ , gepaarter  $t$ -Test,  $P < 0.05$ ). (C) & (D) Stimulierung der Drüsen mit  $10 \text{ nM}$  5-HT unter Kontrollbedingungen und in der Gegenwart von  $50 \mu\text{M}$  EIPA. EIPA blockierte die unter Kontrollbedingungen auftretende Ansäuerung nahezu vollständig ( $n = 5$ ,  $\text{MW} \pm \text{SE}$ , gepaarter  $t$ -Test,  $P < 0.05$ ).

Eine Beeinflussung des AE kann durch die Wegnahme von extrazellulärem  $\text{Cl}^-$  oder die Verwendung von DIDS erreicht werden. Unter  $\text{Cl}^-$ -freien Bedingungen betrug die durch  $10 \text{ nM}$  5-HT induzierte  $\text{pH}_i$ -Änderung  $0.02 \pm 0.02$  pH-Einheiten. Gegenüber

der Kontrolle von  $-0.26 \pm 0.05$  pH-Einheiten war die Ansäuerung nahezu vollständig blockiert (Abb. 3.20 A & B,  $n = 5$ , gepaarter  $t$ -Test,  $P < 0.01$ ). In Abb. 3.20 C & D ist die 5-HT-induzierte Ansäuerung in Gegenwart von  $500 \mu\text{M}$  DIDS dargestellt. Zwischen einer Ansäuerung unter Kontrollbedingungen ( $-0.19 \pm 0.01$  pH-Einheiten) und der Ansäuerung vor einem DIDS-Hintergrund ( $-0.22 \pm 0.05$  pH-Einheiten) bestand kein statistisch signifikanter Unterschied ( $n = 8$ , gepaarter  $t$ -Test,  $P > 0.05$ ).



**Abb. 3.20:  $\text{Cl}^-$ -Abhängigkeit der 5-HT-induzierten intrazellulären Ansäuerung**

(A) & (B) Stimulierung der Drüsen mit  $10 \text{ nM}$  5-HT unter Kontrollbedingungen und unter  $\text{Cl}^-$ -freien Bedingungen. In  $\text{Cl}^-$ -freiem Ringer war die unter Kontrollbedingungen induzierte Ansäuerung fast vollständig blockiert ( $n = 5$ ,  $\text{MW} \pm \text{SE}$ , gepaarter  $t$ -Test,  $P < 0.01$ ). (C) & (D) Stimulierung der Drüsen mit  $10 \text{ nM}$  5-HT unter Kontrollbedingungen und in der Gegenwart von  $500 \mu\text{M}$  DIDS. DIDS hatte keinen signifikanten Effekt auf die 5-HT-induzierte Ansäuerung ( $n = 8$ ,  $\text{MW} \pm \text{SE}$ , gepaarter  $t$ -Test,  $P > 0.05$ ).

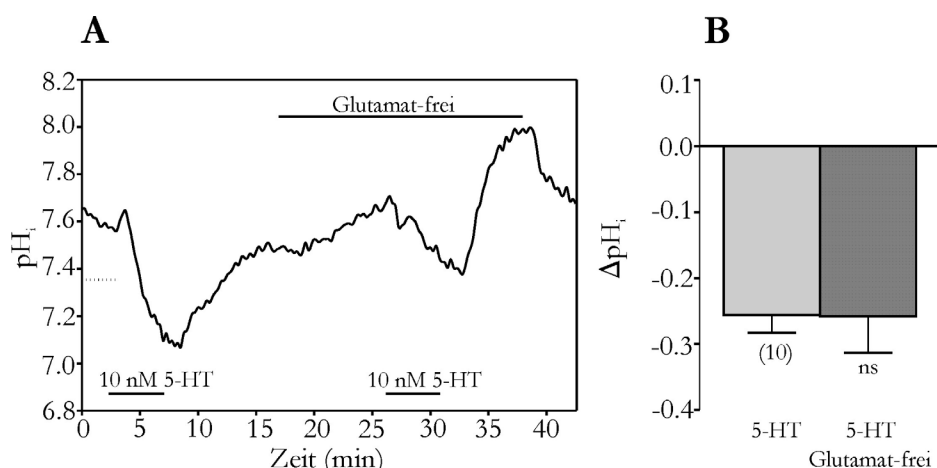
Zusammengenommen lässt sich sagen, dass die durch  $10 \text{ nM}$  5-HT ausgelöste intrazelluläre Ansäuerung  $\text{Na}^+$ - und EIPA-sensitiv, sowie  $\text{Cl}^-$ -sensitiv war. Die  $\text{Cl}^-$ -Abhängigkeit der 5-HT-induzierten Ansäuerung lässt eine Beteiligung des AE vermuten. Es bestand jedoch keine DIDS-Sensitivität. Zusammengenommen mit den Na-acetat-Vorpuls-Experimenten könnte dies ein weiterer Hinweis auf einen DIDS-insensitiven AE sein.



### 3.3.2 Glutamat-Abhängigkeit der 5-HT-induzierten intrazellulären Ansäuerung

Berridge beschrieb schon 1970 (Berridge 1970), dass die Speichelsekretion bei *Calliphora vicina* von der Verfügbarkeit von energiereichen Substraten im Ringer abhängt. Er beobachtete, dass das Vorhandensein von Glutamat im Ringer zu einer hohen Sekretionsrate führte. Er vermutete, dass der vorherrschende energiegewinnende Prozess in diesen Speicheldrüsen der Citratzyklus ist und nicht die Glykolyse (Rapp & Berridge 1981). Davon ausgehend wurde überprüft, welchen Einfluss das Fehlen von extrazellulärem Glutamat auf die 5-HT-induzierte intrazelluläre Ansäuerung hat. Bei einer Kontrollstimulierung mit 10 nM 5-HT konnte eine Ansäuerung von  $-0.25 \pm 0.03$  pH-Einheiten ( $n = 10$ , Abb. 3.21 A & B) beobachtet werden. Unter Glutamat-freien Bedingungen betrug die Ansäuerung  $-0.25 \pm 0.06$  pH-Einheiten ( $n = 10$ , Abb. 3.21 A & B). Beide Werte unterschieden sich nicht statistisch signifikant voneinander ( $n = 10$ , Abb. 3.21 B, gepaarter  $t$ -Test,  $P > 0.05$ ).

In diesem experimentellen Ansatz ist kein Effekt von Glutamat auf die 5-HT-induzierte intrazelluläre Ansäuerung zu beobachten. Das Glutamat dennoch eine wichtige Rolle in den *Calliphora* Speicheldrüsen spielt wurde bereits in Abschnitt 3.2 deutlich.



**Abb. 3.21: Glutamat-Abhängigkeit der 5-HT-induzierten intrazellulären Ansäuerung**

(A) & (B) Stimulierung der Drüsen mit 10 nM 5-HT unter Kontrollbedingungen und in Abwesenheit von Glutamat. Unter Glutamat-freien Bedingungen war die 5-HT-induzierte intrazelluläre Ansäuerung nicht signifikant beeinflusst ( $n = 10$ , MW  $\pm$  SE, gepaarter  $t$ -Test,  $P > 0.05$ ).

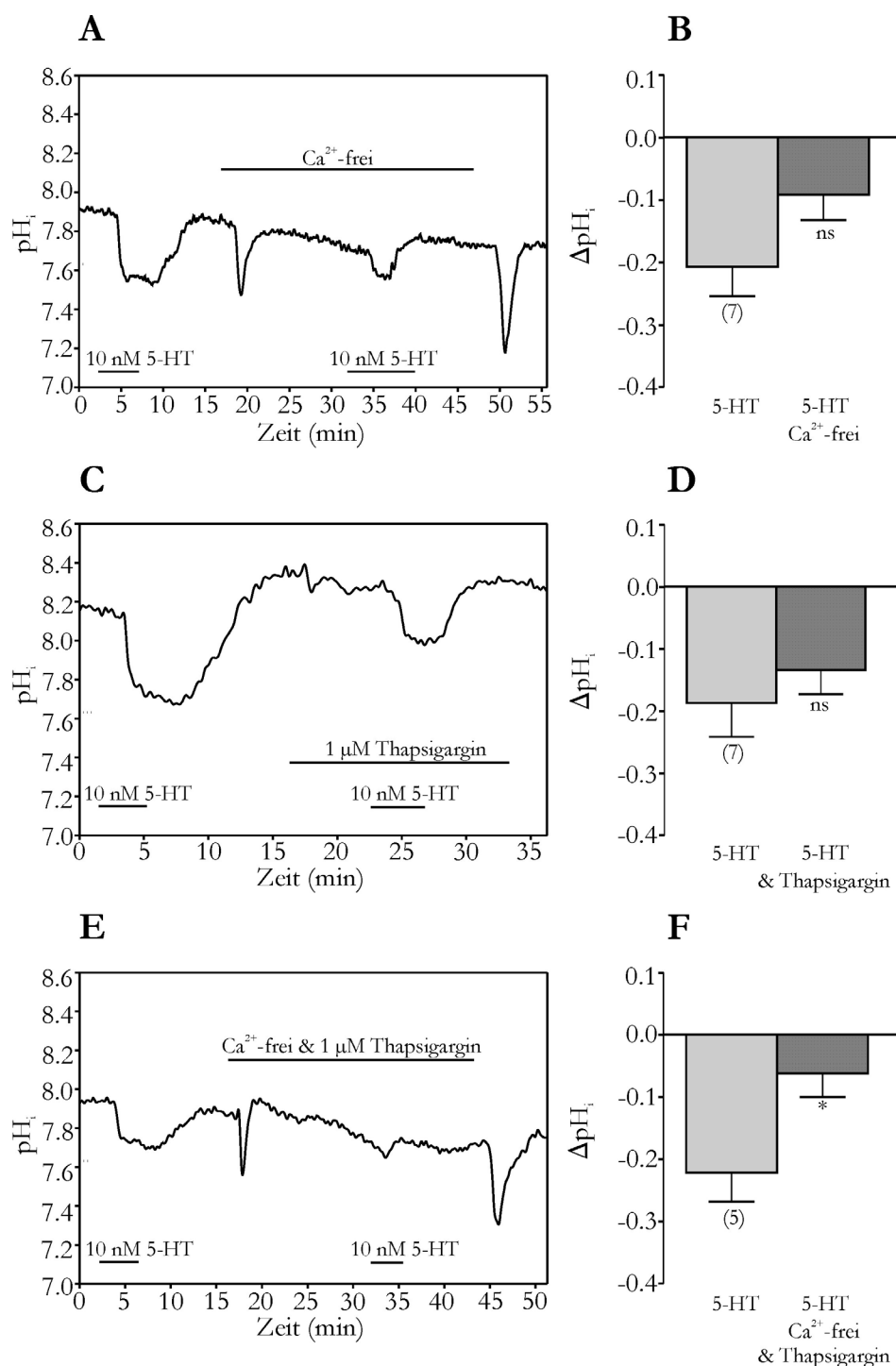
### 3.3.3 $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit der 5-HT-induzierten intrazellulären Ansäuerung

Bisherige Untersuchungen haben gezeigt, dass 10 nM 5-HT eine intrazelluläre Ansäuerung auslösen. Dieser Vorgang kann durch eine Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels (z.B. durch den Adenylatzyklase-Aktivator Forskolin oder das cAMP-Analogon 8-CPT-cAMP) imitiert werden (siehe 1.4, Schewe 2005, Schewe et al. 2008). Die Ansäuerung ist also unabhängig von einer Erhöhung der intrazellulären

Ca<sup>2+</sup>-Konzentration. Andere Arbeiten haben aber bereits gezeigt, dass es Wechselwirkungen zwischen cAMP-Weg und IP<sub>3</sub>/Ca<sup>2+</sup>-Weg gibt (Schmidt et al. 2008, Fechner 2008, Voss 2008).

In den folgenden Messungen wurde daher geprüft, ob eine Störung der Ca<sup>2+</sup>-Homöostase einen Einfluss auf die 5-HT-induzierten pH<sub>i</sub>-Änderungen hat. Die Kontrollstimulierung mit 10 nM 5-HT zeigte eine Ansäuerung von  $-0.20 \pm 0.04$  pH-Einheiten (n = 7, Abb. 3.22 A & B). Unter Ca<sup>2+</sup>-freien Bedingungen erfolgt nur eine Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus dem ER, jedoch kein Ca<sup>2+</sup>-Einstrom von außen in die Zelle hinein (Zimmermann & Walz 1997). In Ca<sup>2+</sup>-freier Ringerlösung betrug die 5-HT-induzierte Ansäuerung  $-0.09 \pm 0.04$  pH-Einheiten (n = 7, Abb. 3.22 A & B). Eine Wegnahme von extrazellulären Ca<sup>2+</sup> verminderte die 5-HT-induzierte Ansäuerung. Dieser Effekt war jedoch statistisch nicht signifikant (n = 7, gepaarter *t*-Test,  $P > 0.05$ , Abb. 3.22 B). Allerdings trat die Erholung von dieser Ansäuerung in 50% dieser Messungen bereits während der 5-HT-Stimulierung ein. Dieser Effekt trat unter Kontrollbedingungen in keiner Messung auf. Ein intakte Ca<sup>2+</sup>-Homöostase scheint also für die Aufrechterhaltung der 5-HT-induzierten Ansäuerung notwendig zu sein. Thapsigargin ist ein Blocker der Ca<sup>2+</sup>-ATPase am ER (SERCA-Pumpe) und verhindert die Wiederaufnahme von Ca<sup>2+</sup> in das ER (Zimmermann & Walz 1997, Zimmermann 1998). In der Gegenwart von 1 μM Thapsigargin induzierte 10 nM 5-HT eine intrazelluläre Ansäuerung von  $-0.13 \pm 0.04$  pH-Einheiten (n = 7, Abb. 3.22 C & D). Im Vergleich dazu betrug die Ansäuerung unter Kontrollbedingungen  $-0.18 \pm 0.05$  pH-Einheiten (n = 7, Abb. 3.22 C & D). Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen einer Ansäuerung unter Kontrollbedingungen und in der Gegenwart von Thapsigargin (n = 7, gepaarter *t*-Test,  $P > 0.05$ , Abb. 3.22 D). Blockiert man die SERCA-Pumpe mit Thapsigargin in Ca<sup>2+</sup>-freier Badlösung ist der 5-HT-induzierte Ca<sup>2+</sup>-Anstieg komplett unterdrückt und man beobachtet bei 5-HT-Stimulierung nur einen einzelnen Ca<sup>2+</sup>-*Spike* (Zimmermann & Walz 1997). Die 5-HT-induzierte Ansäuerung war unter diesen Bedingungen signifikant reduziert. Sie betrug  $-0.06 \pm 0.04$  pH-Einheiten gegenüber der Kontrolle mit  $-0.22 \pm 0.05$  pH-Einheiten (Abb. 3.22 E & F, n = 5, gepaarter *t*-Test,  $P < 0.05$ ).

Stimulierung der Drüsen mit cAMP imitiert die 5-HT-induzierte Ansäuerung (siehe 1.4, Schewe 2005, Schewe et al. 2008). Unter diesen Bedingungen erfolgt kein Anstieg der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration (Dames et al. 2006). Damit ist eine Erhöhung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration keine Voraussetzung für eine 5-HT-induzierte Ansäuerung. Ist jedoch die Ca<sup>2+</sup>-Homöostase in den Zellen gestört, wird auch die 5-HT-induzierte Ansäuerung beeinflusst. Die Ursachen hierfür können vielfach sein und werden in der Diskussion ausführlich besprochen.

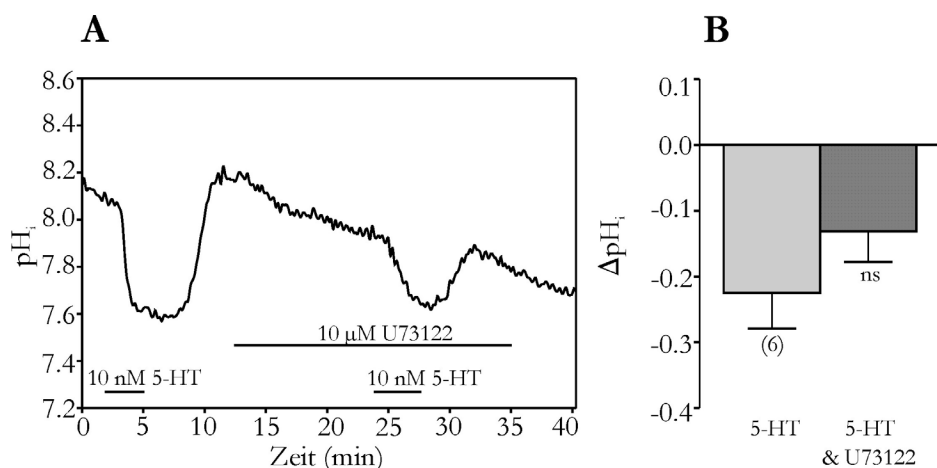


**Abb. 3.22:  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit der 5-HT-induzierten intrazellulären Ansäuerung**

(A) & (B) Stimulierung der Drüsen mit 10 nM 5-HT unter Kontrollbedingungen und unter  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Bedingungen. In  $\text{Ca}^{2+}$ -freier Badlösung war die durch 10 nM 5-HT induzierte Ansäuerung nicht statistisch signifikant verschieden von einer Ansäuerung unter Kontrollbedingungen ( $n = 7$ ,  $\text{MW} \pm \text{SE}$ , gepaarter  $t$ -Test,  $P > 0.05$ ). (C) & (D) In der Gegenwart von 1  $\mu\text{M}$  Thapsigargin war die 5-HT-induzierte Ansäuerung nicht signifikant beeinflusst ( $n = 7$ ,  $\text{MW} \pm \text{SE}$ , gepaarter  $t$ -Test,  $P > 0.05$ ). (E) & (F) Blockierung der SERCA-Pumpe mit 1  $\mu\text{M}$  Thapsigargin unter  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Bedingungen. Die 5-HT-induzierte Ansäuerung war unter diesen Bedingungen signifikant kleiner als unter Kontrollbedingungen ( $n = 5$ ,  $\text{MW} \pm \text{SE}$ , gepaarter  $t$ -Test,  $P < 0.05$ ).

Stimulierung der Speicheldrüsen von *Calliphora vicina* mit 5-HT aktiviert die Phospholipase C (PLC) (Fain & Berridge 1979 a & b, Irvine et al. 1982). Diese katalysiert die Umwandlung von  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  in  $\text{IP}_3$  und 1,2-DAG.  $\text{IP}_3$  bindet an  $\text{IP}_3$ -Rezeptor  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle am ER und induziert so eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung. Dies

führt zu einem Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Blockiert man die PLC mit einem geeignetem Hemmstoff, bleibt die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Erhöhung aus (Zimmermann & Walz 1999), die basale  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase ist jedoch intakt. In diesem reduzierten System kann dann untersucht werden, welche Auswirkungen dies auf die 5-HT-induzierte Ansäuerung hat. Die PLC wurde mit  $10 \mu\text{M}$  U73122 blockiert (Zimmermann & Walz 1999). In Gegenwart von U73122 induzierte  $10 \text{ nM}$  5-HT eine Ansäuerung von  $-0.13 \pm 0.05$  pH-Einheiten. Diese Ansäuerung war nicht signifikant verschieden zu einer Ansäuerung unter Kontrollbedingungen von  $-0.22 \pm 0.05$  pH-Einheiten ( $n = 6$ , Abb. 3.23 A & B, gepaarter  $t$ -Test,  $P > 0.05$ ). Hiermit konnte noch einmal gezeigt werden, dass eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Erhöhung keine Voraussetzung für eine 5-HT-induzierte Ansäuerung ist.

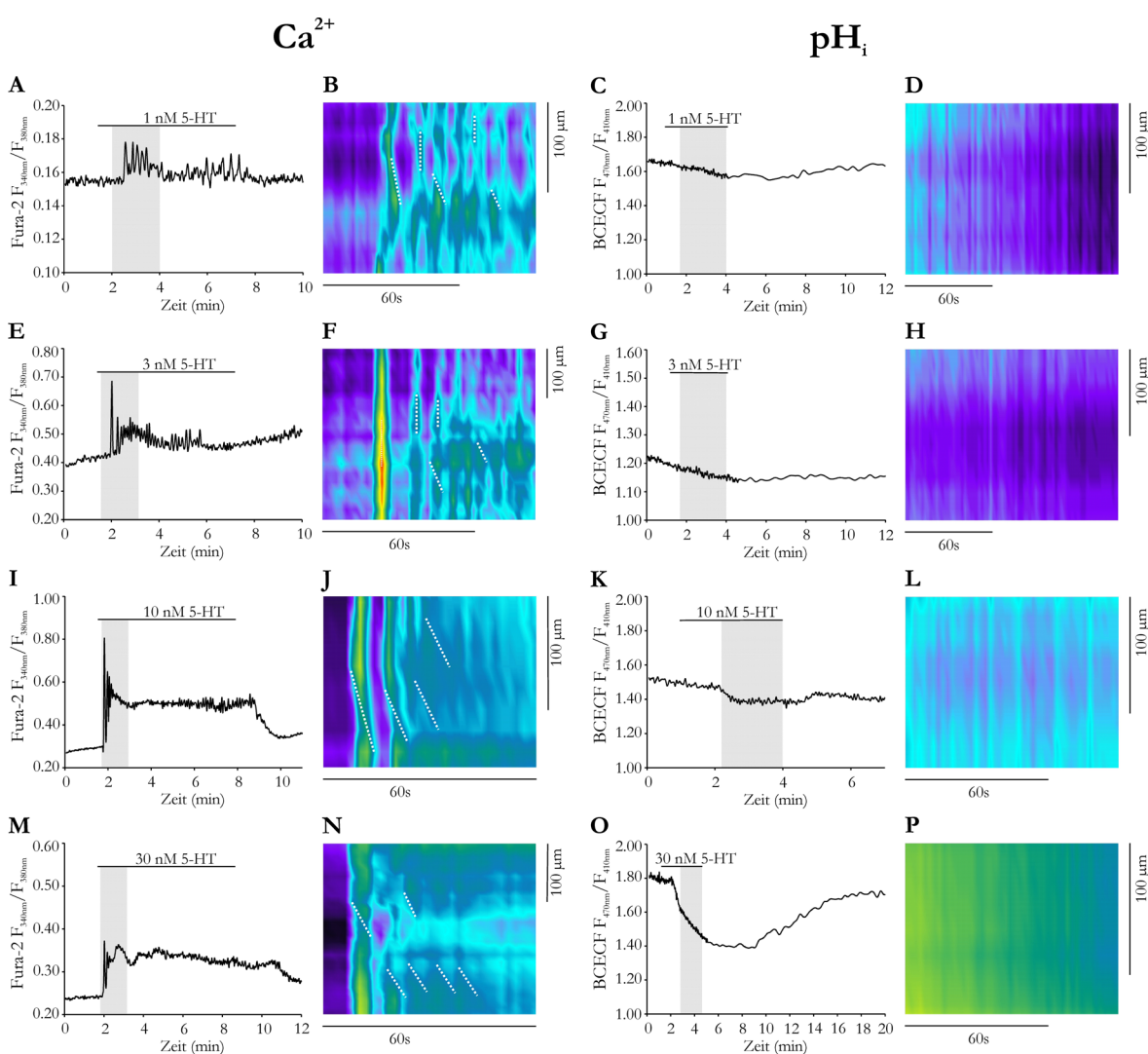


**Abb. 3.23: Einfluss von U73122 auf die 5-HT-induzierte intrazelluläre Ansäuerung**  
(A) & (B) Stimulierung der Drüsen mit  $10 \text{ nM}$  5-HT unter Kontrollbedingungen und in Gegenwart von  $10 \mu\text{M}$  U73122. U73122 beeinflusste die 5-HT-induzierte intrazelluläre Ansäuerung nicht signifikant ( $n = 6$ ,  $\text{MW} \pm \text{SE}$ , gepaarter  $t$ -Test,  $P > 0.05$ ).

### 3.3.4 Räumliche Muster der 5-HT-induzierten $\text{pH}_i$ -Änderungen

Die Stimulation der *Calliphora* Speicheldrüsen mit 5-HT führen zu einer Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in komplexen zeitlich-räumlichen Mustern. Schwellennahe 5-HT-Konzentrationen ( $1\text{-}3 \text{ nM}$  5-HT) induzieren intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen und interzelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Wellen (Zimmermann & Walz 1997 & 1999). Zudem konnte bereits gezeigt werden, dass sich cAMP- und  $\text{IP}_3/\text{Ca}^{2+}$ -Weg wechselseitig beeinflussen (Schmidt et al. 2008, Fechner 2008). Deshalb wurde untersucht, ob auch die 5-HT-induzierten  $\text{pH}_i$ -Änderungen ein derartiges zeitlich-räumliches Muster zeigen. Dazu wurden bei definierten 5-HT-Konzentrationen  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{pH}_i$ -Änderungen mittels *Ratiometric Imaging* registriert. Die erhaltenen Daten wurden in Raum-Zeit-Diagrammen (Abb. 3.24) dargestellt und miteinander verglichen. Schwellennahe 5-HT-Konzentrationen ( $1$  &  $3 \text{ nM}$  5-HT) führten zu intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen, die sich über kurze Strecken auch wellenförmig ausbreiteten. (Abb. 3.24 A & B,

E & F und Zimmermann & Walz 1997). Diese sind in Abb. 3.24 durch gerade weiße Linien (Oszillationen) und schräge weiße Linien (wellenförmige Ausbreitung) gekennzeichnet.  $\text{pH}_i$ -Änderungen ausgelöst durch 1 nM 5-HT (Abb. 3.24 C & D) und 3 nM 5-HT (Abb. 3.24 G & H) zeigten hingegen keine Oszillationen. Höhere 5-HT-Konzentrationen (10 & 30 nM 5-HT) lösten anfängliche  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen aus. Diesen folgte ein tonischer Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, der sich über kurze Distanzen wellenförmig ausbreiten kann (Abb. 3.24 I & J, M & N und Zimmermann & Walz 1997). Die wellenförmige Ausbreitung ist in den dargestellten Raum-Zeit-Diagrammen durch schräge weiße Linien angedeutet. Durch 10 nM 5-HT (Abb. 3.24 K & L) und 30 nM 5-HT (Abb. 3.24 O & P) ausgelöste  $\text{pH}_i$ -Änderungen zeigten keine intrazellulären Oszillationen und/oder interzellulären Wellen.



**Abb. 3.24: Vergleich der zeitlich-räumlichen Muster 5-HT-induzierter  $\text{pH}_i$ - &  $\text{Ca}^{2+}$ -Änderungen**

(A) & (B) Intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Änderung hervorgerufen durch 1 nM 5-HT. (C) & (D)  $\text{pH}_i$ -Änderung hervorgerufen durch 1 nM 5-HT. (E) & (F) Intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Änderung hervorgerufen durch 3 nM 5-HT. (G) & (H)  $\text{pH}_i$ -Änderung hervorgerufen durch 3 nM 5-HT. (I) & (J) Intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Änderung hervorgerufen durch 10 nM 5-HT. (K) & (L)  $\text{pH}_i$ -Änderung hervorgerufen durch 10 nM 5-HT. (M) & (N) Intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Änderung hervorgerufen durch 30 nM 5-HT. (O) & (P)  $\text{pH}_i$ -Änderung hervorgerufen durch 30 nM 5-HT. (A), (C), (E), (G), (I), (K), (M) & (O) Graue Balken in den dargestellten Messungen kennzeichnen den zeitlichen Bereich der in den Raum-Zeit-Diagrammen, jeweils rechts daneben, abgebildet ist. (B), (D), (F), (H), (J), (L), (N) & (P) Die Darstellung des  $\text{pH}_i$  und der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration erfolgt durch Falschfarben. Gerade weiße Linien kennzeichnen Oszillationen. Schräge weiße Linien deuten eine wellenförmige  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausbreitung an.

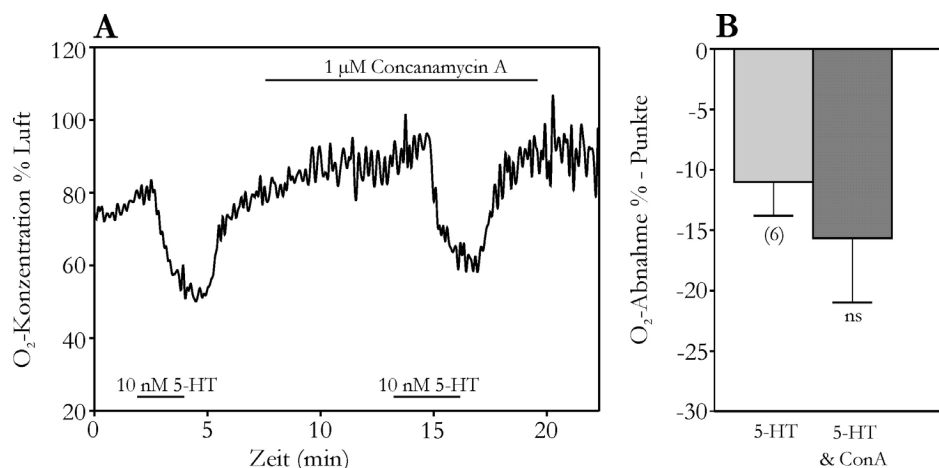
Die Raum-Zeit-Diagramme zeigten, dass die  $\text{Ca}^{2+}$ -Änderungen in Form von intrazellulären Oszillationen und interzellulären Wellen auftraten, die  $\text{pH}_i$ -Änderungen jedoch keine charakteristischen zeitlich-räumlichen Muster aufwiesen.

### 3.4 5-HT-induzierter Sauerstoffverbrauch

$\text{pH}_i$ -Messungen deuteten darauf hin, dass der 5-HT-induzierten Ansäuerung in den Speicheldrüsen von *Calliphora vicina*, eine verstärkte Aktivierung der Zellatmung zugrunde liegt. Dies ist gleichbedeutend mit einem erhöhten  $\text{O}_2$ -Verbrauch der Drüsenzellen. Durch die Nutzung von Nanopartikeln, die mit einem  $\text{O}_2$ -empfindlichen Fluoreszenzfarbstoff mit langer Lumineszenz dotiert waren (Schmäzlin et al. 2005), konnte der  $\text{O}_2$ -Verbrauch in den Speicheldrüsen gemessen werden. Es wurde getestet, ob und in welchem Ausmaß die 5-HT-induzierte Speichelsekretion zu einer Stimulierung der Zellatmung führt. Die Nanopartikel wurden mittels eines Luftdruckpulses in das Lumen der Speicheldrüsen injiziert. Die luminale  $\text{O}_2$ -Konzentration in der unstimulierten Drüse betrug  $75.8 \pm 1.6$  % Luft<sup>2</sup> ( $n = 29$ ). Bei einer Stimulierung mit 10 nM 5-HT nahm die  $\text{O}_2$ -Konzentration um  $12.9 \pm 2$  %-Punkte ab ( $n = 23$ , Abb. 3.25). Dies zeigt einen deutlichen  $\text{O}_2$ -Verbrauch der Speicheldrüsen während der 5-HT-Stimulierung. Um zu testen, inwieweit die Aktivierung der V-ATPase den  $\text{O}_2$ -Verbrauch beeinflusst, wurde diese mit 1  $\mu\text{M}$  Concanamycin A blockiert. Unter diesen Bedingungen war der  $\text{O}_2$ -Verbrauch bei einer Stimulierung der Drüsen mit 10 nM 5-HT nicht signifikant beeinflusst ( $15.7 \pm 5.3$  %-Punkte,  $n = 6$ , gepaarter  $t$ -Test,  $P > 0.05$ , Abb. 3.25 B). Dies war nicht überraschend, da die Aktivierung der apikalen V-ATPase nicht der einzige ATP-verbrauchende Prozess ist. Neben der V-ATPase werden weitere ATP-verbrauchende Prozesse aktiviert. Dazu zählen die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, die SERCA-Pumpe und die Sekretion von Proteinen in das Lumen der Speicheldrüsen.

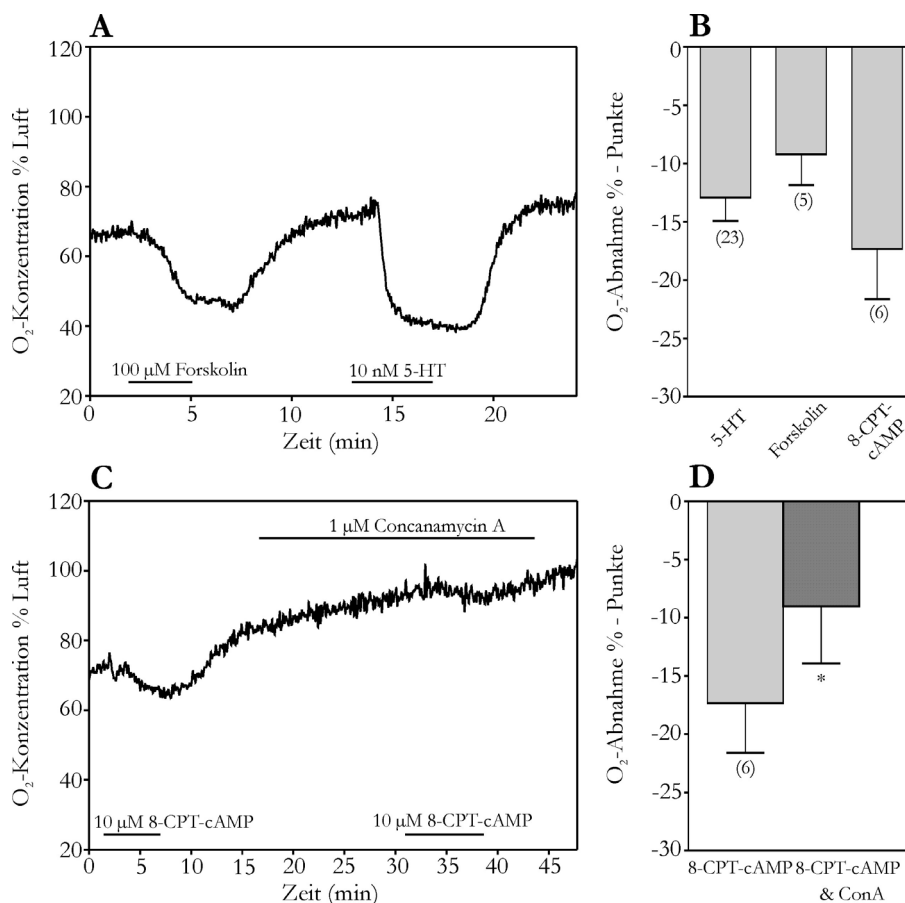
---

<sup>2</sup>Angaben zur  $\text{O}_2$ -Konzentration werden in % Luft spezifiziert: 100%  $\text{O}_2$  entspricht mit  $\text{O}_2$  gesättigtem Wasser, das sich im Gleichgewicht mit Wasserdampf-gesättigter Luft befindet. Bei 22°C und 101.3 kPa entsprechen 100%  $\text{O}_2$  einer Konzentration von 8.7 mg/l (Benson & Krause 1980).



**Abb. 3.25: 5-HT-induzierter  $O_2$ -Verbrauch in der Speicheldrüse von *Calliphora vicina***  
 (A) & (B) Stimulierung der Speicheldrüsen mit 10 nM 5-HT führte zu einer Abnahme der luminalen  $O_2$ -Konzentration. Die 5-HT-induzierte Abnahme der  $O_2$ -Konzentration war durch Concanamycin A nicht signifikant beeinflusst ( $n = 6$ , MW  $\pm$  SE, gepaarter  $t$ -Test,  $P > 0.05$ ).

Die Stimulierung der Speicheldrüsen mit 5-HT aktiviert intrazellulär zwei parallele Signalkaskaden, den cAMP-Weg und den  $IP_3/Ca^{2+}$ -Weg (Berridge 1970 & 1981). Um den Beitrag des cAMP-Weges an der 5-HT-induzierten  $O_2$ -Abnahme zu ermitteln, wurden die Drüsen mit dem Adenylatzyklase-Aktivator Forskolin überspült. Der durch 100  $\mu$ M Forskolin hervorgerufene Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration führte zu einer Abnahme der  $O_2$ -Konzentration um  $9.2 \pm 2.6$  %-Punkte ( $n = 5$ , Abb. 3.26 A & B). Inkubation der Drüsen mit dem sehr gut membrangängigen cAMP-Analogon 8-CPT-cAMP induzierte eine  $O_2$ -Abnahme um  $17.3 \pm 4.3$  %-Punkte ( $n = 6$ , Abb. 3.26 B). Die Forskolin- und 8-CPT-cAMP-induzierte Abnahme der  $O_2$ -Konzentration unterschied sich nicht signifikant von der 5-HT-induzierten  $O_2$ -Abnahme (*Ein-Wege-Anova*,  $P > 0.05$ , Abb. 3.26 B). Zu beachten ist, dass die Zugabe von 8-CPT-cAMP zwar einen 5-HT-induzierten Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration imitiert, jedoch ein Anstieg der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration ausbleibt (Schmidt 2006, Dames et al. 2006). In diesem reduzierten System wurde deshalb der Einfluss einer Hemmung der V-ATPase durch Concanamycin A erneut getestet. Unter diesen Bedingungen führte Concanamycin A dazu, dass die 8-CPT-cAMP-induzierte Abnahme der  $O_2$ -Konzentration signifikant vermindert war ( $9 \pm 4.9$  %-Punkte,  $n = 6$ , gepaarter  $t$ -Test,  $P < 0.05$ , Abb. 3.26 C & D).



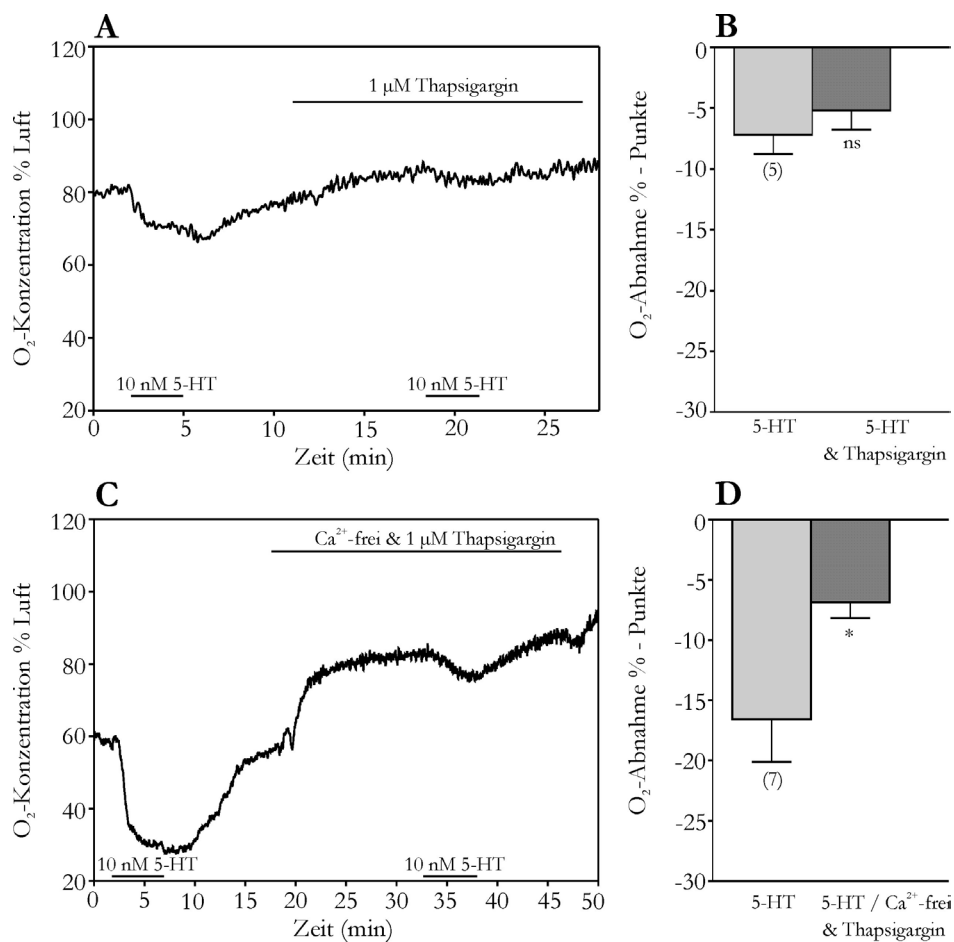
**Abb. 3.26: cAMP-induzierter O<sub>2</sub>-Verbrauch in den Speicheldrüsen von *Calliphora vicina***

(A) & (B) Inkubation der Speicheldrüsen in 100  $\mu\text{M}$  Forskolin oder 10  $\mu\text{M}$  8-CPT-cAMP führte ebenso wie 10 nM 5-HT zu einer Abnahme der O<sub>2</sub>-Konzentration (MW  $\pm$  SE). Die Anzahl der Experimente ist in Klammern angegeben. (C) & (D) Die 8-CPT-cAMP-induzierte Abnahme der O<sub>2</sub>-Konzentration wurde durch Concanamycin A signifikant vermindert (n = 6, MW  $\pm$  SE, gepaarter *t*-Test,  $P < 0.05$ ).

Diese Experimente haben gezeigt dass ein Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration ausreichend ist, um den 5-HT-induzierten O<sub>2</sub>-Verbrauch nachzuahmen. Wird selektiv der cAMP-Weg aktiviert, ist der Anteil der V-ATPase am O<sub>2</sub>-Verbrauch messbar.

Es kann trotzdem nicht ausgeschlossen werden, dass auch der 5-HT-induzierte Anstieg der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration die Abnahme der O<sub>2</sub>-Konzentration beeinflusst. Um diese Frage zu klären, wurden Experimente durchgeführt, bei denen die Ca<sup>2+</sup>-Homöostase der Zellen empfindlich gestört wurde. Thapsigargin blockiert die SERCA-Pumpe und verhindert die Wiederaufnahme von Ca<sup>2+</sup> in das ER. In der Gegenwart von 1  $\mu\text{M}$  Thapsigargin war der 5-HT-induzierte O<sub>2</sub>-Verbrauch tendenziell vermindert. Dieser Effekt war jedoch nicht statistisch signifikant (5.2  $\pm$  1.6 %-Punkte [Thapsigargin] vs. 7.2  $\pm$  1.6 %-Punkte [Kontrolle], n = 5, gepaarter *t*-Test,  $P > 0.05$ , Abb. 3.27 A & B). Wiederholte man diese Messungen in einer Ca<sup>2+</sup>-freien Badlösung, war die 5-HT-induzierte Abnahme der O<sub>2</sub>-Konzentration signifikant vermindert (6.9  $\pm$  1.3 %-Punkte [Ca<sup>2+</sup>-frei & Thapsigargin] vs. 16.6  $\pm$  3.5 %-Punkte [Kontrolle], n = 7, gepaarter *t*-Test,  $P > 0.05$ , Abb. 3.27 C & D).





**Abb. 3.27: Einfluss von Ca<sup>2+</sup> auf den 5-HT-induzierten O<sub>2</sub>-Verbrauch**

(A) & (B) Stimulierung der Speicheldrüsen mit 10 nM 5-HT in Gegenwart von 1 μM Thapsigargin hatte keinen signifikanten Einfluss auf den 5-HT-induzierten O<sub>2</sub>-Verbrauch (n = 5, MW ± SE, gepaarter *t*-Test, *P* > 0.05). (C) & (D) Unter Ca<sup>2+</sup>-freien Bedingungen in Gegenwart von 1 μM Thapsigargin war die 5-HT-induzierte O<sub>2</sub>-Abnahme signifikant vermindert (n = 7, MW ± SE, gepaarter *t*-Test, *P* < 0.05).

Die durchgeführten Experimente zeigten dass ein Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration ausreicht um den 5-HT-induzierten O<sub>2</sub>-Verbrauch zu imitieren. Für diese Abnahme der O<sub>2</sub>-Konzentration ist eine intakte Ca<sup>2+</sup>-Homöostase erforderlich. Zusammengenommen konnte gezeigt werden, dass cAMP- und IP<sub>3</sub>/Ca<sup>2+</sup>-Weg auf komplexe Weise zu 5-HT-induzierten Änderungen der O<sub>2</sub>-Konzentration und somit auch zu 5-HT-induzierten Änderungen des pH<sub>i</sub>-Wertes beitragen.

### 3.5 Molekularbiologischer Nachweis pH<sub>i</sub>-regulierender Transportmechanismen

Die bisher beschriebenen physiologischen Experimente reichen jedoch nicht aus, um alle an der pH<sub>i</sub>-Regulation beteiligten Transportproteine zweifelsfrei nachzuweisen. Deshalb sollten die postulierten Transporter erstmals auch molekularbiologisch nachgewiesen werden.

### 3.5.1 CPA-Superfamilie

$\text{Na}^+/\text{H}^+$ - &  $\text{K}^+/\text{H}^+$ -Antiporter gehören zur Superfamilie der „monovalenten Kationen-Protonen-Antiporter“ (CPA-Superfamilie). Diese Superfamilie besteht aus drei Familien, der CPA1-Familie, CPA2-Familie und NaT-DC-Familie (Chang et al. 2004, Brett et al. 2005). Der  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporter (NHE) gehört zur CPA1-Familie. Pharmakologisch konnte dessen Beteiligung an der 5-HT-induzierten Ansäuerung in den Drüsenzellen nachgewiesen werden (siehe 3.3.1). Der  $\text{K}^+/\text{H}^+$ -Antiporter (NHA) gehört zur CPA2-Familie. Dessen Existenz wird in den Speicheldrüsen von *Calliphora vicina* gefordert (Wieczorek et al. 1991, Zimmermann et al. 2003, Dames et al. 2006), sein direkter Nachweis fehlt jedoch. Nachfolgend wird der molekularbiologische Nachweis beider Transporter aufgezeigt.

#### $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporter

Mit Hilfe einer NCBI-Datenbankrecherche wurden AS-Sequenzen bereits charakterisierter NHEs von Insekten ermittelt. Degenerierte Primer wurden so gewählt, dass sie konservierte Bereiche abdeckten. Sie lagen vor allem im Bereich der Amilorid-Bindestelle und in einer hochkonservierten Region (Abb. 3.28).

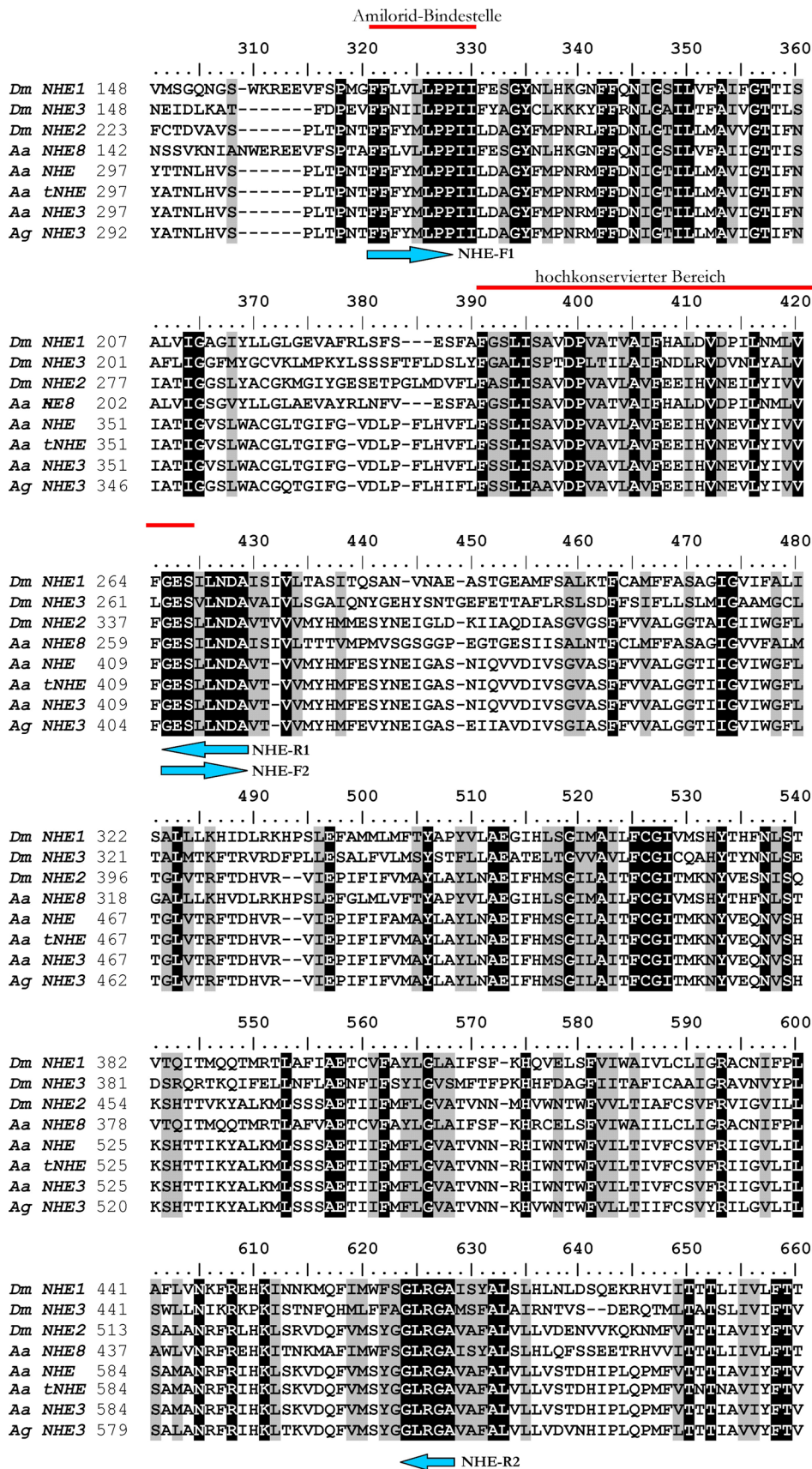
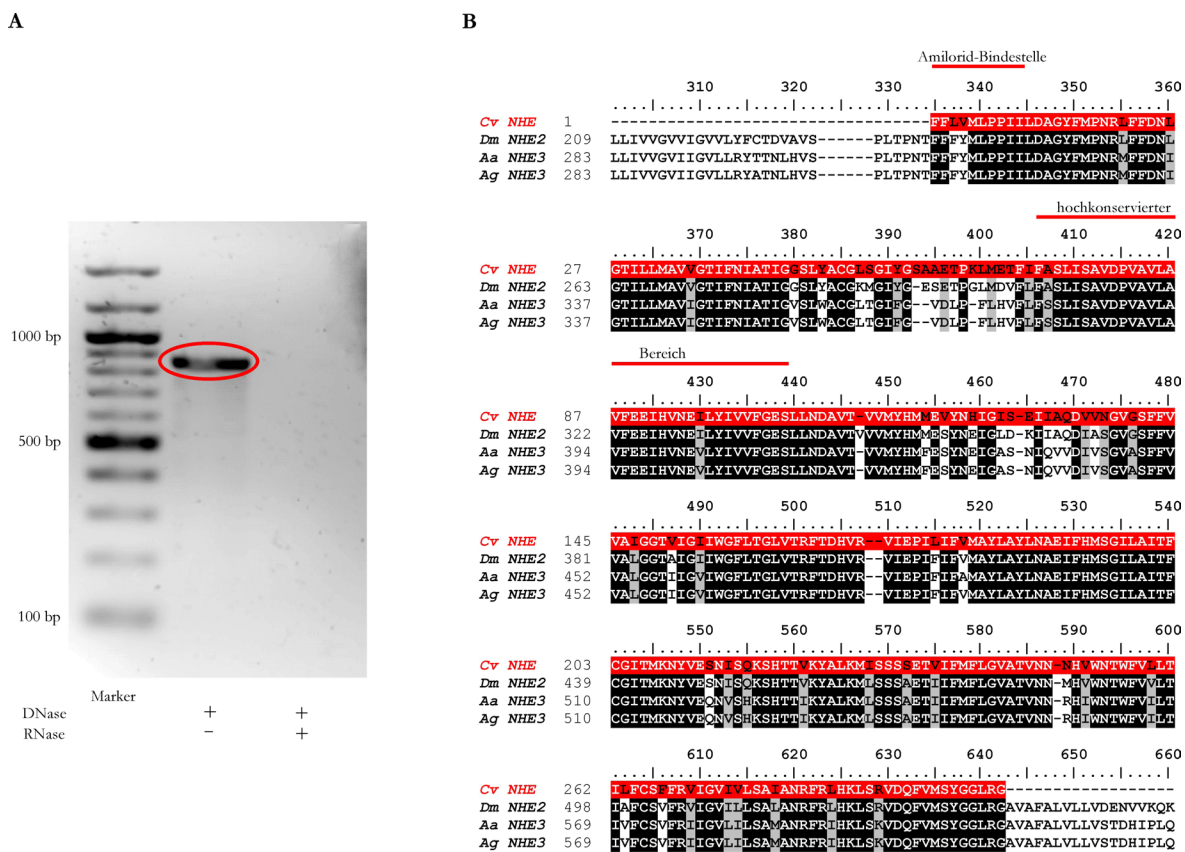


Abb. 3.28: Vergleich der Aminosäuresequenz des NHE verschiedener Insekten. Die Abbildung zeigt einen Aminosäurevergleich des Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Antiporters (NHE) von *Drosophila melanogaster* (*Dm NHE1* #AAD32689, *Dm NHE3* #AAF13709 & *Dm NHE2* #AAF60313), *Aedes aegypti* (*Aa NHE8* #AAQ91612, *Aa NHE* #AAM63432, *Aa tNHE* #AAM63431 & *Aa NHE3* #AAF80554) und *Anopheles gambiae* (*Ag NHE3* #AAO34131). Schwarze markieren identische Aminosäuren. Konservativ ausgetauschte Aminosäuren sind grau hinterlegt. Die Pfeile markieren die Position der degenerierten Primer.

Mittels PCR mit den degenerierten Primern NHE-F1 und NHE-R2 (Abb. 3.28) konnte ein Fragment amplifiziert werden, das der erwarteten Länge von 899 - 924 bp entsprach (siehe Anhang Abb. 6.3). Das Fragment wurde wie unter 2.6 beschrieben kloniert und sequenziert. Anschließend wurde die Expression des NHE durch eine RT-PCR mit spezifischen Primern nachgewiesen (Abb. 3.29 A). Eine Kontamination mit genomischer DNA kann ausgeschlossen werden, da mit eingesetzter RNA, die einer DNase / RNase-Behandlung unterzogen wurde, kein Produkt amplifiziert werden konnte. Die abgeleitete AS-Sequenz betrug 303 AS. Eine BLAST-Analyse (Abb. 3.29 B) der AS-Sequenz zeigte eine hohe Ähnlichkeit zu AS-Sequenzen von Insekten-NHEs. Es bestehen 82% Ähnlichkeit zu einer AS-Sequenz des NHE2 von *Drosophila melanogaster* (Dm NHE2) und jeweils 82% Ähnlichkeit zu AS-Sequenzen des NHE3 von *Anopheles gambiae* (Ag NHE3) und des NHE3 von *Aedes aegypti* (Aa NHE3).



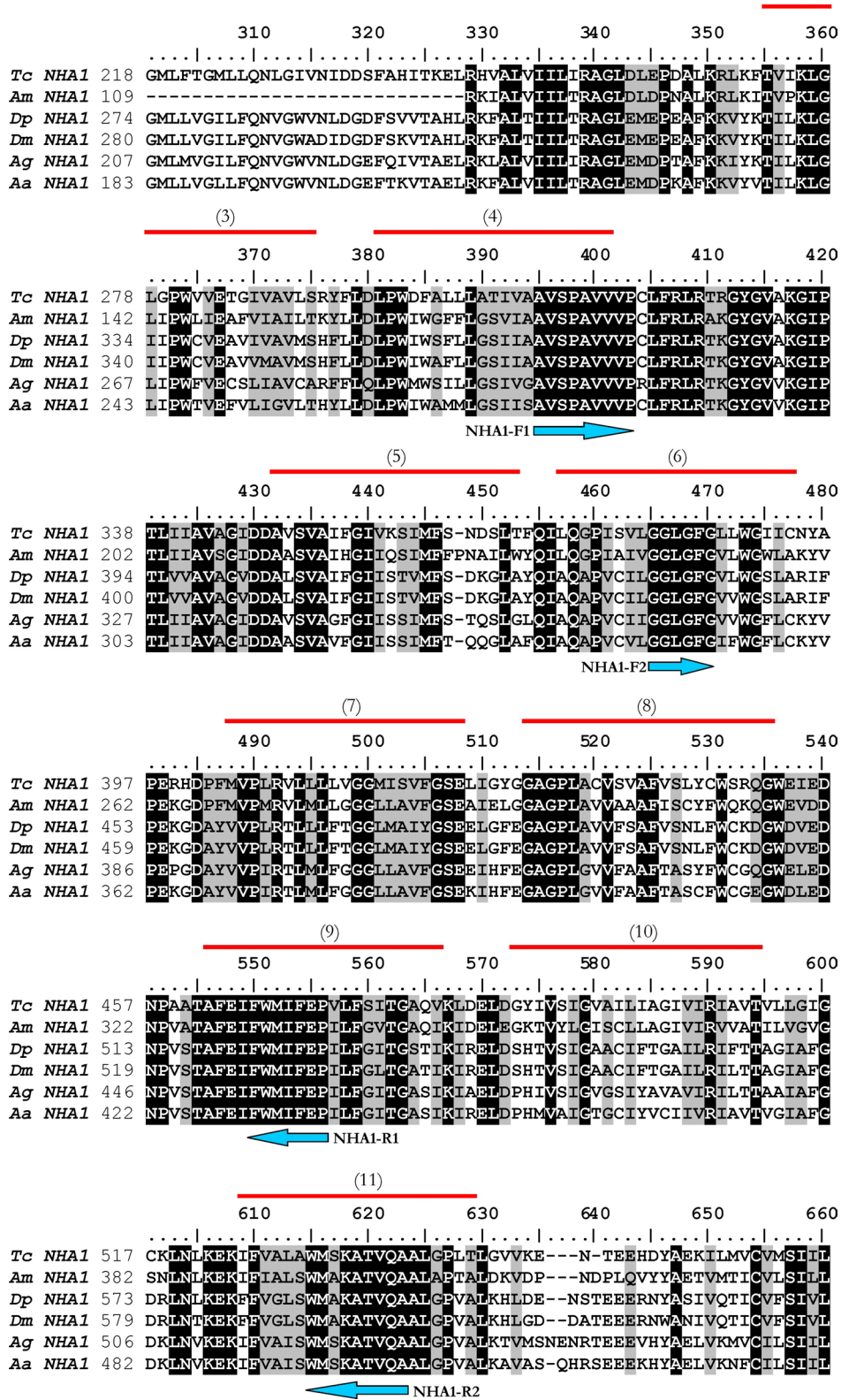
**Abb. 3.29: BLAST-Analyse der Cv NHE - Aminosäuresequenz**

(A) Zeigt die Expression des NHE in *Calliphora* Speicheldrüsen, nachgewiesen durch eine RT-PCR mit spezifischen Primern. Ausgehend von isolierter RNA aus *Calliphora* Speicheldrüsen konnte mit spezifischen Primern ein Fragment in der erwarteten Größe amplifiziert werden. Als Negativkontrolle diente RNA die vor der RT-PCR einer DNase / RNase-Behandlung unterzogen wurde. (B) Die BLAST-Analyse zeigt eine hohe Ähnlichkeit der NHE-Sequenz von *Calliphora vicina* (Cv NHE) zu NHE-AS-Sequenzen von *Drosophila melanogaster* (Dm NHE2 #AAF60313), *Aedes aegypti* (Aa NHE3 #AAF80554) und *Anopheles gambiae* (Ag NHE3 #AAO34131). Schwarze Bereiche markieren identische Aminosäuren. Konservativ ausgetauschte Aminosäuren sind grau hinterlegt.

### K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Antiporter

In den Speicheldrüsen von *Calliphora vicina* wird ein nH<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-Antiporter postuliert. Dieser ist jedoch noch nicht charakterisiert und ist pharmakologisch nicht nachweisbar. Dadurch kann sein Beitrag zur pH<sub>i</sub>-Regulation nicht bestimmt werden. Auch in anderen

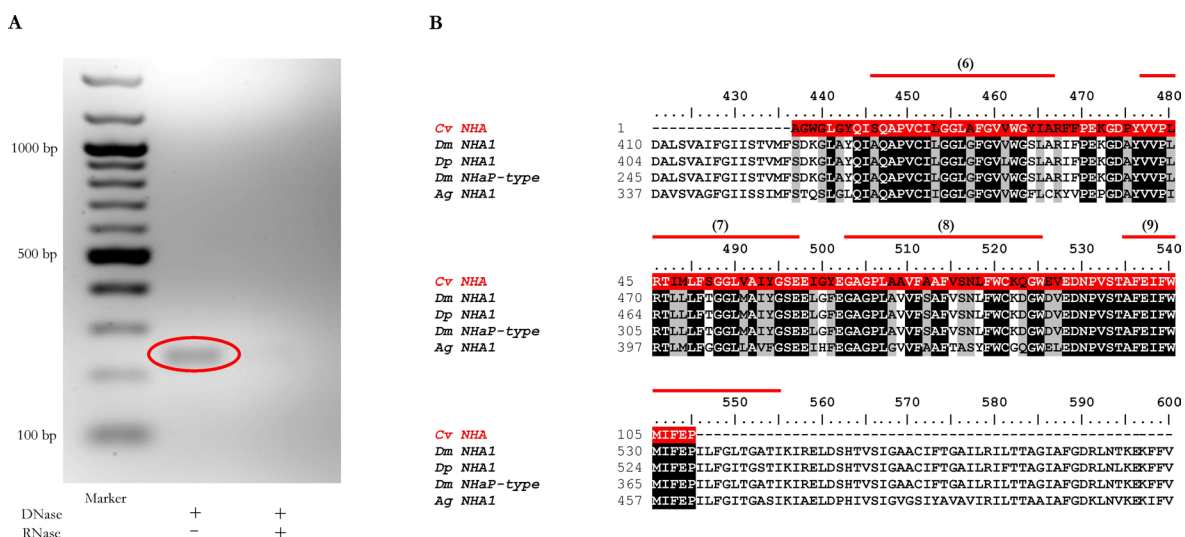
Organismen ist ein solcher  $K^+/H^+$ -Antiporter kaum untersucht. Für *Anopheles gambiae* wurde eine Sequenz eines putativen  $K^+/H^+$ -Antiporters beschrieben (Ag NHA1, Rheault et al. 2007). Verwandtschaftsanalysen anhand bereits sequenzierter Genome von *Drosophila melanogaster*, *Drosophila pseudoobscura*, *Aedes aegypti* und *Apis mellifera* zeigten dessen Existenz in weiteren Insekten. Diese Sequenzen wurden verwendet und ein Sequenzvergleich durchgeführt (Abb. 3.30). Die degenerierten Primer lagen in den prognostizierten Transmembrandomänen 4 (NHA-F1), 6 (NHA-F2), 9 (NHA-R1) und 11 (NHA-R2) (Abb. 3.30).



**Abb. 3.30: Vergleich der Aminosäuresequenz des NHA1 verschiedener Insekten**  
 Die Abbildung zeigt einen Aminosäurevergleich des NHA1 von *Anopheles gambiae* (Ag NHA1 #ABJ91581), *Aedes aegypti* (Aa NHA1 #EAT36864), *Drosophila pseudoobscura* (Dp NHA1 #EAL32825), *Drosophila melanogaster* (Dm NHA1 #NP\_723224), *Tribolium castaneum* (Tc NHA1 #XP\_974978) und *Apis mellifera* (Am NHA1 #XP\_394256). Schwarze Bereiche markieren identische Aminosäuren. Konservativ ausgetauschte Aminosäuren sind grau hinterlegt. Die roten Linien kennzeichnen die Transmembrandomänen. Die Pfeile markieren die Position der degenerierten Primer.

Mit den Primern NHA-F2 und NHA-R1 (Abb. 3.30) konnte in einer PCR ein Fragment amplifiziert werden, das der erwarteten Fragmentlänge von ca. 275 bp entspricht (siehe

Anhang Abb. 6.2). Das Fragment wurde isoliert und wie beschrieben kloniert. Die Expression des NHA wurde durch eine RT-PCR mit spezifischen Primern nachgewiesen (Abb. 3.31 A). Eine Kontamination mit genomischer DNA kann ausgeschlossen werden, da mit eingesetzter RNA, die einer DNase / RNase-Behandlung unterzogen wurde, kein Produkt amplifiziert werden konnte. Die abgeleitete AS-Sequenz beträgt 109 AS und wurde *Cv NHA* genannt. Sie umfasst die Transmembrandomänen 6-9. Eine BLAST-Analyse (Abb. 3.31 B) zeigte eine hohe Ähnlichkeit zu AS-Sequenzen weiterer NHAs von Insekten. Die AS-Sequenz von *Cv NHA* ist 82% identisch zu einer NHA-AS-Sequenz von *Drosophila melanogaster* (Dm NHA1), 81% identisch zu einer NHA-AS-Sequenz von *Drosophila pseudoobscura* (Dp NHA1), 82% identisch zu einer weiteren NHA-AS-Sequenz von *Drosophila melanogaster* (Dm NHaP-type) und 71% identisch zur NHA-AS-Sequenz von *Anopheles gambiae* (Ag NHA1).



**Abb. 3.31: BLAST-Analyse der *Cv NHA* - Aminosäuresequenz**

(A) Zeigt die Expression des NHA in *Calliphora* Speicheldrüsen, nachgewiesen durch eine RT-PCR mit spezifischen Primern. Ausgehend von isolierter RNA aus *Calliphora* Speicheldrüsen konnte mit spezifischen Primern ein Fragment in der erwarteten Größe amplifiziert werden. Als Negativkontrolle diente RNA die vor der RT-PCR einer DNase / RNase-Behandlung unterzogen wurde. (B) Die BLAST-Analyse zeigt eine hohe Ähnlichkeit der NHA-AS-Sequenz von *Calliphora vicina* (*Cv NHA*) zu NHA-AS-Sequenzen von *Drosophila melanogaster* (Dm NHA1 #NP\_723224 & Dm NHaP-type #AAL135583), *Drosophila pseudoobscura* (Dp NHA1 #EAL32825) und *Anopheles gambiae* (Ag NHA1 #ABJ91581). Schwarze Bereiche markieren identische Aminosäuren. Konservativ ausgetauschte Aminosäuren sind grau hinterlegt. Die roten Linien kennzeichnen die Transmembrandomänen.

Die ist das erste Mal, dass das Vorhandensein des putativen  $nH^+/K^+$ -Antiporters in den Speicheldrüsen von *Calliphora vicina* direkt gezeigt werden konnte.

### 3.5.2 Carboanhydrase

Die Carboanhydrase wurde in den Speicheldrüsen von *Calliphora vicina* bereits histochemisch nachgewiesen (Schewe et al. 2008). Der molekularbiologische Nachweis der Carboanhydrase sollte nicht vorhandene Sequenzinformationen liefern und einen Hinweis auf die molekulare Struktur der hier vorhandenen Carboanhydrase geben. Bereits vorliegende AS-Sequenzen zu Carboanhydrasen anderer Insekten wurden aus

der NCBI-Datenbank herausgesucht und miteinander verglichen. Die vier degenerierten Primer wurden in möglichst konservierte Bereiche hinein gelegt (Abb. 3.32).

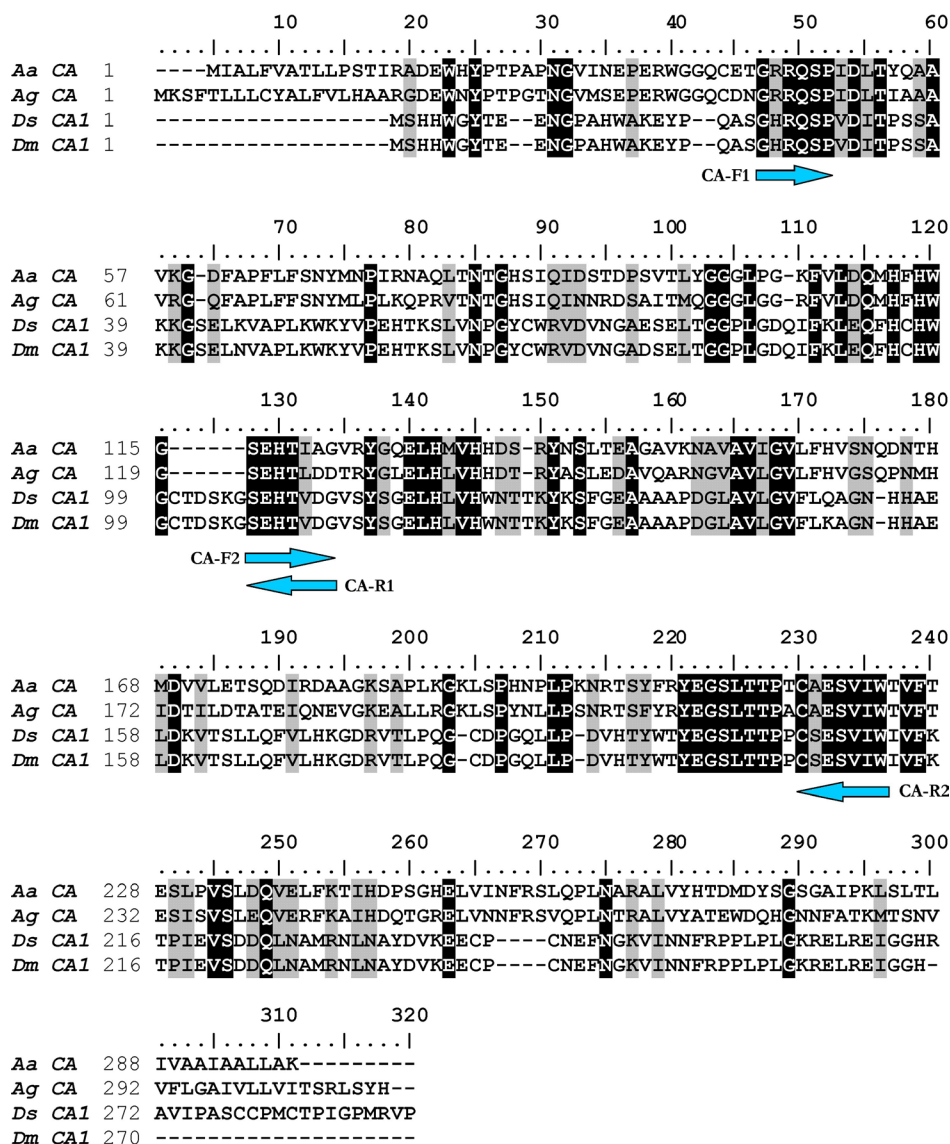


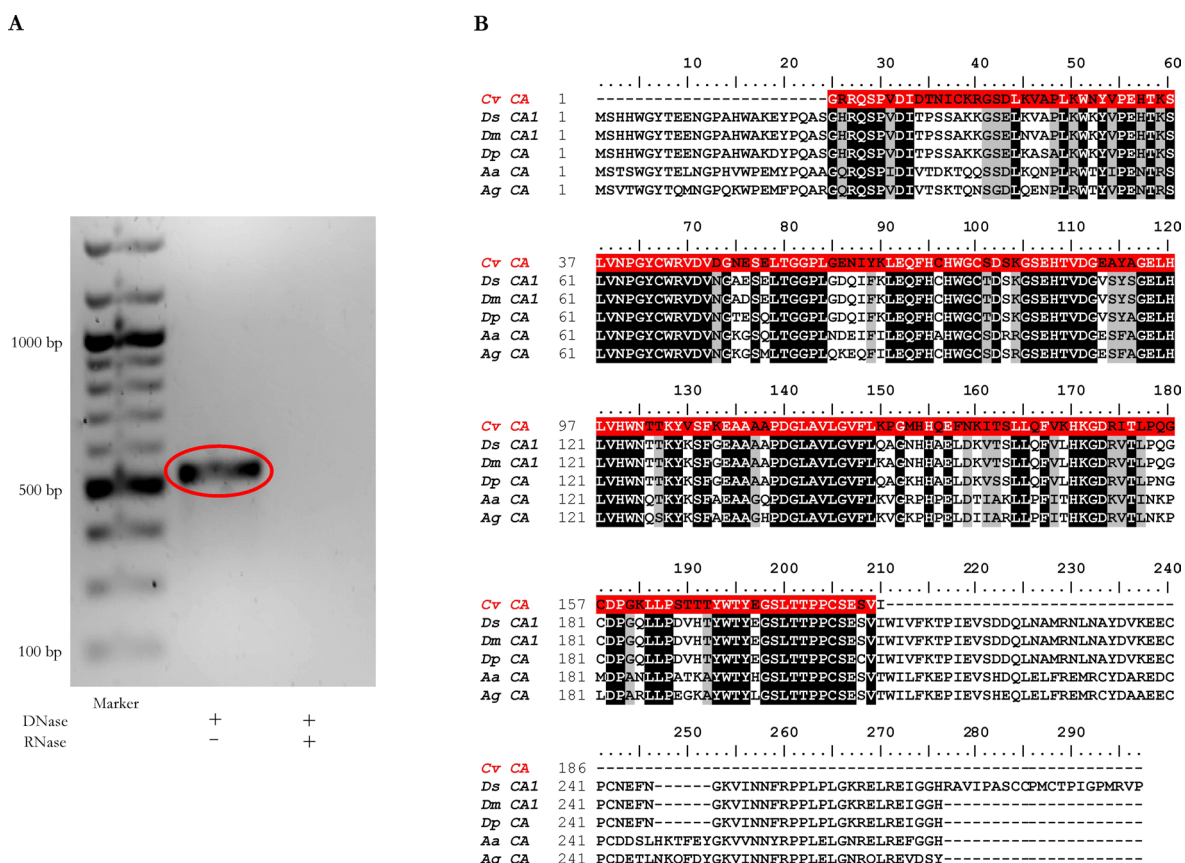
Abb. 3.32: Vergleich der Aminosäuresequenz der Carboanhydrase verschiedener Insekten

Die Abbildung zeigt einen Aminosäurevergleich der Carboanhydrase von *Aedes aegypti* (Aa CA #AAL72625), *Anopheles gambiae* (Ag CA #AAQ21365), *Drosophila simulans* (Ds CA1 #AAY56646) und *Drosophila melanogaster* (Dm CA1 #AAY56645). Schwarze Bereiche markieren identische Aminosäuren. Konservativ ausgetauschte Aminosäuren sind grau hinterlegt. Die roten Linien kennzeichnen die Transmembrandomänen. Die Pfeile markieren die Position der degenerierten Primer.

Mittels PCR mit degenerierten Primern (CA-F1 & CA-R2, Abb. 3.32) ist es gelungen, ein Fragment zu amplifizieren, das der erwarteten Länge von 533-570 bp entsprach (siehe Anhang Abb. 6.4). Nach erfolgreicher Klonierung wurde das Fragment von der Firma GATC Biotech sequenziert. Anschließend wurde die Expression der Carboanhydrase durch eine RT-PCR mit spezifischen Primern nachgewiesen (Abb. 3.33 A). Eine Kontamination mit genomischer DNA kann ausgeschlossen werden, da mit eingesetzter RNA, die einer DNase / RNase-Behandlung unterzogen wurde, kein Produkt amplifiziert werden konnte. Die abgeleitete AS-Sequenz umfasst



186 AS und wurde *Cv CA* genannt. Eine durchgeführte BLAST-Analyse zeigte eine hohe Ähnlichkeit von *Cv CA* zu AS-Sequenzen der Carboanhydrase anderer Insekten (Abb. 3.33 B). Es bestand 82% Ähnlichkeit zu AS-Sequenzen der Carboanhydrase von *Drosophila simulans* (Ds CA1) und von *Drosophila melanogaster* (Dm CA1), 79% zu einer AS-Sequenz von *Drosophila pseudoobscura* (Dp CA), 67% zu einer AS-Sequenz von *Aedes aegypti* (Aa CA) und 68% Ähnlichkeit zu einer AS-Sequenz von *Anopheles gambiae* (Ag CA). Die AS-Sequenz von *Cv CA* weist zudem eine putative konservierte Region einer  $\alpha$ -Carboanhydrase auf.



**Abb. 3.33: BLAST-Analyse der *Cv CA* - Aminosäuresequenz**

(A) Zeigt die Expression der Carboanhydrase in *Calliphora* Speicheldrüsen, nachgewiesen durch eine RT-PCR mit spezifischen Primern. Ausgehend von isolierter RNA aus *Calliphora* Speicheldrüsen konnte mit spezifischen Primern ein Fragment in der erwarteten Größe amplifiziert werden. Als Negativkontrolle diente RNA die vor der RT-PCR einer DNase / RNase-Behandlung unterzogen wurde. (B) Die BLAST-Analyse zeigt eine hohe Ähnlichkeit der AS-Sequenz der Carboanhydrase von *Calliphora vicina* (*Cv CA*) zu AS-Sequenzen der Carboanhydrase von *Drosophila simulans* (Ds CA1 #AAY56646), *Drosophila melanogaster* (Dm CA1 #AAY56645), *Drosophila pseudoobscura* (Dp CA #EAL33308), *Aedes aegypti* (Aa CA #EAT43649) und *Anopheles gambiae* (Ag CA #ABF66618). Schwarze Bereiche markieren identische Aminosäuren. Konservativ ausgetauschte Aminosäuren sind grau hinterlegt.

### 3.5.3 C-Untereinheit der V-H<sup>+</sup>-ATPase

Das Vorhandensein der V-ATPase in den Speicheldrüsen von *Calliphora vicina* ist u.a. durch immunohistologische Experimente bereits nachgewiesen worden (Zimmermann et al. 2003). Auch die Rolle der V-ATPase bei 5-HT-Stimulierung und der pH<sub>i</sub>-Regulation konnte aufgeklärt werden. Sequenzinformationen für die V-ATPase von *Calliphora vicina* liegen jedoch noch nicht vor. Um diese Lücke zu schließen, wurden

AS-Sequenzen der Untereinheit (UE) C der V-ATPase verschiedener Insekten ermittelt und miteinander verglichen. Die AS-Sequenz ist in den ausgewählten Insekten sehr gut konserviert (Abb. 3.35). Es wurden vier degenerierte Primer erstellt, die in besonders gut konservierten Regionen lagen (Abb. 3.35).

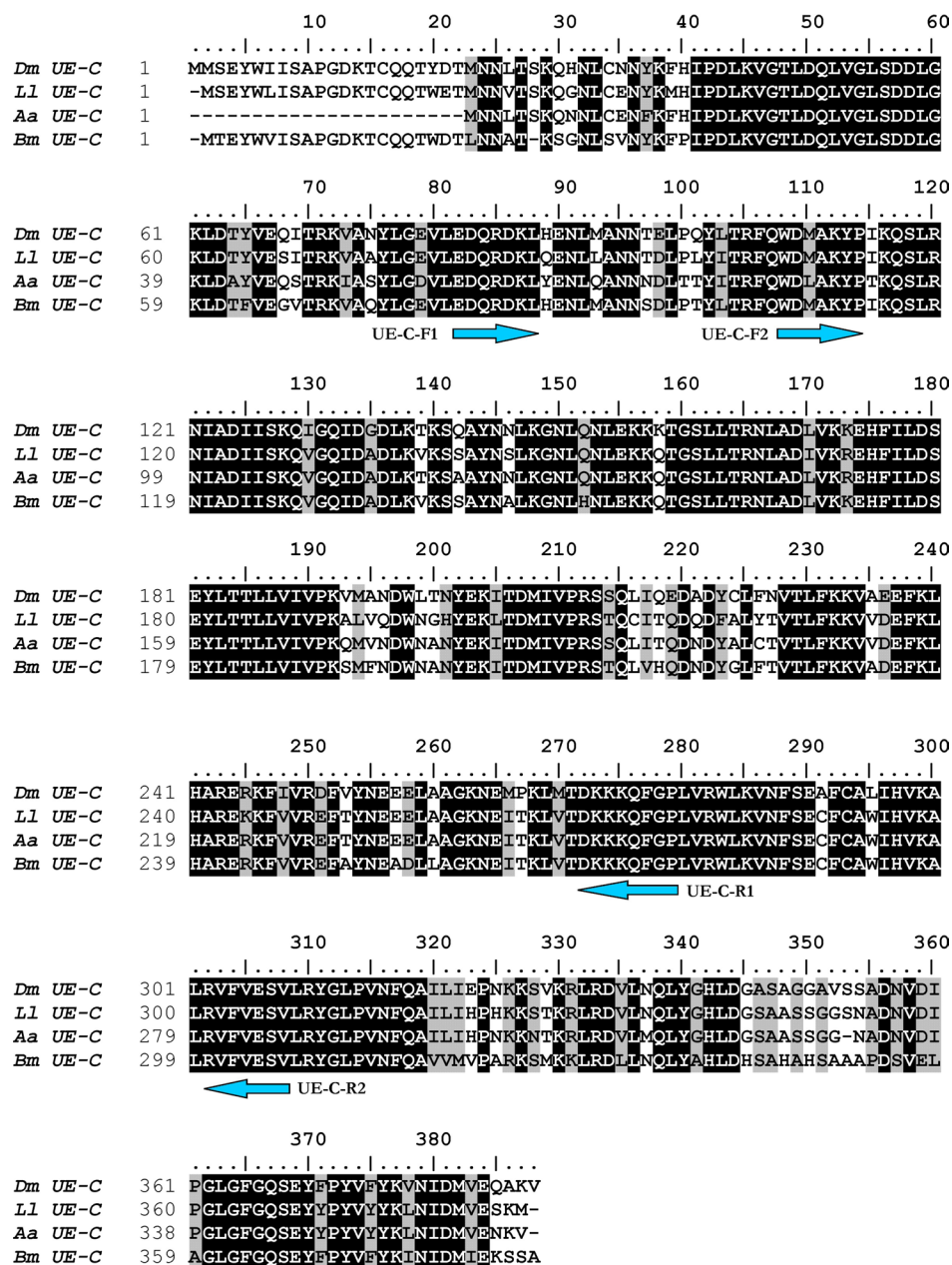
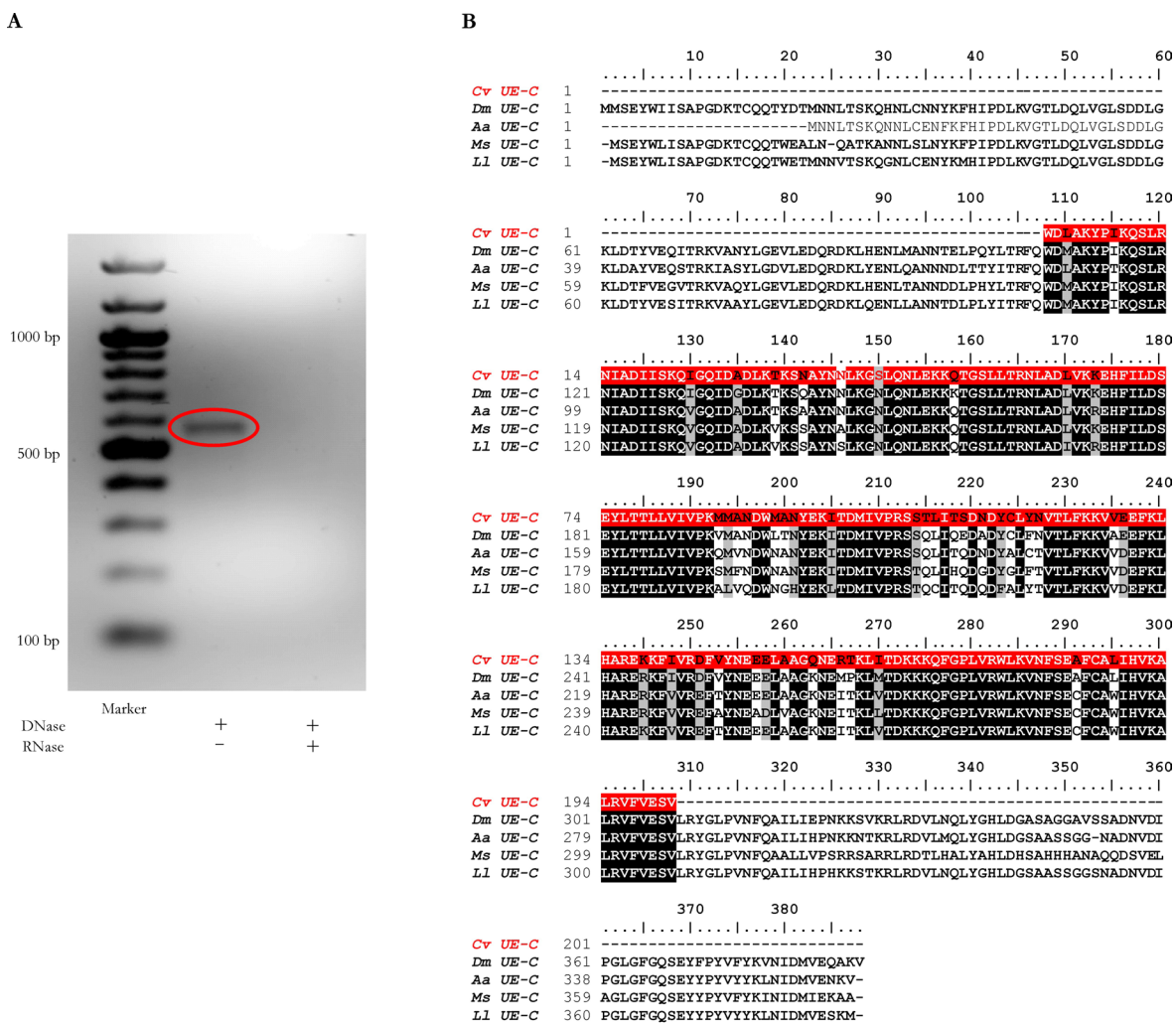


Abb. 3.34: Vergleich der Aminosäuresequenz der UE-C der V-ATPase verschiedener Insekten

Die Abbildung zeigt einen Aminosäurevergleich der UE-C der V-ATPase von *Drosophila melanogaster* (Dm UE-C #AAB62571), *Lutzomyia longipalpis* (Ll UE-C #ABO61291), *Aedes aegypti* (Aa UE-C #ABF18462), und *Bombyx mori* (Bm UE-C #NP\_001040138). Schwarze Bereiche markieren identische Aminosäuren. Konservativ ausgetauschte Aminosäuren sind grau hinterlegt. Die roten Linien kennzeichnen die Transmembrandomänen. Die Pfeile markieren die Position der degenerierten Primer.

Unter Verwendung der degenerierten Primer konnten mittels einer PCR zwei Fragmente in der erwarteten Größe von 515 bp (UE-C-F2 und UE-C-R1, Abb. 3.34) und 602 bp (UE-C-F2 und UE-C-R2, Abb. 3.34) amplifiziert werden (siehe Anhang Abb. 6.5). Die Fragmente wurden erfolgreich kloniert und sequenziert. Die Expression der UE-C

der V-ATPase wurde durch eine RT-PCR mit spezifischen Primern nachgewiesen (Abb. 3.35 A). Eine Kontamination mit genomischer DNA kann ausgeschlossen werden, da mit eingesetzter RNA, die einer DNase / RNase-Behandlung unterzogen wurde, kein Produkt amplifiziert werden konnte. Die abgeleitete AS-Sequenz betrug 172 AS bzw. 201 AS. Im Folgenden wird lediglich die längere Sequenz betrachtet und *Cv UE-C* genannt. Eine BLAST-Analyse (Abb. 3.35 B) ergab eine Ähnlichkeit der AS-Sequenz von *Cv UE-C* von 90% zu einer AS-Sequenz der UE-C von *Drosophila melanogaster* (Dm UE-C). Des Weiteren ist die AS-Sequenz von *Cv UE-C* 88% identisch zu einer AS-Sequenz von *Aedes aegypti* (Aa UE-C), 85% identisch zu einer AS-Sequenz von *Manduca sexta* (Ms UE-C) und 83% identisch zu einer AS-Sequenz der UE-C von *Lutzomyia longipalpis* (Ll UE-C).



**Abb. 3.35: BLAST-Analyse der *Cv UE-C* - Aminosäuresequenz**  
 (A) Zeigt die Expression der UE-C der V-ATPase in *Calliphora* Speicheldrüsen, nachgewiesen durch eine RT-PCR mit spezifischen Primern. Ausgehend von isolierter RNA aus *Calliphora* Speicheldrüsen konnte mit spezifischen Primern ein Fragment in der erwarteten Größe amplifiziert werden. Als Negativkontrolle diente RNA die vor der RT-PCR einer DNase / RNase-Behandlung unterzogen wurde. (B) Die BLAST-Analyse zeigt eine hohe Ähnlichkeit der AS-Sequenz der Untereinheit C der V-ATPase von *Calliphora vicina* (*Cv UE-C*) zu AS-Sequenzen der Untereinheit C der V-ATPase von *Drosophila melanogaster* (Dm UE-C #AAB62571), *Aedes aegypti* (Aa UE-C #ABF18462), *Manduca sexta* (Ms UE-C #Q9U5N1) und *Lutzomyia longipalpis* (Ll UE-C #ABO61291). Schwarze Bereiche markieren identische Aminosäuren. Konservativ ausgetauschte Aminosäuren sind grau hinterlegt.

## 4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollten die Mechanismen der  $\text{pH}_i$ -Regulation in den Zellen der Speicheldrüse von *Calliphora vicina* untersucht werden. Dieses Präparat ermöglicht Untersuchungen unter organotypischen Bedingungen, denn es handelt sich um ein intaktes Miniorgan, das einfach zu präparieren und für optophysio-logische Messmethoden gut zugänglich ist. Zudem sind die grundlegenden Mechanismen der Speichelsekretion bereits bekannt, so dass diese experimentell gezielt beeinflusst werden können. Vorhergehende Arbeiten zeigten bereits ein Paradoxon in diesen Speicheldrüsen. Bei einer Stimulierung mit 5-HT kommt es trotz eines auswärts gerichteten  $\text{H}^+$ -Transportes durch die V-ATPase (Rein et al. 2006 & 2008) zu einer intrazellulären Ansäuerung. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Carboanhydrase dabei eine entscheidende Rolle spielt (Schewe 2005, Schewe et al. 2008). Die Transportsysteme die an der 5-HT-induzierten intrazellulären Ansäuerung beteiligt sind waren hingegen noch völlig unbekannt. In der vorliegenden Arbeit wurden diese Transportsysteme identifiziert. An der Regulation des  $\text{pH}_i$ -Wertes in der unstimulierten Drüse beteiligte Transportsysteme waren ebenfalls unbekannt. Diese Lücke wurde durch die Anwendung der  $\text{NH}_4\text{Cl}$ - und Na-acetat-Vorpuls-Methode in Kombination mit pharmakologischen Experimenten geschlossen. Zudem wurden erstmals  $\text{pH}_i$ -regulierende Transporter in den Speicheldrüsen von *Calliphora vicina* auch molekularbiologisch nachgewiesen. In der Diskussion wurde dieselbe Reihenfolge gewählt, in der auch die Ergebnisse präsentiert wurden. Zunächst werden die pharmakologischen Wirkungen verschiedener Inhibitoren für Transporter beschrieben und diskutiert, die als *acid extruder* oder *acid loader* wirken, sowie die Wirkungen gezielter Ionensubstitutionen, um einen ersten Überblick über Transporter zu erhalten, die an der Regulation des Ruhe- $\text{pH}_i$  in der unstimulierten Drüse beteiligt sein könnten.

### 4.1 Intrazellulärer $\text{pH}$ -Wert in der unstimulierten Speicheldrüse von *Calliphora vicina*

#### 4.1.1 Aufrechterhaltung des Ruhe- $\text{pH}_i$

Der  $\text{pH}_i$ -Wert in den unstimulierten Speicheldrüsen von *Calliphora vicina* beträgt  $7.53 \pm 0.34$ . Zudem besitzen diese Zellen eine hohe intrinsische Pufferkapazität von  $123.5 \pm 80.4$  mM und eine bicarbonatabhängige Pufferkapazität von  $52.2 \pm 26.8$  mM (Schewe 2005, Schewe et al. 2008). Der  $\text{pH}_i$ -Wert ist alkalischer, als bei einer passiven Verteilung der  $\text{H}^+$ -Ionen aufgrund des Ruhemembranpotentials zu erwarten wäre. Anhand der Nernst-Gleichung lässt sich berechnen, dass der  $\text{pH}_i$ , bei einem Ruhemembranpotential von -60 mV und passiver  $\text{H}^+$ -Verteilung, bei 6.2 liegen müsste. Dieser  $\text{pH}_i$ -Wert ist für die Zellen zu sauer und toxisch. Der tatsächliche  $\text{pH}_i$ -Wert liegt ca. 1 pH-Einheit darüber. Aufgrund des Membranpotentials (*Calliphora* Speicheldrüsen

$V_m$  ca. 47 mV, eigene Messungen, Daten nicht gezeigt und Prince & Berridge 1972, House & Gingsborg 1985) besteht ein stark einwärts gerichteter elektrochemischer Gradient für  $H^+$ . Die elektrochemische Triebkraft (DF) für  $H^+$  lässt sich wie folgt berechnen.

$$DF = 58 \text{ mV} * \log \frac{[H^+]_o}{[H^+]_i} - V_m * 3$$

$$DF = 58 \text{ mV} * \log \frac{10^{-7.2}}{10^{-7.5}} - (-47 \text{ mV}) = 64.4 \text{ mV}$$

Ein Wert größer Null zeigt an, dass für Kationen ein Influx begünstigt ist, während gleichzeitig der Efflux von Basenäquivalenten wie  $HCO_3^-$  begünstigt ist. Deshalb muss die Zelle in der Lage sein, einer schleichenden Ansäuerung entgegenzuwirken, die durch die starke einwärts gerichtete elektrochemische Triebkraft für  $H^+$  entsteht und man muss alkalisierende  $pH_i$ -regulierende Mechanismen fordern. Dazu zählt die intrazelluläre Pufferkapazität und  $pH_i$ -regulierende Transportsysteme. Beeinflusst man diese Systeme gezielt durch den Einsatz von spezifischen Hemmstoffen und / oder Ionensubstitutionen, kann deren Einfluss auf die  $pH_i$ -Regulation untersucht werden. Die Auswirkungen der Hemmstoffe und Ionensubstitutionen auf den Ruhe- $pH_i$ -Wert gaben erste Hinweise auf  $pH_i$ -Regulationsmechanismen in der unstimulierten Drüse.

Zu alkalisierenden  $pH_i$ -regulierenden Transportern zählen der NHE, der einwärts gerichtete NBC ( $Na^+ : HCO_3^-$ -Stöchiometrie 1:2), der NDCBE und die V-ATPase (Abb. 1.1 A). Bis auf die V-ATPase sind diese Transporter  $Na^+$ -abhängig. Sie nutzen die Energie des einwärts gerichteten elektrochemischen  $Na^+$ -Gradienten über der Plasmamembran um  $H^+$  aus der Zelle heraus (NHE) oder  $HCO_3^-$  in die Zelle hinein (einwärts gerichteter NBC, NDCBE) zu transportieren. Entfernt man extrazelluläres  $Na^+$ , können diese Systeme nicht mehr arbeiten und man würde eine intrazelluläre Ansäuerung erwarten. Dieser Effekt trat in den Speicheldrüsen von *Calliphora vicina* jedoch nicht ein. Stattdessen induzierte die Wegnahme von extrazellulärem  $Na^+$  eine intrazelluläre Alkalisierung. Es konnte nachgewiesen werden, dass dafür ein  $Na^+$ -abhängiger Glutamat-Transporter (EAAT) verantwortlich ist. Dieser nutzt den einwärts gerichteten elektrochemischen  $Na^+$ -Gradienten, um Glutamat in die Zelle hinein zu transportieren. Entfernte man Glutamat aus der Badlösung, konnte ebenfalls eine intrazelluläre Alkalisierung beobachtet werden.  $Na^+$ -abhängige Glutamat-Transporter gehören der Transporterfamilie *SLC1* an. Sie spielen eine zentrale Rolle im Nervensystem (Storck et al. 1992, Gegelashvili et al. 2006), werden aber auch in peripheren Geweben exprimiert (Kanai & Hediger 2004, Berger & Hediger 2006). Im zentralen Nervensystem dienen sie der Wiederaufnahme

---

<sup>3</sup> $pH_o = 7.2$  (pH der Ringerlösung),  $[H^+]_o = 10^{-7.2}$ ,  $pH_i = 7.5$ ,  $[H^+]_i = 10^{-7.5}$ ,  $V_m = -47$  mV (eigene Messungen, Daten nicht gezeigt und Prince & Berridge 1972)

von Glutamat in Synapsen. Dadurch schützen sie Nervenzellen vor toxischen Glutamat-Konzentrationen (Castagna et al. 1997, Kanai 1997, Robinson 1998). Der Transportmechanismus wurde durch Expression von EAAT in *Xenopus* Oocyten aufgeklärt.  $\text{pH}_i$ -Messungen mittels BCECF, kombiniert mit elektrophysiologischen Messungen zeigten, dass EAAT mit jedem Glutamat-Ion 3  $\text{Na}^+$  und 1  $\text{H}^+$ , in die Zelle hinein transportiert. Parallel wird ein  $\text{K}^+$  aus der Zelle heraus transportiert (Zerangue & Kavanaugh 1996). Erste Klonierungen dieses Transporters erfolgten für EAAT's aus dem Gehirn der Ratte (Storck et al. 1992, Pines et al. 1992) und dem Dünndarm von Kaninchen (Kanai & Hediger 1992).  $\text{Na}^+$ -abhängige Glutamat-Transporter finden sich auch in Gliazellen von *Hirudo medicinalis*. Hier verursacht die Applikation von Glutamat eine intrazelluläre Ansäuerung (Deitmer & Schneider 1997). Das Entfernen von Glutamat induziert demzufolge eine Alkalisierung, wie sie auch in den *Calliphora* Speicheldrüsen zu beobachten ist. Bei Insekten finden sich ebenfalls zahlreiche Beispiele für das Vorhandensein dieses Transporters. EAAT wurde bereits nachgewiesen im Käfer *Tenebrio molitor* (McLean & Caveney 1993), in *Trichoplusia ni* (Donly et al. 1997), in *Diptoptera punctata* (Donly et al. 2000) in *Drosophila melanogaster* (Besson et al. 1999, Kawano et al. 1999), in *Apis mellifera* (Kucharski et al. 2000), in *Gryllus bimaculatus* (Kosakai & Yoshino 2001) und auch in *Aedes aegypti* (Umesh et al. 2003). In einigen dieser Insekten wurde EAAT auch molekularbiologisch charakterisiert. Da das Genom der Schmeißfliege *Calliphora vicina* noch nicht sequenziert ist, wurden aus den bekannten EAAT-AS-Sequenzen von Insekten degenerierte Primer abgeleitet. Mittels PCR auf einer cDNA-Bibliothek der *Calliphora* Speicheldrüse konnte so ein EAAT-Fragment (*Cv EAAT*) amplifiziert werden. Die abgeleitete AS-Sequenz umfasst 77 AS und zeigt hohe Ähnlichkeiten zu EAAT-AS-Sequenzen anderer Insekten. Damit konnte das Vorhandensein eines  $\text{Na}^+$ -abhängigen Glutamat-Transporters sowohl mittels  $\text{pH}_i$ -Messungen, als auch molekularbiologisch nachgewiesen werden. Zur physiologischen Charakterisierung wurde eine Dosis-Wirkungskurve für den Effekt von ansteigenden extrazellulären Glutamat-Konzentrationen auf den  $\text{pH}_i$ -Wert erstellt. Der dabei festgestellte  $\text{EC}_{50}$ -Wert von 169  $\mu\text{M}$  Glutamat liegt nahe am  $\text{EC}_{50}$ -Wert ( $184.9 \pm 12.4 \mu\text{M}$  Glutamat), der auch für EAAT2 von *Drosophila melanogaster* (dEAAT2) ermittelt wurden (Besson et al. 2000). Für eine umfassende Charakterisierung wäre es aber nötig, den Transporter in voller Länge zu klonieren und anschließend in ein geeignetes Expressionssystem, z.B. *Xenopus* Oocyten, einzubringen. Dabei könnten die physiologischen Eigenschaften dann noch genauer untersucht werden. Zudem wäre eine systematische Selektion von geeigneten Hemmstoffen möglich. Mittlerweile wurden verschiedene Inhibitoren entwickelt und getestet. Deren Anzahl ist sehr umfangreich und wurde zudem an Vertebraten ermittelt (Shigeri et al. 2004, Bridges & Esslinger 2005). Da der genaue Subtyp von *Cv EAAT* noch nicht bekannt ist, hätte ein Einsatz dieser Hemmstoffe keinen Sinn gemacht.

In Arthropoden spielt Glutamat, neben seiner Funktion als Neurotransmitter, eine wichtige Rolle für die Proteinbiosynthese, die Chitinbildung und den Energiestoffwechsel (McLean & Caveny 1993). Durch die Identifizierung eines EAAT in den *Calliphora* Speicheldrüsen wird nun auch eine schon über 30 Jahre zurückliegende Beobachtung von Berridge erklärbar. Er beobachtete, dass in Abwesenheit von Glutamat nur eine sehr geringe Speichelsekretion stattfindet (Berridge 1970). Er postulierte, dass die Zellen Glutamat aufnehmen und dann im Citratzyklus verstoffwechseln (Berridge 1970, Rapp & Berridge 1981). Diese Annahme konnte jetzt mit dem Nachweis des Na<sup>+</sup>-abhängigen Glutamat-Transporters bestätigt werden. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass dieser Na<sup>+</sup>-abhängige Glutamat-Transporter nicht zu den pH<sub>i</sub>-regulierenden Transportern zählt, seine Aktivität dennoch entscheidenden Einfluss auf den Ruhe-pH<sub>i</sub> hat.

Weitere pH<sub>i</sub>-regulierende Transporter wurden anschließend durch den gezielten Einsatz von spezifischen Hemmstoffen untersucht. Ein ubiquitär vorkommender pH<sub>i</sub>-regulierender Transporter ist der NHE. Die Aktivität des NHE wurde 1976 das erste Mal von Murer et al. beschrieben. Der NHE kommt in den meisten bisher untersuchten Zelltypen vor und erfüllt eine zentrale Rolle bei der Aufrechterhaltung des pH<sub>i</sub> (*housekeeping function*) (Bianchini & Poussegur 1994, Orłowski & Grinstein 1997 & 2004). Auch in Insekten wurde der NHE bereits nachgewiesen (Pullikuth et al. 2003). Molekularbiologische Analysen wurden an *Drosophila melanogaster* (Giannakou & Dow 2001) und *Aedes aegypti* (Hart et al. 2002, Pullikuth et al. 2006) durchgeführt. Eine Blockierung des NHE kann durch den Einsatz des spezifischen Hemmstoffes EIPA erreicht werden (Vigne et al. 1983). Die Blockierung des NHE führt in vielen Zellen zu einer intrazellulären Ansäuerung, da der NHE dort einen großen Beitrag zur Aufrechterhaltung des Ruhe-pH<sub>i</sub> leistet. So wird der pH<sub>i</sub> in Malpighischen Gefäßen von *Aedes aegypti* durch EIPA um 0.4 - 0.5 pH-Einheiten angesäuert (Petzel et al. 2000). Im Ausführgang der Schweißdrüsen des Menschen führt die Applikation von EIPA zu einer Ansäuerung von 0.3 pH-Einheiten (Granger et al. 2003). In Hepatocyten der Forelle *Oncorhynchus mykiss* verursacht die Verwendung des Hemmstoffes Cariporid (Blocker für NHE1) ebenfalls eine intrazelluläre Ansäuerung von 0.3 pH-Einheiten (Ahmed et al. 2006). Eine EIPA-induzierte Ansäuerung trat in den Speicheldrüsen von *Calliphora vicina* jedoch nicht auf. Daraus kann abgeleitet werden, dass der NHE hier für die Aufrechterhaltung des Ruhe-pH<sub>i</sub> offenbar keine messbare Rolle spielt. Das Vorhandensein des NHE ist damit aber nicht ausgeschlossen (siehe 4.2).

Die V-ATPase ist ebenfalls ein pH<sub>i</sub>-regulierendes Transportsystem. Auch sie kommt in nahezu allen eukaryotischen Zellen in der Membran saurer Organellen vor (Beyenbach & Wiczorek 2006). In Insekten ist sie aber u.a. auch entscheidend für

den Aufbau eines elektrochemischen  $H^+$ -Gradienten über der Plasmamembran. Die Energie dieses Gradienten wird zum Transport von Kationen, bspw. in das Lumen der Malpighischen Gefäße oder in das Speicheldrüsenlumen genutzt (Wieczorek et al. 1999, Beyenbach & Wieczorek 2006). In den *Calliphora* Speicheldrüsen wurde die Bedeutung der V-ATPase für die Speichelsekretion bereits gezeigt (Zimmermann et al. 2003, Dames et al. 2006, Rein et al. 2006). Die V-ATPase transportiert, unter ATP-Verbrauch,  $H^+$  über die apikale Membran in das Lumen der Speicheldrüse, und erzeugt so einen einwärts gerichteten elektrochemischen Gradienten für  $H^+$ . Dieser Gradient wird von einem putativen  $nH^+/K^+$ -Antiporter genutzt, um  $K^+$  in das Lumen der Speicheldrüse zu transportieren (Wieczorek et al. 1991, Zimmermann et al. 2003, Dames et al. 2006, Rein et al. 2008). Unklar war hingegen, ob die apikale V-ATPase als *acid extruder* an der  $pH_i$ -Regulation in der unstimulierten Speicheldrüse von *Calliphora vicina* beteiligt ist. Concanamycin A ist ein spezifischer Hemmstoff der V-ATPase (Dröse & Altendorf 1997, Huss et al. 2002). Eine Blockierung der V-ATPase mit Concanamycin A sollte zu einer intrazellulären Ansäuerung führen. Beispiele hierfür finden sich in Malpighischen Gefäßen und im Mitteldarm von *Drosophila*-Larven (Wessing et al. 1993, Shanbhag & Tripathi 2005) oder im Ausführgang der Schweißdrüsen des Menschen (Granger et al. 2002). Die postulierte Concanamycin A-verursachte Ansäuerung trat in den *Calliphora* Speicheldrüsen ebenfalls auf. Damit konnte gezeigt werden, dass die V-ATPase auch an der  $pH_i$ -Regulation in der unstimulierten Drüse beteiligt ist. Das Vorhandensein der V-ATPase, wurde auf zellulärer Ebene durch immunocytochemische Experimente nachgewiesen (Zimmermann et al. 2003). Zudem wurde gezeigt, dass die Untereinheit C (UE-C) der V-ATPase in den Speicheldrüsenzellen infolge einer 5-HT-Stimulierung durch die PKA reversibel phosphoryliert wird (Voss et al. 2007). Sequenzinformationen über die UE-C der V-ATPase in *Calliphora vicina* fehlten bis jetzt jedoch völlig. Diese Lücke wurde in der vorliegenden Arbeit geschlossen. Es gelang ein ca. 600 bp langes Fragment der Untereinheit C (UE-C) zu amplifizieren (*Cv UE-C*). Die AS-Sequenz der UE-C ist bei Insekten gut konserviert. Die AS-Sequenz der UE-C von *Calliphora vicina* zeigt große Ähnlichkeit zu AS-Sequenzen der UE-C in anderen Insekten (siehe Abb. 3.35). Die gewonnenen Sequenzinformationen können als Grundlage für weiterführende Experimente dienen. Zunächst ist eine vollständige Klonierung der UE-C notwendig. Ausgehend davon, können dann anhand der AS-Sequenz die genauen Phosphorylierungsstellen der PKA an der UE-C bestimmt werden.

Eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung des Ruhe- $pH_i$  spielen Transporter die  $HCO_3^-$  transportieren. Sie gehören der Transporterfamilie *SLC4* an (Romero et al. 2004, Pushkin & Kurtz 2006). Ein entscheidendes Charakteristikum dieser Transporter ist, das die meisten, aber nicht alle, durch DIDS blockierbar sind (Boron 2001, Romero et al. 2004). Alkalisierende Mechanismen dieser



Transporterfamilie sind der einwärts gerichtete NBC und der NDCBE (Abb. 1.1 A). Sie transportieren  $\text{Na}^+$ -abhängig  $\text{HCO}_3^-$  von außen in die Zelle hinein ( $\text{HCO}_3^-$  *influx*). Eine Beteiligung dieser Transporter würde bei einer Blockierung mit DIDS eine intrazelluläre Ansäuerung verursachen. Dieser Effekt war in den Zellen der *Calliphora* Speicheldrüse zu beobachten. Dennoch überraschte dieser Befund, da alle Experimente in  $\text{HCO}_3^-$ -freien, TRIS-gepufferten Ringerlösungen durchgeführt wurden. Doch auch nominell  $\text{HCO}_3^-$ -freie Lösungen enthalten etwas  $\text{HCO}_3^-$ . Die Säurekonstante ( $\text{pK}_s$ ) der Kohlensäure liegt bei 6.1 (bei 22°C). In einem geschlossenen Raum kann zudem ein  $\text{CO}_2$ -Gehalt von 0.05% angenommen werden, was einer Konzentration von 13.3  $\mu\text{M}$   $\text{CO}_2$  entspricht. Dieser  $\text{CO}_2$ -Gehalt kommt bspw. durch Atmungsprozesse anwesender Personen zustande. Anhand der Henderson-Hasselbach-Gleichung lässt sich berechnen, dass dies in Elektrolytlösungen zu einer  $\text{HCO}_3^-$ -Konzentration von 167  $\mu\text{M}$  führt, was für die Aktivität eines hochaffinen NBC oder NDCBE ausreichend ist (Deitmer & Schneider 1998).

$$[\text{HCO}_3^-] = 10^{\text{pH} - \text{pK}_s} * [\text{CO}_2]$$

$$[\text{HCO}_3^-] = 10^{7.2 - 6.1} * 13.3 \mu\text{M} [\text{CO}_2] = 167 \mu\text{M}$$

Hinzukommt, dass auch die Zellatmung  $\text{CO}_2$  produziert, was zur Bildung von  $\text{HCO}_3^-$  genutzt werden kann. Zudem wurde auch in anderen Systemen eine Beteiligung  $\text{HCO}_3^-$ -abhängiger Transporter an der  $\text{pH}_i$ -Regulation in nominell  $\text{HCO}_3^-$ -freier Lösung beobachtet. Beispiele sind Gliazellen von *Hirudo medicinalis* (Deitmer & Schneider 1998), Neurone von *Schistocerca gregaria* (Schwiening & Thomas 1992) und ventrikuläre Herzmuskelzellen der Ratte (Wu et al. 1994). Die auftretende DIDS-Sensitivität des Ruhe- $\text{pH}_i$  in *Calliphora* Speicheldrüsen ist somit ein eindeutiger Hinweis auf die Aktivität eines  $\text{Na}^+$ -abhängigen  $\text{HCO}_3^-$ -Transporters. Dieser transportiert  $\text{HCO}_3^-$  in die Zelle hinein und wirkt demnach alkalisierend.

Es wurde auch versucht, einen oder mehrere  $\text{HCO}_3^-$ -Transporter in den *Calliphora* Speicheldrüsen molekularbiologisch nachzuweisen. Bei Insekten ist nur der molekularbiologische Nachweis eines NDCBE aus *Drosophila* (NDAE1) publiziert (Romero et al. 2000, Sciortino et al. 2001). In der Biene *Apis mellifera* wurde gezeigt, dass der mRNA-Gehalt für  $\text{Na}^+$ -getriebene Anion-Austauscher im Gehirn von älteren Sammlerinnen höher ist, als in frisch geschlüpften Bienen (Tsuchimoto et al. 2004). Doch Sequenzinformationen fehlen hier. Bei Invertebraten findet sich dann nur noch der molekularbiologische Nachweis von  $\text{HCO}_3^-$ -Transportern im Tintenfisch *Loligo pealei* (Virkki et al. 2003, Piermarini et al. 2007).  $\text{HCO}_3^-$ -Transporter in Säugetieren sind hingegen gut untersucht (Sterling & Casey 2002, Romero et al. 2004). Der

molekularbiologische Nachweis eines  $\text{HCO}_3^-$ -Transporters gelang in den *Calliphora*-Speicheldrüsen leider nicht. Als Gründe sind hier neben der großen Diversität dieser Transporterfamilie fehlende Sequenzinformationen zu nennen. Dies bezieht sich sowohl auf Sequenzinformationen von *Calliphora vicina* (Genom ist nicht sequenziert), als auch auf fehlende Sequenzinformationen zu  $\text{HCO}_3^-$ -Transportern anderer Insekten (s.o.).

Zu ansäuernden  $\text{HCO}_3^-$ -Transportern zählen der AE und der auswärts gerichtete NBC ( $\text{Na}^+ : \text{HCO}_3^-$  Stöchiometrie 1:3) (Abb. 1.1 B). Diese Transporter sind ebenfalls mit DIDS blockierbar (Boron 2001, Romero et al. 2004). Anhand der DIDS-Sensitivität können diese Transporter hier aber nicht identifiziert werden. In diesem Fall müsste DIDS zu einer intrazellulären Alkalisierung führen, was unter Ruhe-Bedingungen jedoch nicht eintrat. Die DIDS-induzierte Ansäuerung zeigt, dass unter Ruhe-Bedingungen vor allem alkalisierende Mechanismen vorherrschen (s.o.). Diese Beobachtung erscheint jedoch sinnvoll, wenn man in Betracht zieht, dass die Zellen, aufgrund des stark einwärts gerichteten elektrochemischen  $\text{H}^+$ -Gradienten, vor allem einer schleichenden Ansäuerung entgegen wirken müssen. Um dennoch zu ermitteln, ob unter Ruhe-Bedingungen auch ansäuernde Mechanismen aktiv sind, wurde versucht, die Aktivität des AE durch die Wegnahme von extrazellulärem  $\text{Cl}^-$  zu beeinflussen. Unter Normalbedingungen transportiert der AE  $\text{Cl}^-$  in die Zelle hinein und  $\text{HCO}_3^-$  aus der Zelle heraus. Entfernt man extrazelluläres  $\text{Cl}^-$ , ändert sich die Transportrichtung,  $\text{Cl}^-$  wird nun aus der Zelle heraus und  $\text{HCO}_3^-$  in die Zelle hinein transportiert. Dieser Vorgang würde zu einer intrazellulären Alkalisierung führen, die nicht beobachtet werden konnte. In der unstimulierten Drüse besteht somit offenbar kein messbarer Einfluss des AE auf den Ruhe- $\text{pH}_i$ . Stattdessen trat unter  $\text{Cl}^-$ -freien Bedingungen eine schleichende Ansäuerung auf. Diese Beobachtung deutet auf eine  $\text{Cl}^-$ -abhängige Regulierung eines alkalisierenden Transportsystems hin. Es ist bekannt, dass die V-ATPase  $\text{Cl}^-$ -abhängig reguliert werden kann. Diese Regulierung bezieht sich sowohl auf die Elektrogenität, als auch auf den  $\text{H}^+$ -Transport der V-ATPase. Der elektrogene  $\text{H}^+$ -Transport der V-ATPase erfordert einen parallelen transepithelialen  $\text{Cl}^-$ -Transport (als Gegenion). Diese Abhängigkeit wurde in der in Zellen des Sammelrohrs und des proximalen Tubulus der Niere in Kaninchen gezeigt (Stone et al. 1983, Malnic & Geibel 2000). Im distalen Tubulus der Ratteniere verstärkt der  $\text{Cl}^-$ -Kanal-Blocker NPPB die Negativierung des luminalen Membranpotentials und blockiert die luminale Ansäuerung durch die V-ATPase (Fernández et al. 1997). Im proximalen Tubulus wird zudem die V-ATPase-vermittelte Erholung von einer intrazellulären Ansäuerung in  $\text{Cl}^-$ -freier Lösung unterbunden (Wagner et al. 1998). Dieses Modell ist auch in den *Calliphora* Speicheldrüsen denkbar. Die elektrochemische Triebkraft (DF) liegt für  $\text{Cl}^-$  im unstimulierten Zustand bei 20.5 mV (über der apikalen Membran).

$$DF = 58 \text{ mV} * \log \frac{[Cl^-]_i}{[Cl^-]_o} - V_m^{*4}$$

$$DF = 58 \text{ mV} * \log \frac{33}{155} - (-59.5 \text{ mV}) = 20.5 \text{ mV}$$

Für Anionen ist bei  $DF > 0$  der Efflux, in diesem Fall ins Lumen, begünstigt. Entfernt man extrazelluläres  $Cl^-$ , sinkt die  $Cl^-$ -Konzentration auch intrazellulär auf wenige mM ab. Wenn  $[Cl^-]_i$  bspw. nur noch 5 mM beträgt, ergibt sich eine elektrochemische Triebkraft von  $DF = -27 \text{ mV}$ .

$$DF = 58 \text{ mV} * \log \frac{[Cl^-]_i}{[Cl^-]_o} - V_m^{*5}$$

$$DF = 58 \text{ mV} * \log \frac{5}{155} - (-59.5 \text{ mV}) = -27 \text{ mV}$$

Das heißt, unter  $Cl^-$ -freien Bedingungen erfolgt eine Umkehr der elektrochemischen Triebkraft für  $Cl^-$ . Sie ist dann einwärts gerichtet, also vom Lumen in die Zelle. Daraus resultierend fehlt das Anion für den auswärts gerichteten  $H^+$ -Transport und die Aktivität der V-ATPase muss abnehmen.  $H^+$ -Ionen akkumulieren in der Zelle und führen zu der beobachteten Ansäuerung.

Zudem können AE und auswärts gerichteter NBC in ihrer Aktivität beeinflusst werden, wenn die intrazelluläre Verfügbarkeit von  $HCO_3^-$  gesenkt wird.  $HCO_3^-$  wird intrazellulär durch die Aktivität der Carboanhydrase bereitgestellt. Die Aktivität der Carboanhydrase ist somit funktionell an den auswärts gerichteten  $HCO_3^-$ -Transport gekoppelt (Sterling & Casey 2002, Vaughan-Jones & Spitzer 2002). Dafür spricht in den *Calliphora* Speicheldrüsen die Lokalisation der Carboanhydrase. Diese ist nicht über die gesamte Zelle verteilt, sondern an der basalen Membran konzentriert (Schewe et al. 2008). In dieser Arbeit konnte die Carboanhydrase in den *Calliphora* Speicheldrüsen auch molekularbiologisch nachgewiesen werden (*Cv CA*). Dabei wurde festgestellt, dass es sich um eine  $\alpha$ -Carboanhydrase handelt. In diese Genfamilie gehören alle Carboanhydrase-Isoformen des Tierreichs. Die  $\beta$ - und  $\gamma$ -Klasse umfasst die Carboanhydrase-Formen von Pflanzen und Bakterien (Hewett-Emmett & Tashian 1996, Tripp et al. 2001). Nicht gezeigt werden konnte, um welche Isoform es sich handelt. Dazu ist eine vollständige Klonierung der Sequenz nötig. Ausgehend von der AS-Sequenz können dann die genauen Eigenschaften des Proteins charakterisiert werden. Vor allem interessant wären Untersuchungen zu Interaktionspartnern der Carboanhydrase. Es ist bekannt das

<sup>4</sup> $Cl^-_o = 155 \text{ mM}$  (in Ringerlösung),  $[Cl^-]_i = 33 \text{ mM}$  (Gupta et al. 1977),  $V_m = -59.5 \text{ mV}$  (apikales Membranpotential, Prince & Berridge 1972, Berridge et al. 1975)

<sup>5</sup> $Cl^-_o = 155 \text{ mM}$  (in Ringerlösung),  $[Cl^-]_i = 5 \text{ mM}$ ,  $V_m = -59.5 \text{ mV}$

die Carboanhydrase mit  $\text{HCO}_3^-$ -Transportern ein Transportmetabolon bilden kann. Diese räumliche Nähe ermöglicht einen effektiven  $\text{HCO}_3^-$ -Transport aus der Zelle heraus (Seki & Frömter 1992, Vince & Reithmeier 1998, Sterling et al. 2001). Die Lokalisierung der Carboanhydrase in den Zellen der *Calliphora* Speicheldrüse lässt zudem darauf schließen, dass es sich um eine membranständige Carboanhydrase handelt. Die Blockierung der Carboanhydrase zeigte keinen messbaren Einfluss auf den Ruhe- $\text{pH}_i$ -Wert. AE und auswärts gerichteter NBC spielen somit offenbar keine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung des Ruhe- $\text{pH}_i$ . Diese Beobachtung unterstützt die Annahme, dass unter Ruhe-Bedingungen vor allem alkalisierende  $\text{pH}_i$ -regulierende Transporter aktiv sind.

Nicht vernachlässigt werden darf zudem der Beitrag des putativen  $n\text{H}^+/\text{K}^+$ -Antiporters an der  $\text{pH}_i$ -Regulation. Er transportiert  $\text{H}^+$  in die Zelle hinein. Daraus resultierend ist ein Einfluss auf den  $\text{pH}_i$  nahe liegend. Im Moment kann dazu jedoch noch keine Aussage getroffen werden, da der konkrete Nachweis dieses Transporters fehlte und die Stöchiometrie  $\text{H}^+ : \text{K}^+$  nicht bekannt ist. In dieser Arbeit ist gelungen, erstmals den molekularbiologischen Nachweis für die Expression eines  $n\text{H}^+/\text{K}^+$ -Antiporters in den *Calliphora* Speicheldrüsen zu liefern. In *Anopheles gambiae* wurde erstmals ein  $\text{K}^+/\text{H}^+$ -Antiporter (AgNHA1) kloniert (Rheault et al. 2007). Ausgehend davon wurden degenerierte Primer entwickelt, mit denen es gelang, aus einer cDNA-Bibliothek der *Calliphora* Speicheldrüse ein ca. 275 bp langes Fragment zu amplifizieren (*Cv NHA*). Die abgeleitete AS-Sequenz (109 AS) zeigte hohe Ähnlichkeit zu AgNHA1. Dies ist der erste direkte Nachweis des  $n\text{H}^+/\text{K}^+$ -Antiporters in den *Calliphora* Speicheldrüsen. Eine vollständige Klonierung dieses Transporters würde weit über das Ziel dieser Arbeit hinausgehen. Die gewonnen Sequenzinformationen dienen jedoch als Ausgangspunkt für weitere Arbeiten. Durch das Einbringen in ein geeignetes Expressionssystem könnten die konkreten Eigenschaften dieses Proteins charakterisiert werden. Dass umfasst vor allem den genauen Transportmechanismus von  $\text{K}^+$  und  $\text{H}^+$ , die Stöchiometrie und die pharmakologischen Eigenschaften des Transporters.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass zur Aufrechterhaltung des Ruhe- $\text{pH}_i$  in der unstimulierten Speicheldrüse von *Calliphora vicina* vor allem die V-ATPase und ein  $\text{Na}^+$ -abhängiger  $\text{HCO}_3^-$ -Transporter beitragen. Der  $\text{Na}^+$ -abhängige Glutamat-Transporter ist *per se* kein  $\text{pH}_i$ -regulierender Transporter, seine Aktivität hat jedoch entscheidenden Einfluss auf den Ruhe- $\text{pH}_i$ .

#### 4.1.2 Erholung von einer intrazellulären Ansäuerung - NH<sub>4</sub>Cl-Vorpuls-Methode

Oben (4.1.1) wurde bereits diskutiert, dass die Zellen in den *Calliphora* Speicheldrüsen auch im nicht stimulierten Zustand einer Ansäuerung entgegenwirken müssen, weil über der Plasmamembran ein einwärts gerichteter Gradient für H<sup>+</sup> besteht. Die bisherige Diskussion berücksichtige Transporter, die an der Aufrechterhaltung des Ruhe-pH<sub>i</sub> beteiligt sind. Die Transportmechanismen, die in der unstimulierten Speicheldrüse von *Calliphora vicina* die Erholung von einer intrazellulären Ansäuerung sicherstellen, waren nicht bekannt. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit systematisch untersucht, welche Transporter an der Alkalisierung nach einer experimentell, ohne Hormonstimulierung, induzierten Ansäuerung beteiligt sind. Diese Befunde sollten die Mechanismen der pH<sub>i</sub>-Regulation noch weitergehend charakterisieren. Experimentell kann eine intrazelluläre Ansäuerung durch die Verwendung der sog. NH<sub>4</sub>Cl-Vorpuls-Methode hervorgerufen werden (Roos & Boron 1981, Boron 2004). Beim Einspülen von NH<sub>4</sub>Cl sollte zunächst eine intrazelluläre Alkalisierung auftreten. NH<sub>4</sub><sup>+</sup> dissoziiert in NH<sub>3</sub> und H<sup>+</sup>. NH<sub>3</sub> diffundiert in die Zelle und bindet H<sup>+</sup>. Dadurch kommt eine Alkalisierung zustande. Dieser Effekt trat in den *Calliphora* Speicheldrüsen jedoch nicht auf. Das Einspülen von NH<sub>4</sub>Cl verursachte eine intrazelluläre Ansäuerung. Eine Erklärungsmöglichkeit hierfür ist, das NH<sub>4</sub><sup>+</sup> ebenfalls in die Zelle gelangt. Der ansäuernde Effekt von NH<sub>4</sub>Cl wurde auch in Gliazellen der Retina von *Apis mellifera* (Marcaggi et al. 1999, Marcaggi & Coles 2000), in Zellen Malpighischer Gefäße von *Drosophila hydei* (Bertram & Wessing 1994), in Epithelzellen der Speicheldrüse von *Periplaneta americana* (Hille 2006, Hille & Walz 2007) und auch in Epithelzellen des Colons der Ratte (Ramirez et al. 1999) beobachtet. Tab. 4.1 zeigt, dass in diesen Systemen bei ähnlichen Ruhe-pH<sub>i</sub>-Werten, eine vergleichbare Ansäuerung auftritt.

Tab. 4.1: NH<sub>4</sub>Cl-induzierte Ansäuerung; Vergleich der *Calliphora* Speicheldrüsen mit anderen Systemen

Zelltyp / Organismus	Ruhe-pH <sub>i</sub>	Ansäuerung NH <sub>4</sub> Cl	Quelle
Epithelzellen Speicheldrüse <i>Calliphora vicina</i>	7.53 ± 0.34	-0.26 ± 0.02	
Malpighische Gefäße Larven <i>Drosophila hydei</i>	7.70 ± 0.29* (proximales Segment)	-0.40**	Bertram & Wessing 1994
Gliazellen Retina <i>Apis mellifera</i>	7.25-7.55**	-0.463 ± 0.097*	Marcaggi et al. 1999 Marcaggi & Coles 2000
Epithelzellen Colon Ratte	7.51 ± 0.0027*	-0.36 ± 0.03*	Ramirez et al. 1999

\*MW ± Standardabweichung, \*\*MW

Der genaue Mechanismus, wie  $\text{NH}_4^+$  in die Zelle gelangt wurde in dieser Arbeit nicht genauer untersucht. In anderen Zelltypen, wo das beschriebene Phänomen ebenfalls zu beobachten ist, werden der  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Cotransporter, der NHE,  $\text{K}^+$ -Kanäle und ein Cotransport von  $\text{NH}_4^+$  und  $\text{Cl}^-$ , als mögliche Transportmechanismen genannt (Betram & Wessing 1994, Ramirez et al. 1999, Marcaggi et al. 1999, Marcaggi & Coles 2000, Hille & Walz 2007). In den *Calliphora* Speicheldrüsen konnte lediglich beobachtet werden, dass unter  $\text{Na}^+$ -freien Bedingungen eine transiente Alkalisierung beim Einspülen von  $\text{NH}_4\text{Cl}$  auftrat (Abb. 3.3 A). Dieser Effekt war in der Gegenwart von EIPA nicht zu beobachten (Abb. 3.4 A). Daraus kann geschlossen werden, dass die  $\text{NH}_4^+$ -Aufnahme in diesen Zellen teilweise  $\text{Na}^+$ -abhängig ist. Diese Abhängigkeit kann jedoch nicht dem NHE zugeordnet werden. Die Fähigkeit einer Zelle zur Aufnahme von  $\text{NH}_4^+$  hat auch physiologische Bedeutung. In den Gliazellen der Retina von *Apis mellifera* wurde der Einfluss von  $\text{NH}_4^+$  und Glutamat intensiv untersucht (Tsacopoulos et al. 1997). Dabei konnte festgestellt werden, dass die Gliazellen in der Lage sind,  $\text{NH}_4^+$  und Glutamat aufzunehmen. Ein Anstieg der intrazellulären  $\text{NH}_4^+$  und / oder Glutamat-Konzentration führt zu einem Anstieg der NAD(P)H-Fluoreszenz. Dies ist ein eindeutiger Hinweis darauf, dass sowohl  $\text{NH}_4^+$ , als auch Glutamat eine entscheidende Rolle bei Stoffwechselprozessen spielen. Ein ähnliches Szenario ist auch in den Speicheldrüsen von *Calliphora vicina* denkbar. Die Bedeutung von Glutamat für diese Zellen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden (s.o.). Ebenso sind diese Zellen in der Lage  $\text{NH}_4^+$  aufzunehmen. Welche Rolle diese beiden Substanzen bei Stoffwechselprozessen spielen, muss in weiterführenden Arbeiten geklärt werden.

Nach dem Auswaschen von  $\text{NH}_4\text{Cl}$  trat, wie erwartet, eine zusätzliche Ansäuerung auf. Diese kommt dadurch zustande, dass  $\text{NH}_3$  die Zelle schneller verlässt als  $\text{NH}_4^+$ . Von dieser Ansäuerung kann sich die Zelle nur durch aktive  $\text{pH}_i$ -Regulationsmechanismen erholen. Dafür in Frage kommende Transportmechanismen sind in erster Linie  $\text{Na}^+$ -abhängig. Das Entfernen von extrazellulärem  $\text{Na}^+$  verstärkte sowohl die durch  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -induzierte Ansäuerung, als auch die Ansäuerung nach dem Auswaschen von  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Es hatte jedoch keinen inhibitorischen Effekt auf die Geschwindigkeit, mit der sich die Zellen von dieser intrazellulären Ansäuerung erholten. Ein weiteres in Frage kommendes Transportsystem ist die apikal lokalisierte V-ATPase. Eine Blockierung der V-ATPase mit Concanamycin A alleine hatte keinen Effekt auf die Erholung von einer intrazellulären Ansäuerung. Erst die Verwendung von Concanamycin A unter  $\text{Na}^+$ -freien Bedingungen verlangsamte die Erholungsrate signifikant. Damit konnte gezeigt werden, dass in den Speicheldrüsen von *Calliphora vicina* mindestens zwei alkalisierende Transportsysteme vorhanden sind. Ein  $\text{Na}^+$ -abhängiger Mechanismus und die V-ATPase. Wird nur eines der beiden Systeme blockiert, ist das andere offensichtlich in der Lage diesen Ausfall nahezu vollständig zu kompensieren.

Ein ähnliches Szenario konnte auch in den Ausführsgängen der Speicheldrüse von *Periplaneta americana* (Hille & Walz 2007) beobachtet werden. Im Gegensatz dazu finden sich auch Systeme, bei denen die Erholung von einer intrazellulären Ansäuerung vollständig dem einen oder dem anderen System zugeordnet werden kann. In Zellen des Colons und in Gangzellen der Speicheldrüse der Maus ist die Erholungsrate nahezu vollständig von extrazellulärem  $\text{Na}^+$  abhängig (Chaturapanich et al. 1997, Tsuchiya et al. 2001). Hier spielt die V-ATPase keine wesentliche Rolle. In Malphigischen Gefäßen von *Drosophila* Larven war die Erholung hingegen fast ausschließlich abhängig von der Aktivität einer V-ATPase (Bertram & Wessing 1994). Nachfolgend stellte sich die Frage welches  $\text{Na}^+$ -abhängige Transportsystem hier beteiligt ist. In Betracht gezogen werden können der NHE, sowie der einwärts gerichtete NBC und der NDCBE. Diese können pharmakologisch durch EIPA (NHE-Blocker) und DIDS (Hemmstoff für  $\text{HCO}_3^-$ -Transporter) unterschieden werden. Überraschenderweise hatte EIPA keinen Effekt auf die Erholung von einer intrazellulären Ansäuerung. Dieser Befund war umso verwunderlicher, weil eine Beteiligung des NHE an der 5-HT-induzierten Ansäuerung zweifelsfrei gezeigt werden konnte (siehe 3.3.1). Andererseits spielt der NHE bei der Aufrechterhaltung des Ruhe- $\text{pH}_i$  keine messbare Rolle (siehe 3.1.1). Ganz offensichtlich ist der NHE in den *Calliphora* Speicheldrüsen zwar an der 5-HT-induzierten Ansäuerung beteiligt, spielt jedoch keine Rolle bei der  $\text{pH}_i$ -Regulation in der unstimulierten Drüse. Diese Beobachtung wurde durch die DIDS-Sensitivität der Erholungsrate bestätigt. In Gegenwart des V-ATPase-Blockers Concanamycin A und des Hemmstoffs für  $\text{HCO}_3^-$ -Transporter war die Erholung von einer intrazellulären Ansäuerung fast vollständig blockiert. Das lässt den Schluss zu, dass in den *Calliphora* Speicheldrüsen ein  $\text{Na}^+$ -abhängiger  $\text{HCO}_3^-$ -Transporter ganz wesentlich an der  $\text{pH}_i$ -Regulation beteiligt ist. Da einwärts gerichteter NBC und NDBCE pharmakologisch nicht voneinander zu trennen sind, ist es schwer zu sagen, welcher der beiden Transporter hier aktiv ist. Die fehlende  $\text{Cl}^-$ -Sensitivität liefert jedoch einen ersten Hinweis, dass der einwärts gerichtete NBC der hier vorherrschende Transportmechanismus ist. Aus diesen Befunden kann geschlossen werden, dass die Wiederherstellung des Ruhe- $\text{pH}_i$ , nach einer intrazellulären Ansäuerung, durch einen  $\text{Na}^+$ -abhängigen  $\text{HCO}_3^-$ -Transporter und die apikale V-ATPase erfolgt. Damit sind an der Wiederherstellung des Ruhe- $\text{pH}_i$  nach einer intrazellulären Ansäuerung dieselben Mechanismen beteiligt, die auch wesentlich zur Aufrechterhaltung des Ruhe- $\text{pH}_i$  beitragen.

### 4.1.3 Erholung von einer intrazellulären Alkalisierung - Na-acetat-Vorpuls-Methode

Mit Hilfe der Na-acetat-Vorpuls-Methode wurde auch untersucht, welche *acid loader* in den Zellen der *Calliphora* Speicheldrüsen einer intrazellulären Alkalisierung entgegenwirken.

Bekannte ansäuernde Mechanismen sind der AE und der auswärts gerichtete NBC (Abb. 1.1 B). Beide Transporter transportieren  $\text{HCO}_3^-$  aus der Zelle heraus ( $\text{HCO}_3^-$  *efflux*). In Herzmuskelzellen des Meerschweinchens und in Endothelzellen des Rattengehirns ist die Erholung von einer intrazellulären Alkalisierung zum größten Teil von der Aktivität eines AE abhängig (Leem & Vaughan-Jones 1998, Nicola et al. 2008). Beispiele für die Aktivität des auswärts gerichteten NBC finden sich in Gliazellen des Blutegels *Hirudo medicinalis* (Deitmer 1991), in Speicheldrüsen der Maus (Luo et al. 2001), in Zellen des Duodenums der Ratte (Akiba et al. 2001) sowie in Pankreaszellen des Meerschweinchens (Ishiguro et al. 1996). In den Speicheldrüsen von *Calliphora vicina* spricht die  $\text{Cl}^-$ -Abhängigkeit der Erholungsrate nach einer intrazellulären Alkalisierung für die Aktivität eines AE. Die fehlende DIDS-Sensitivität ist ein erster Hinweis auf einen DIDS-insensitiven AE. Ein ähnliches Szenario konnte auch bei 5-HT-induzierten  $\text{pH}_i$ -Änderungen beobachtet werden (siehe 3.3.1). Diese Möglichkeit wird unter 4.2 näher erläutert. Auch die Herabsetzung der Verfügbarkeit von intrazellulärem  $\text{HCO}_3^-$  durch eine Blockierung der Carboanhydrase hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Erholung von einer intrazellulären Alkalisierung.

Ergänzend wurde der Einfluss des  $\text{Na}^+$ -abhängigen Glutamat-Transporters untersucht. Da dieser parallel zum einwärts gerichteten Glutamat-Transport auch  $\text{H}^+$  in die Zelle hinein transportiert, ist eine Beteiligung an der  $\text{pH}_i$ -Regulation nicht ausgeschlossen. Es wurde deutlich, dass die Aktivität des  $\text{Na}^+$ -abhängigen Glutamat-Transporters den Ruhe- $\text{pH}_i$  beeinflusst, er aber an der Wiederherstellung des Ruhe- $\text{pH}_i$  nach einer intrazellulären Alkalisierung nicht beteiligt ist.

Der putative  $n\text{H}^+/\text{K}^+$ -Antiporter in der Apikalmembran wirkt als *acid loader*, weil er  $\text{H}^+$  in die Zelle hinein transportiert. Daher kann eine Beteiligung an der  $\text{pH}_i$ -Regulation in der unstimulierten Drüse in Betracht gezogen werden. Der Beitrag des putativen  $n\text{H}^+/\text{K}^+$ -Antiporters zur Wiederherstellung des Ruhe- $\text{pH}_i$  nach einer intrazellulären Alkalisierung kann im Moment jedoch nicht untersucht werden. Es fehlen wichtige Informationen im Hinblick auf Stöchiometrie, Kinetik und Pharmakologie des Transporters. Amilorid wird zwar als Hemmstoff beschrieben (Wieczorek 1992, Lepier et al. 1994, Grinstein & Wieczorek 1994), ist jedoch nicht spezifisch für den  $\text{K}^+/\text{H}^+$ -Antiporter. Amilorid blockiert zusätzlich den NHE, den  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher und epitheliale  $\text{Na}^+$ -Kanäle (Kleyman & Cragoe 1988). Im Rahmen dieser Arbeit ist es aber erstmals gelungen, den  $n\text{H}^+/\text{K}^+$ -Antiporter in den *Calliphora* Speicheldrüsen mit molekularbiologischen Methoden nachzuweisen.



Die dabei gewonnen Sequenzinformationen können nun genutzt werden, um putative Hemmstoffe zu selektieren und die Stöchiometrie des Transporters zu ermitteln. Dann wäre es auch möglich seinen Beitrag zur Wiederherstellung des Ruhe-pH<sub>i</sub> nach einer Alkalisierung in der unstimulierten Drüse zu untersuchen.

Ein weiterer *acid loader* ist ein K<sup>+</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Cotransporter, da er HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> aus der Zelle heraus transportiert (Boron 2001). Am Riesenaxon des Tintenfischs konnte gezeigt werden, dass die Erholung von einer intrazellulären Alkalisierung K<sup>+</sup>- und HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-abhängig, jedoch nicht DIDS-sensitiv war (Hogan et al. 1995, Boron 2001). Im Sammelrohr der Rattenniere war die Erholung von einer intrazellulären Alkalisierung HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-abhängig und DIDS-sensitiv. Hier wurde gezeigt, dass die Erholung bei einer Erhöhung der extrazellulären K<sup>+</sup>-Konzentration oder einem Absenken der intrazellulären K<sup>+</sup>-Konzentration blockiert wird (Leviel et al. 1992). Ansonsten finden sich in der Literatur noch keine weiteren Beschreibungen eines solchen Transporters. Das Entfernen von K<sup>+</sup> aus der Ringerlösung ist zudem sehr kritisch zu sehen, da es zu dramatischen Effekten auf das Ruhemembranpotential kommt. Das Ruhemembranpotential ist in erster Linie ein K<sup>+</sup>-Gleichgewichtspotential. Das Entfernen bzw. die Reduzierung von extrazellulärem K<sup>+</sup> erhöht den K<sup>+</sup>-Konzentrationsgradienten und führt zu einer Hyperpolarisation, was sämtliche elektrogene Transportprozesse signifikant beeinflusst. Da in den Speicheldrüsen von *Calliphora vicina* nach einer intrazellulären Alkalisierung kein Unterschied zwischen einer Erholung in HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-haltigem und HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-freiem Ringer zu messen war (Daten nicht gezeigt), wurde dieser Transporter nicht in Betracht gezogen bzw. nicht näher untersucht.

Ein intrazelluläre Alkalisierung verstärkt den einwärts gerichteten elektrochemischen H<sup>+</sup>-Gradienten. Unter Normalbedingungen beträgt die elektrochemische Triebkraft für H<sup>+</sup> DF = 64.4 mV (siehe 4.1.1). Die durch den Na-acetat-Vorpuls hervorgerufene Alkalisierung beträgt 0.69 ± 0.03 pH-Einheiten. Der pH<sub>i</sub> steigt somit auf ca. pH<sub>i</sub> = 8.2 an.

$$DF = 58 \text{ mV} * \log \frac{[H^+]_o}{[H^+]_i} - V_m *6$$

$$DF = 58 \text{ mV} * \log \frac{10^{-7.2}}{10^{-8.2}} - (-47 \text{ mV}) = 105 \text{ mV}$$

Daraus resultierend erhöht sich die elektrochemische Triebkraft für H<sup>+</sup>, durch den Na-acetat-Vorpuls, auf DF = 105 mV. Dies könnte zu einer Verstärkung des passiven Influx für H<sup>+</sup> z.B. durch Ionenkanäle (Decoursey 2003, Boron 2004) führen. Der Beitrag des passiven H<sup>+</sup>-Influx an der pH<sub>i</sub>-Regulation ist jedoch gering (Boron 1983), so dass

---

<sup>6</sup>pH<sub>o</sub> = 7.2 (pH der Ringerlösung), [H<sup>+</sup>]<sub>o</sub> = 10<sup>-7.2</sup>, pH<sub>i</sub> = 8.2 (pH<sub>i</sub> nach Na-acetat-Vorpuls), [H<sup>+</sup>]<sub>i</sub> = 10<sup>-8.2</sup>, V<sub>m</sub> = -47 mV

hier kein signifikanter Beitrag zur Wiederherstellung des Ruhe-pH<sub>i</sub> erwartet werden kann.

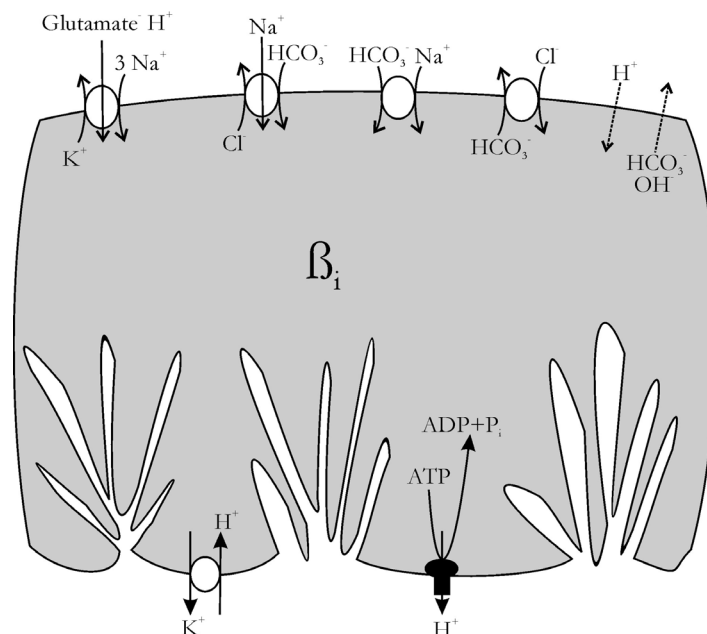
Nicht bekannt war, ob an der Erholung von einer intrazellulären Alkalisierung auch ATP-verbrauchende Transportprozesse mitwirken. Diese Frage ist relevant, da z.B. in roten Blutzellen und in Zellen der glatten Muskulatur gezeigt wurde, dass die membranständige Ca<sup>2+</sup>-ATPase, unter ATP-Verbrauch auch als Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup>-Austauscher arbeitet und H<sup>+</sup> in die Zelle hinein transportiert (Zhang et al. 1992, Daugirdas et al. 1995). Um Informationen über die Beteiligung aktiver Transportprozesse an der Erholung von einer intrazellulären Alkalisierung zu erhalten, wurde in dieser Arbeit die F-ATPase in den Mitochondrien mit Oligomycin blockiert, um die ATP-Synthese zu hemmen (Whittam et al. 1964). Oligomycin hatte jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die Geschwindigkeit mit der sich die Zellen von einer intrazellulären Alkalisierung erholten. An der Erholung von einer intrazellulären Alkalisierung ist deshalb offenbar kein ATP-verbrauchender Transporter beteiligt. Offenbar reichen die hohe intrinsische Pufferkapazität von 123.5 ± 80.4 mM und die bicarbonatabhängige Pufferkapazität von 52.2 ± 26.8 mM aus, um eine Alkalisierung wirkungsvoll zu puffern. Leider ist der Beitrag der Pufferkapazität an der pH<sub>i</sub>-Regulation nur schwer zu untersuchen, da zahlreiche Mechanismen und Komponenten, wie Bicarbonate, Phosphate, Aminosäure, Peptide und Proteine zur Pufferkapazität beitragen (Ross & Boron 1981, Ilundain 1992, Putnam 2001).

Zusammenfassend kann gesagt werden: Die Cl<sup>-</sup>-Abhängigkeit der Wiederherstellung des Ruhe-pH<sub>i</sub> nach einer intrazellulären Alkalisierung deutet auf die Aktivität eines AE hin. Eine klare DIDS-Abhängigkeit (oder weitere Eigenschaften) konnten nicht beobachtet werden. Auch unter extremen Bedingungen waren die Zellen noch in der Lage sich vollständig von einer intrazellulären Alkalisierung zu erholen. Offenbar reichen intrazelluläre Puffer aus, um einer intrazellulären Alkalisierung entgegen zu wirken. Ergänzt wird dies durch die Aktivität eines putativen AE.

#### 4.1.4 Modell zur Regulation des Ruhe-pH<sub>i</sub> in der Speicheldrüse von *Calliphora vicina*

In der unstimulierten Speicheldrüse von *Calliphora vicina* sind vor allem die V-ATPase und mindestens ein Na<sup>+</sup>-abhängiger HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Transporter an der pH<sub>i</sub>-Regulation beteiligt. Es konnte ein Na<sup>+</sup>-abhängiger Glutamat-Transporter nachgewiesen werden, dessen Aktivität den Ruhe-pH<sub>i</sub> beeinflusst, der aber nicht an der Wiederherstellung des Ruhe-pH<sub>i</sub> nach einer intrazellulären Alkalisierung beteiligt ist. pH<sub>i</sub>-Messungen lieferten erste Hinweise auf einen AE. Der Beitrag des putativen nH<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-Antiporter konnte in dieser Arbeit nicht ermittelt werden. Zusammen genommen ist die pH<sub>i</sub>-Regulation in der unstimulierten Drüse ein komplexes Zusammenwirken verschiedener Transporter. Zudem spielt die intrazelluläre Pufferkapazität eine entscheidende Rolle bei der

pH<sub>i</sub>-Regulation.



**Abb. 4.1: Modell zur pH<sub>i</sub>-Regulation in der unstimulierten Speicheldrüse von *Calliphora vicina***  
Die apikale V-ATPase, sowie ein einwärts gerichteter Na<sup>+</sup>-abhängiger HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Transporter sind entscheidend an der pH<sub>i</sub>-Regulation in der unstimulierten Speicheldrüse von *Calliphora vicina* beteiligt. Die Aktivität des Na<sup>+</sup>-abhängigen Glutamat-Transporters hat Einfluss auf den Ruhe-pH<sub>i</sub>. Der Beitrag des AE und des putativen nH<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-Antiporters konnte nicht vollständig geklärt werden.

## 4.2 5-HT-induzierte pH<sub>i</sub>-Änderungen

Die Transporter, die an der 5-HT-induzierten Ansäuerung beteiligt sind, waren am Beginn dieser Arbeit noch nicht identifiziert. Modelle zur Speichelsekretion in Säugerspeicheldrüsen postulieren die gekoppelte Aktivität eines NHE und AE bei der Sekretion des Primärspeichels (Nauntofte 1992, Turner & Sugiya 2002, Melvin et al. 2005). Allerdings muss in Betracht gezogen werden, dass diese Erkenntnisse vorrangig an acinösen Speicheldrüsen gewonnen wurden. Die *Calliphora* Speicheldrüsen hingegen sind tubulär gebaut. Ein elementarer Unterschied ist, dass in den acinösen Speicheldrüsen der Säuger vorrangig ein NaCl-reicher Primärspeichel gebildet wird, während die tubulären Speicheldrüsen von *Calliphora vicina* einen KCl-reichen Primärspeichel sezernieren. Zudem wird die Energetisierung der apikalen Membran durch die V-ATPase und die Aktivität des putativen nH<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-Antiporters in den Modellen für die Säugerspeicheldrüsen nicht berücksichtigt. Strukturell ähneln die tubulären Speicheldrüsen von *Calliphora vicina* den Malphigischen Gefäßen der Insekten. Auch dort findet eine stimulus-induzierte Flüssigkeitssekretion statt. Die dabei ablaufenden intrazellulären Prozesse sind in Malphigischen Gefäßen von *Drosophila melanogaster* (Dow et al. 1994) oder *Rhodnius prolixus* (Ianowski et al. 2002, Ianowski & O'Donnell 2006), sowie auch im Mitteldarm der Larve von *Manduca sexta* (Wieczorek et al. 1991, Zeiske et al. 2002) gut untersucht. Dabei fallen Parallelen zu den hier beschriebenen Speicheldrüsen

auf. Wieczorek et al. (1991) beschrieben als erste, dass die Energetisierung der Plasmamembran durch die V-ATPase einen sekundär aktiven  $K^+$ -Transport antreibt. Der  $K^+$ -Transport durch einen putativen  $nH^+/K^+$ -Antiporter erfolgt in Larven von *Manduca sexta* in das Lumen des Mitteldarms. Dieses System konnte später auch auf die *Calliphora* Speicheldrüsen übertragen werden (Zimmermann 2003). In Malpighischen Gefäßen von *Rhodnius prolixus* und *Drosophila melanogaster* erfolgt eine stimulus-induzierte Flüssigkeitssekretion (Ianowski et al. 2002, Dow et al. 1994). In beiden Systemen wird ein Transport von  $Na^+$  und/oder  $K^+$  ins Lumen, durch die Aktivität einer apikal lokalisierten V-ATPase energetisiert. Zudem tritt in den Zellen der Malpighischen Gefäßen von *Rhodnius prolixus* eine 5-HT-induzierte Ansäuerung auf (Ianowski & O'Donnell 2006).

Komponenten der vorgeschlagen Modelle zur Speichelsekretion in Vertebraten und zur Flüssigkeitssekretion in Malpighischen Gefäßen bzw. im Mitteldarm von Insekten wurden geprüft und eine Beteiligung von NHE und AE mittels  $pH_i$ -Messungen untersucht. Dabei konnten die folgenden Erkenntnisse gewonnen werden. Die 5-HT-induzierte intrazelluläre Ansäuerung war  $Na^+$ -abhängig. Als  $Na^+$ -abhängiges Transportsystem konnte der NHE identifiziert werden. Eine Blockierung des NHE mit dem spezifischen Hemmstoff EIPA (Vigne et al. 1983) blockierte die 5-HT-induzierte Ansäuerung ebenfalls vollständig. Einen weiteren Hinweis liefert die schon von Berridge gemachte Beobachtung, dass Amilorid, ebenfalls ein NHE-Hemmstoff, die 5-HT-induzierte Speichelsekretion blockiert (Berridge et al. 1976).

Ausgehend von diesen Ergebnissen sollte der NHE auch molekularbiologisch nachgewiesen werden. Als Ausgangspunkt dienten AS-Sequenzen des NHE aus *Drosophila melanogaster* (Giannakou & Dow 2001), *Aedes aegypti* (Hart et al. 2002, Pullikuth et al. 2006) und *Anopheles gambiae*. Unter Verwendung von degenerierten Primern gelang es ein 900 bp langes Fragment zu amplifizieren. Die abgeleitete AS-Sequenz zeigte hohe Ähnlichkeit zu AS-Sequenzen bereits bekannter NHEs aus Insekten. Das Vorhandensein eines NHE in den *Calliphora* Speicheldrüsen konnte somit zweifelsfrei nachgewiesen werden. Erstaunlicherweise ist der NHE an der 5-HT-induzierten Ansäuerung beteiligt, jedoch nicht an der  $pH_i$ -Regulation in der unstimulierten Speicheldrüse. Die Aktivität des NHE wird offenbar 5-HT-abhängig reguliert. Diese Regulation erfolgt vermutlich über den  $IP_3/Ca^{2+}$ -Weg und / oder den cAMP-Weg, die beide durch 5-HT aktiviert werden (Berridge 1970 & 1981). Dabei sind verschiedene Mechanismen vorstellbar. 5-HT aktiviert eine Adenylatzyklase, was zu einem Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration führt (Berridge 1970, Heslop & Berridge 1980). In früheren Arbeiten wurde bereits gezeigt, dass cAMP die PKA aktiviert. Diese phosphoryliert u.a. die UE-C der apikalen V-ATPase (Voss et al. 2007, Rein et al. 2008). Daher ist es denkbar, dass der NHE ebenfalls durch PKA-vermittelte Phosphorylierung aktiviert wird. Es ist bekannt dass die NHE-AS-Sequenzen putative Phosphorylierungsstellen bspw. für

PKA, PKC, MAP (*mitogen-activated protein*)-Kinasen und Calmodulin-abhängige Kinasen (CaM-Kinasen) enthalten (Fliegel & Fröhlich 1993). Auch die 3 bisher bekannten NHE-Isoformen von *Drosophila melanogaster* enthalten diese putativen Phosphorylierungsstellen (Giannakou & Dow 2001). Eine Regulation des NHE über den  $IP_3/Ca^{2+}$ -Weg ist ebenfalls bereits beschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass der NHE in Ratten von der  $PtdIns(4,5)P_2$  - Verfügbarkeit abhängig ist (Aharonovitz et al. 2000). Nicht untersucht wurde, ob diese Regulation über eine direkte oder indirekte Interaktion erfolgt (Malo & Fliegel 2006). Weiterhin konnte für NHE von Mensch und Hamster gezeigt werden, dass die Carboanhydrase mit einem NHE interagiert und so einen effizienten  $H^+$ -Transport ermöglicht (Li et al. 2002 & 2006). Auch dieses Modell ist in den *Calliphora* Speicheldrüsen denkbar. Die Bedeutung der Carboanhydrase für die 5-HT-induzierte Ansäuerung konnte bereits in einer früheren Arbeit gezeigt werden (Schewe 2005, Schewe et al. 2008). Sowohl die Blockierung der Carboanhydrase, als auch die Blockierung des NHE führen zu einer Unterdrückung der 5-HT-induzierten Ansäuerung, so dass ein Zusammenspiel dieser beiden Proteine nahe liegt. Auch die basale Membranständigkeit der Carboanhydrase (Schewe et al. 2008) spricht für eine Interaktion mit einem oder mehreren basal lokalisierten Transportproteinen. Welcher der hier genannten Mechanismen in den *Calliphora* Speicheldrüsen vorherrschend ist, muss noch gezeigt werden. Dazu ist eine vollständige Klonierung des NHE auf der Grundlage der in dieser Arbeit gewonnenen Sequenzinformationen notwendig. Anhand der AS-Sequenz können dann putative Phosphorylierungsstellen ermittelt werden. Weiterhin ist es dann möglich putative Interaktionspartner, wie z.B. die Carboanhydrase zu ermitteln.

Die 5-HT-induzierte Ansäuerung wurde auch durch die Wegnahme von extrazellulärem  $Cl^-$  blockiert. Diese Beobachtung deutet auf eine Beteiligung des AE. Einige Modelle zur Speichelsekretion in Säugern postulieren eine gekoppelte Aktivität von NHE und AE (Turner & Sugiya 2002). Da die Beteiligung des NHE in den *Calliphora* Speicheldrüsen zweifelsfrei gezeigt werden konnte, ist eine Beteiligung des AE wahrscheinlich. Die 5-HT-induzierten  $pH_i$ -Änderungen waren jedoch nicht DIDS-sensitiv. DIDS sollte als Hemmstoff für  $HCO_3^-$ -abhängige Transportsysteme den AE blockieren. Dieser Effekt war jedoch in den *Calliphora* Speicheldrüsen nicht zu beobachten. Die Acetazolamid-Sensitivität der 5-HT-induzierten Ansäuerung zeigt jedoch eine  $HCO_3^-$ -Abhängigkeit an und liefert einen weiteren Hinweis auf ein  $HCO_3^-$ -abhängiges Transportsystem. Insgesamt ist also eine Beteiligung des AE nahe liegend. Die beschriebene DIDS-Unempfindlichkeit der 5-HT-induzierten Ansäuerung deutet auf einen DIDS-insensitiven AE hin. Die Existenz eines DIDS-insensitiven AE (AE4) wurde bereits in B-Typ Schaltzellen der Niere von Kaninchen nachgewiesen (Milton & Weiner 1998, Tsuganezawa et al. 2001). Funktionelle Studien zeigten dabei ähnliche Abhängigkeiten wie sie auch in den *Calliphora* Speicheldrüsen beobachtet

wurden. Transportsysteme in diesen Zellen werden durch cAMP aktiviert, was zu einer intrazellulären Ansäuerung führt (Hayashi 2001). AE4 wird cAMP-abhängig über die PKA reguliert und ist abhängig von der intrazellulären  $\text{HCO}_3^-$ -Verfügbarkeit. Dies wird durch die Aktivität einer Carboanhydrase sichergestellt (Milton & Weiner 1998). Ein solcher Prozess ist auch in den hier untersuchten Speicheldrüsen denkbar. Denn 5-HT-induzierte  $\text{pH}_i$ -Änderungen weisen sowohl eine  $\text{Cl}^-$ -Abhängigkeit als auch eine Abhängigkeit von der Carboanhydrase auf. Sie sind also ebenfalls abhängig von intrazellulärem  $\text{HCO}_3^-$ .

Berridge beschrieb bereits vor mehr als 30 Jahren dass Glutamat für die Aufrechterhaltung der Speichelsekretion von Bedeutung ist, weniger Glucose. Er postulierte, dass in den *Calliphora* Speicheldrüsen der Citratzyklus der vorherrschende energiegewinnende Prozess ist und nicht die Glykolyse (Berridge 1970, Rapp & Berridge 1981). Glutamat wird dabei zu  $\alpha$ -Ketoglutarat transaminiert und im Citratzyklus oxidiert (Haunerland 2005). In dem hier gewählten experimentellen Ansatz hat die Wegnahme von extrazellulärem Glutamat keinen Effekt auf die 5-HT-induzierte intrazelluläre Ansäuerung. In den Arbeiten von Berridge konnte allerdings auch erst nach einer 5-HT-Stimulation über mehr als 30 min ein Effekt von Glutamat beobachtet werden. Erst nach dieser Zeit nahm die Flüssigkeitssekretion, bedingt durch das Fehlen von extrazellulärem Glutamat, deutlich ab (Berridge 1970). Über eine solch lange Zeitspanne wurde hier jedoch nicht gemessen. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass intrazellulär noch genügend Glutamat vorhanden war. Die entscheidende Bedeutung die Glutamat in den *Calliphora* Speicheldrüsen zukommt, wurde jedoch bei der Untersuchung der  $\text{pH}_i$ -Regulation in der unstimulierten Drüse deutlich (siehe 4.1.1).

Der 5-HT-induzierte Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ist keine Voraussetzung für eine 5-HT-induzierte Ansäuerung, denn die 5-HT-induzierte Ansäuerung kann durch cAMP, das cAMP-Analogon 8-CPT-cAMP, den Adenylatzklyase-Aktivator Forskolin und den Phosphodiesterase-Blocker IBMX imitiert werden (Schewe 2005, Schewe et al. 2008). Folglich ist ein Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration notwendig und hinreichend um eine 5-HT-induzierte Ansäuerung auszulösen. Heslop & Berridge (1981) stellten jedoch fest, dass der 5-HT-induzierte Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration offenbar  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig reguliert werden kann. Bei einer Stimulierung mit 5-HT erfolgt zunächst ein schneller (innerhalb von ca. 25 s), aber nur transienter Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration. Diesem transienten Anstieg folgt ein zweiter langsamer und für die Dauer der 5-HT-Stimulierung anhaltender Anstieg der cAMP-Konzentration. Der transiente Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration ist unabhängig von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$ , denn er wurde auch in  $\text{Ca}^{2+}$ -freier Badlösung

beobachtet. Damit wird erklärbar, warum unter  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Bedingungen immer noch eine intrazelluläre Ansäuerung zu beobachten war. Der transiente Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration reicht offenbar aus, um eine intrazelluläre Ansäuerung hervorzurufen. In 50% der Messungen ging der  $\text{pH}_i$  jedoch noch während der 5-HT-Stimulierung auf den Ruhe- $\text{pH}_i$ -Wert zurück. Folglich ist der langsame anhaltende cAMP-Anstieg, der unter  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Bedingungen ausbleibt, notwendig um die intrazelluläre Ansäuerung aufrechtzuerhalten. Blockiert man die SERCA-Pumpe unter  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Bedingungen, ist sowohl die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem ER, als auch der  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx aus dem Extrazellularraum unterdrückt und man beobachtet bei Stimulierung der Drüsen mit 5-HT nur einen einzelnen  $\text{Ca}^{2+}$ -Spike (Zimmermann & Walz 1997). Unter diesen Bedingungen war die 5-HT-induzierte intrazelluläre Ansäuerung signifikant reduziert. Es erfolgt offenbar kein signifikanter Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration, der ausreichen würde, um eine intrazelluläre Ansäuerung hervorzurufen. Ein ähnlicher Ansatz wurde auch verwendet um die cAMP-abhängige Aktivierung der apikalen V-ATPase in den *Calliphora* Speicheldrüsen zu untersuchen. Es konnte gezeigt werden, dass bei einer Pufferung von intrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  mit BAPTA in  $\text{Ca}^{2+}$ -freier Badlösung, die Aktivierung der V-ATPase unterdrückt wird (Voss 2008). Diese Beobachtung war auf die Aktivität einer  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängigen Proteinphosphatase 2B (Calcineurin) zurückzuführen. Es ist davon auszugehen, dass bei einer 5-HT-Stimulierung der Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration benötigt wird, um die Adenylatzyklase durch eine Calcineurin-vermittelte Dephosphorylierung zu aktivieren. Wird der 5-HT-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg unterdrückt (Blockierung der SERCA-Pumpe unter  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Bedingungen) unterbleibt der 5-HT-induzierte Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration.

Im Widerspruch dazu stehen Experimente, in denen die Phospholipase C (PLC) mit U73122 blockiert wurde. Die PLC katalysiert die Umwandlung von  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  zu  $\text{IP}_3$  und 1,2-DAG (Berridge & Irvine 1984, Rebecchi & Pentylala 2000). Bei Hemmung der PLC erfolgt keine  $\text{IP}_3$ -Bildung und der 5-HT-induzierte Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration bleibt aus (Zimmermann & Walz 1999). Auch unter diesen Bedingungen sollte der 5-HT-induzierte Anstieg der cAMP-Konzentration reduziert und die 5-HT-induzierte Ansäuerung signifikant vermindert sein. Eine Blockierung der PLC hatte jedoch keinen statistisch signifikanten Effekt auf Betrag und Zeitverlauf der 5-HT-induzierten intrazellulären Ansäuerung, obgleich in 2 von 6 Messungen die 5-HT-induzierte Ansäuerung komplett unterdrückt war. Zum jetzigen Zeitpunkt, ist dieser Widerspruch nicht erklärbar, zeigt aber die komplexe Verknüpfung des  $\text{IP}_3/\text{Ca}^{2+}$ -Weges und des cAMP-Weges an. Die genaue Aufklärung dieser Interaktionen wäre über das Ziel dieser Arbeit hinausgegangen und muss in weiterführenden Arbeiten untersucht werden.

Der 5-HT-induzierte Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration erfolgt in komplexen räumlich-zeitlichen Mustern. Schwellennahe 5-HT-Konzentrationen (1 & 3 nM) induzieren intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen. Konzentrationen ab 10 nM 5-HT führen zu anfänglichen  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen. Diesen folgt ein tonischer Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, vermittelt über einen kapazitiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom aus dem Extrazellularraum (*store operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry*) (Zimmermann 1998). Dieser  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg kann sich in Form von Wellen über die gesamte Drüse ausbreiten. Stimulierung der Speicheldrüsen mit schwellennahen 5-HT-Konzentrationen führen auch zu Oszillationen des transepithelialen Potentials (TEP). Diese TEP-Oszillationen sind im Wesentlichen Ausdruck von  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Oszillationen des apikalen Membranpotentials (Prince & Berridge 1972). Folglich ist denkbar, dass auch apikal lokalisierte Transporter wie der putative  $n\text{H}^+/\text{K}^+$ -Antiporter rhythmisch beeinflusst werden und somit Oszillationen des  $\text{pH}_i$ -Wertes verursachen. Beispiele für dieses Phänomen liegen in der Literatur vor. In unstimulierten Zellen, wie Oligodendrocyten konnten  $\text{pH}_i$ -Mikrodömanen beobachtet werden (Ro & Carson 2004). Enterozyten der Maus zeigten  $\text{pH}_i$ -Gradienten (Stewart et al. 1999). Zudem konnten in Purkinje-Zellen der Ratte (Willoughby & Schwiening 2002), Nervenzellen der Schnecke (*Helix aspersa*) (Schwiening & Willoughby 2002, Pantazis et al. 2005) und Herzmuskelzellen von Ratten und Meerschweinchen, durch äußere Reize intrazellulär  $\text{pH}$ -Gradienten hervorgerufen werden (Swietach et al. 2005, Swietach & Vaughan-Jones 2005, Swietach et al. 2007). In der Gliazelllinie *C6* konnten  $\text{pH}$ -Oszillationen nachgewiesen werden (Sánchez-Armáss et al. 2006). Deshalb wurde untersucht, ob auch 5-HT-induzierte  $\text{pH}_i$ -Änderungen in charakteristischen räumlich-zeitlichen Mustern organisiert sind. In den hier untersuchten Speicheldrüsen konnten in keiner Messung intrazelluläre  $\text{pH}$ -Oszillationen oder interzelluläre  $\text{pH}$ -Wellen beobachtet werden.

### 4.3 5-HT-induzierter Sauerstoffverbrauch

Kausale Grundlage für die 5-HT-induzierte intrazelluläre Ansäuerung kann eine Aktivierung der zellulären Atmung sein. Das bei der Atmung frei werdende  $\text{CO}_2$  wird von der Carboanhydrase zu  $\text{H}_2\text{CO}_3$  hydratisiert, welche in  $\text{H}^+$  und  $\text{HCO}_3^-$  dissoziiert. Die durch 5-HT-Stimulierung anfallenden  $\text{H}^+$  können also aus der Zellatmung stammen. Diese Hypothese sollte an den Speicheldrüsen von *Calliphora vicina* überprüft werden. Eine 5-HT-induzierte Aktivierung des zellulären Metabolismus führt zu einem erhöhten  $\text{O}_2$ -Verbrauch der Zellen. Dies wurde durch direkte Messung der luminalen  $\text{O}_2$ -Konzentration nachgewiesen. Durch eine Kooperation mit dem Institut für Physikalische Chemie der Universität Potsdam war ich in der Lage  $\text{O}_2$ -empfindliche Nanopartikel einzusetzen. Als Grundlage für deren Verwendung dienten Nanopartikel,



die mit dem  $O_2$ -empfindlichen Fluoreszenzfarbstoff PtPFPP dotiert waren. Bei PtPFPP wird aus der Abklingzeit der Fluoreszenz (Phosphoreszenz) die Lebenszeit berechnet. Die Lebenszeit ist  $O_2$ -abhängig. Ein Anstieg der  $O_2$ -Konzentration äußert sich in einer Abnahme der Lebenszeit. Die Verwendung dieser Nanopartikel ist aus 2 Gründen eine elegante Methode um in einem lebenden Gewebe den  $O_2$ -Verbrauch zu messen. Zum einen ist es möglich den  $O_2$ -Verbrauch mit Licht nicht-invasiv zu messen. Zum anderen ist die aus der Lebenszeit berechnete  $O_2$ -Konzentration unabhängig von der Farbstoffkonzentration (Dr. Elmar Schmäzlin, persönliche Mitteilung).

Die Messungen zeigten, dass 5-HT als Folge des erhöhten  $O_2$ -Verbrauchs der Zellen im Drüsenlumen eine Abnahme der  $O_2$ -Konzentration induziert. Der erhöhte  $O_2$ -Verbrauch ist auf eine Aktivierung ATP-konsumierender Prozesse wie die Aktivität der apikalen V-ATPase, der SERCA-Pumpe, der  $Na^+/K^+$ -ATPase und der Sekretion von Proteinen in das Lumen der Speicheldrüse zurückzuführen. Auch die Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels benötigt ATP. Diese Vorgänge verstärken die ATP-Produktion in den Mitochondrien. Blockiert man pharmakologisch nur die V-ATPase ist deren Anteil an der 5-HT-induzierten Erhöhung des  $O_2$ -Verbrauchs nicht messbar, da er von anderen ATP-verbrauchenden Prozessen überlagert wird. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration ausreicht, um die 5-HT-induzierte Stimulierung des  $O_2$ -Verbrauchs zu imitieren. In diesem reduzierten System war dann auch der Anteil der V-ATPase am  $O_2$ -Verbrauch sichtbar. Daraus kann auch geschlossen werden, dass eine Erhöhung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration keine notwendige Voraussetzung zur Aktivierung der Zellatmung ist. Unterbleibt allerdings der 5-HT-induzierte Anstieg der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration (Thapsigargin unter  $Ca^{2+}$ -freien Bedingungen) war der 5-HT-induzierte  $O_2$ -Verbrauch signifikant vermindert. Auch bei  $pH_i$ -Messungen war die 5-HT-induzierte Ansäuerung unter diesen Bedingungen signifikant vermindert (s.o.).

Die Beobachtungen deuten auf eine komplexe Regulierung der mitochondrialen Atmung durch cAMP- und  $IP_3/Ca^{2+}$ -Weg hin. Es ist bekannt dass die oxidative Phosphorylierung sowohl durch cAMP (Sardanelli et al. 1996, Boneh 2006) als auch durch  $Ca^{2+}$  (Bianchi et al. 2004, Nguyen & Jafri 2005, Graier et al. 2007) reguliert wird. Die Aufklärung der Regulationsmechanismen der mitochondrialen Atmung in den *Calliphora* Speicheldrüsen waren nicht das unmittelbare Ziel dieser Arbeit. Es wurde jedoch gezeigt, dass eine Stimulierung der Speicheldrüsen mit 5-HT zu einem erhöhten  $O_2$ -Verbrauch der Zellen führt, was als kausale Grundlage für die 5-HT-induzierte Ansäuerung gesehen werden kann.

Zur Erklärung der 5-HT-induzierten Stimulierung des  $O_2$ -Verbrauchs und der 5-HT-induzierten intrazellulären pH-Änderungen schlage ich folgendes Modell vor

(Abb. 4.2). Stimulierung der Drüsen mit 5-HT führt zur Aktivierung des cAMP- und  $\text{IP}_3/\text{Ca}^{2+}$ -Weges. Bedingt durch einen erhöhten ATP-Bedarf der Zellen (V-ATPase, SERCA-Pumpe,  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, Sekretion von Proteinen, cAMP-Bildung) erfolgt eine verstärkte Aktivierung der mitochondrialen Atmung. Daraus resultierend wird intrazellulär  $\text{CO}_2$  gebildet. Dieses wird durch die Carboanhydrase hydratisiert und es wird intrazellulär  $\text{HCO}_3^-$  bereitgestellt. Bedingt durch den  $\text{K}^+$ -Transport über die apikale Membran in das Lumen der Speicheldrüsen wird ein basal lokalisierter NHE aktiviert. Dessen Aktivität ist an einen DIDS-insensitiven AE gekoppelt. AE erfordert  $\text{HCO}_3^-$ , welches durch die Carboanhydrase bereitgestellt wird. Hinzukommen  $\text{H}^+$ -bildende Prozesse, wie die ATP-Hydrolyse und Komponenten der mitochondrialen Atmungskette. In der Summe der Ereignisse kommt es intrazellulär zu einem  $\text{H}^+$ -Überschuss, was zu der beobachteten 5-HT-induzierten Ansäuerung führt. Nicht beurteilt werden kann im Moment der genaue Betrag des putativen  $n\text{K}^+/\text{H}^+$ -Antiporter. Dessen Aktivität ist experimentell noch nicht zugänglich und die Stöchiometrie des  $n\text{H}^+/\text{K}^+$ -Antiporters ist nicht bekannt.

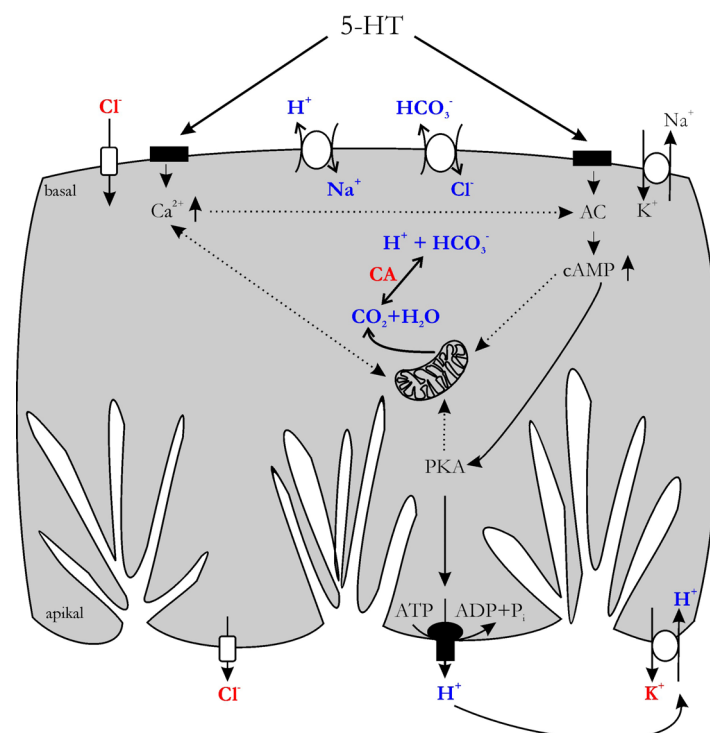


Abb. 4.2: Modell zu 5-HT-induzierten  $\text{pH}_i$ -Änderungen in den Speicheldrüsen von *Calliphora vicina*. Erläuterung siehe Text.

#### 4.4 Ausblick

Der Erkenntnisstand in Bezug auf die  $\text{pH}_i$ -Regulation in den Speicheldrüsen von *Calliphora vicina* konnte in dieser Arbeit entscheidend vorangebracht werden. Transporter die an der  $\text{pH}_i$ -Regulation in der unstimulierten Speicheldrüse und auch Transporter die an 5-HT-induzierten  $\text{pH}_i$ -Änderungen beteiligt sind, konnten mit Hilfe von  $\text{pH}_i$ -Messungen identifiziert werden. Für den  $\text{Na}^+$ -abhängigen

Glutamat-Transporter, den putativen  $n\text{H}^+/\text{K}^+$ -Antiporter, den NHE, die Carboanhydrase und die UE-C der V-ATPase gelang zudem der molekularbiologische Nachweis. Diese Sequenzinformationen können als Grundlage für weiterführende Arbeiten dienen. Eine Klonierung in voller Länge und das nachfolgende Einbringen in ein geeignetes Expressionssystem, z.B. *HEK*-Zellen oder *Xenopus* Oocyten ermöglichen eine genaue Charakterisierung der Transporter. Es kann die genaue Stöchiometrie der transportierten Ionen untersucht und Hemmstoffe selektiert werden. Zudem können Komponenten, die zur Regulierung der jeweiligen Transporter beitragen, charakterisiert werden. So können bspw. Phosphorylierungsstellen bestimmt werden. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die weiterführende Untersuchung zu  $\text{HCO}_3^-$ -Transportern in den *Calliphora* Speicheldrüsen. Das Problem liegt vor allem in der großen Diversität dieser Transporterfamilie. So konnte zwar gezeigt werden, dass  $\text{HCO}_3^-$ -abhängige Transporter an der  $\text{pH}_i$ -Regulation beteiligt sind, dennoch gelang der molekularbiologische Nachweis nicht. Die vollständige Klärung dieses Problems hätte das Ziel dieser Arbeit überschritten und muss weiterführenden Arbeiten vorbehalten bleiben. Zusammenfassend lieferte diese Arbeit einen Überblick über die vorherrschenden  $\text{pH}_i$ -regulierenden Mechanismen in den *Calliphora* Speicheldrüsen. Weiterführende Projekte müssen nun die molekularen Grundlagen zum Zusammenspiel dieser Mechanismen untersuchen.

## 5 Literaturverzeichnis

AHARONOVITZ, O., ZAUN, H.C., BALLA, T., YORK, J.D., ORLOWSKI, J., GRINSTEIN, S. (2000). Intracellular pH regulation by Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange requires phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J Cell Biol.* **150**, 213-224.

AHMED, K. H., PELSTER, B., KRUMSCHNABEL, G. (2006). Signalling pathways involved in hypertonicity- and acidification-induced activation of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange in trout hepatocytes. *J Exp.Biol.* **209**, 3101-3113.

AKIBA, Y., FURUKAWA, O., GUTH, P.H., ENGEL, E., NASTASKIN, I., SASSANI, P., DUKKIPATIS, R., PUSHKIN, A., KURTZ, I., KAUNITZ, J.D. (2001). Cellular bicarbonate protects rat duodenal mucosa from acid-induced injury. *J Clin.Invest* **108**, 1807-1816.

BENSON, B.B., KRAUSE, D. (1980). The concentration and isotopic fractionation of gases dissolved in freshwater in equilibrium with the atmosphere. 1.Oxygen. *Limnol. Oceanogr.* **25**, 662-671.

BERGER, U. V., HEDIGER, M. A. (2006). Distribution of the glutamate transporters GLT-1 (SLC1A2) and GLAST (SLC1A3) in peripheral organs. *Anat.Embryol.(Berl)* **211**, 595-606.

BERRIDGE, M. J. (1970). The role of 5-hydroxytryptamine and cyclic AMP in the control of fluid secretion by isolated salivary glands. *J Exp.Biol.* **53**, 171-186.

BERRIDGE, M. J., LINDLEY, B. D., PRINCE, W. T. (1975). Membrane permeability changes during stimulation of isolated salivary glands of *Calliphora* by 5-hydroxytryptamine. *J.Physiol.* **244**, 549-567.

BERRIDGE, M. J., LINDLEY, B. D., PRINCE, W. T. (1976). Studies on the mechanism of fluid secretion by isolated salivary glands of *Calliphora*. *J Exp.Biol.* **64**, 311-322.

BERRIDGE, M. J. (1981). Electrophysiological evidence for the existence of separate receptor mechanisms mediating the action of 5-hydroxytryptamine. *Mol.Cell Endocrinol.* **23**, 91-104.

BERRIDGE, M. J., IRVINE, R. F. (1984). Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature* **312**, 315-321.

BERTRAM, G., WESSING, A. (1994). Intracellular pH regulation by the plasma membrane V-ATPase in malpighian tubules of *Drosophila* larvae. *J Comp Physiol B* **164**, 238-246.

BESSON, M. T., SOUSTELLE, L., BIRMAN, S. (1999). Identification and structural characterization of two genes encoding glutamate transporter homologues differently expressed in the nervous system of *Drosophila melanogaster*. *FEBS Lett.* **443**, 97-104.

BESSON, M. T., SOUSTELLE, L., BIRMAN, S. (2000). Selective high-affinity transport of aspartate by a *Drosophila* homologue of the excitatory amino-acid transporters. *Curr.Biol.* **10**, 207-210.

BEYENBACH, K. W., WIECZOREK, H. (2006). The V-type H<sup>+</sup> ATPase: molecular structure and function, physiological roles and regulation. *J Exp.Biol.* **209**, 577-589.

BIANCHI, K., RIMESSI, A., PRANDINI, A., SZABADKAI, G., RIZZUTO, R. (2004). Calcium and mitochondria: mechanisms and functions of a troubled relationship. *Biochim.Biophys.Acta* **1742**, 119-131.

BIANCHINI, L., POUSSEGUR, J. (1994). Molecular structure and regulation of vertebrate Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchangers. *J Exp.Biol.* **196**, 337-345.

BONEH, A. (2006). Regulation of mitochondrial oxidative phosphorylation by second messenger-mediated signal transduction mechanisms. *Cell Mol.Life Sci.* **63**, 1236-1248.

BORON, W. F. (1983). Transport of H<sup>+</sup> and of ionic weak acids and bases. *J Membr.Biol.* **72**, 1-16.

BORON, W. F. (1986). Intracellular pH regulation in epithelial cells. *Annu.Rev.Physiol* **48**, 377-388.

BORON, W. F. (2001). Sodium-coupled bicarbonate transporters. *JOP.Journal of Pancreas* **2**, 176-181.

BORON, W. F. (2004). Regulation of intracellular pH. *Adv Physiol Educ* **28**, 160-179.

BRETON, S. (2001). The Cellular physiology of carbonic anhydrases. *JOP. Journal of Pancreas* **2**, 159-164.

BRETT, C. L., DONOWITZ, M., RAO, R. (2005). Evolutionary origins of eukaryotic sodium/proton exchangers. *Am J Physiol Cell Physiol* **288**, C223-C239.

BRIDGES, R. J., ESSLINGER, C. S. (2005). The excitatory amino acid transporters: pharmacological insights on substrate and inhibitor specificity of the EAAT subtypes. *Pharmacol. Ther.* **107**, 271-285.

CASTAGNA, M., SHAYAKUL, C., TROTTI, D., SACCHI, V.F., HARVEY, W.R., HEDIGER, M.A. (1997). Molecular characteristics of mammalian and insect amino acid transporters: implications for amino acid homeostasis. *J Exp. Biol.* **200**, 269-286.

CHANG, A.B., LIN, R., KEITH STUDLEY, W., TRAN, C.V., SAIER, M.H. JR. (2004). Phylogeny as a guide to structure and function of membrane transport proteins. *Mol. Membr. Biol.* **21**, 171-181.

CHATURAPANICH, G., ISHIBASHI, H., DINUDOM, A., YOUNG, J.A., COOK, D.I. (1997). H<sup>+</sup> transport in the main excretory duct of the mouse mandibular salivary gland. *Journal of Physiology* **503.3**, 583-598.

DAMES, P., ZIMMERMANN, B., SCHMIDT, R., REIN, J., VOSS, M., SCHEWE, B., WALZ, B., BAUMANN, O. (2006). cAMP regulates plasma membrane vacuolar-type H<sup>+</sup>-ATPase assembly and activity in blowfly salivary glands. *PNAS* **103**, 3926-3931.

DAUGIRDAS, J.T., ARRIETA, J., YE, M., FLORES, G., BATTLE, D.C. (1995). Intracellular acidification associated with changes in free cytosolic calcium. *J. Clin. Invest.* **95**, 1480-1489.

DECOURSEY, T. E. (2003). Voltage-gated proton channels and other proton transfer pathways. *Physiological Reviews* **83**, 475-579.

DEITMER, J. W. (1991). Electrogenic sodium-dependent bicarbonate secretion by glial cells of the leech central nervous system. *J. Gen. Physiol.* **98**, 637-655.

DEITMER, J. W., SCHNEIDER, H. P. (1997). Intracellular acidification of the leech giant cell evoked by glutamate and aspartate. *Glia* **19**, 111-122.

- DEITMER, J. W. AND SCHNEIDER, H. P. (1998). Acid/base transport across leech giant glial cell membrane at low external bicarbonate concentration. *Journal of Physiology* **512.2**, 459-469.
- DEITMER, J.W., SCHILD, D. (2000).  $\text{Ca}^{2+}$  und pH: Ionenmessungen in Zellen und Geweben. *Spektrum Akademischer Verlag Gustav Fischer* 1.Auflage, Berlin.
- DONLY, C., RICHMAN, A., HAWKINS, E., MCLEAN, H., CAVENEY, S. (1997). Molecular cloning and functional expression of an insect high-affinity  $\text{Na}^+$ -dependent glutamate transporter. *Eur.J Biochem.* **248(2)**, 535-542.
- DONLY, C., JEVNIKAR, J., MCLEAN, H., CAVENEY, S. (2000). Substrate-stereoselectivity of a high-affinity glutamate transporter cloned from the CNS of the cockroach *Diploptera punctata*. *Insect Biochem.Mol.Biol.* **30**, 369-376.
- DOW, J.A., MADDRELL, S.H., GÖRTZ, A., SKAER, N.J., BROGAN, S., KAISER, K. (1994). The malpighian tubules of *Drosophila melanogaster*: a novel phenotype for studies of fluid secretion and its control. *J Exp.Biol.* **197**, 421-428.
- DRÖSE, S., ALTENDORF, K. (1997). Bafilomycins and concanamycins as inhibitors of V-ATPases and P-ATPases. *J Exp.Biol.* **200**, 1-8.
- FAIN, J. N., BERRIDGE, M. J. (1979 a). Relationship between hormonal activation of phosphatidylinositol hydrolysis, fluid secretion and calcium flux in the blowfly salivary gland. *Biochem.J.* **178**, 45-58.
- FAIN, J. N., BERRIDGE, M. J. (1979 b). Relationship between phosphatidylinositol synthesis and recovery of 5-hydroxytryptamine-responsive  $\text{Ca}^{2+}$  flux in blowfly salivary glands. *Biochem.J* **180**, 655-661.
- FECHNER, L. (2008). Einfluss des cAMP-Signalwegs auf das zeitliche und räumliche Muster der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale in den Speicheldrüsen von *Calliphora vicina*.. Diplomarbeit.
- FERNÁNDEZ, R., BOSQUEIRO, J.R., CASSOLA, A.C., MALNIC, G. (1997). Role of  $\text{Cl}^-$  in electrogenic  $\text{H}^+$  secretion by cortical distal tubule. *J Membr.Biol.* **157**, 193-201.
- FLIEGEL, L., FROHLICH, O. (1993). The  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger: an update on structure, regulation and cardiac physiology. *Biochem.J* **296 (Pt2)**, 273-285.

GEGELASHVILI, M., RODRIGUEZ-KERN, A., PIROZHKOVA, I., ZHANG, J., SUNG, L., GEGELASHVILI, G. (2006). High-affinity glutamate transporter GLAST/EAAT1 regulates cell surface expression of glutamine/neutral amino acid transporter ASCT2 in human fetal astrocytes. *Neurochem.Int.* **48**, 611-615.

GIANNAKOU, M. E., DOW, J. A. T. (2001). Characterization of the *Drosophila melanogaster* alkali-metal/proton-exchanger (NHE) gene family. *J Exp.Biol.* **204**, 3703-3716.

GRAIER, W. F., FRIEDEN, M., MALLI, R. (2007). Mitochondria and Ca<sup>2+</sup> signaling: old guests, new functions. *Pflugers Arch.* **455**, 375-396.

GRANGER, D., MARSOLAIS, M., BURRY, J., LAPRADE, R. (2002). V-type H<sup>+</sup>-ATPase in the human eccrine sweat duct: immunolocalization and functional demonstration. *Am J Physiol Cell Physiol* **282**, C1454-C1460.

GRANGER, D., MARSOLAIS, M., BURRY, J., LAPRADE, R. (2003). Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchangers in the human eccrine sweat duct. *Am J Physiol Cell Physiol* **285**, C1407-C1058.

GRINSTEIN, S., WIECZOREK, H. (1994). Cation antiports of animal plasma membranes. *J Exp.Biol.* **196**, 307-318.

HARRISON, J. F. (2001). Insect acid-base physiology. *Annu.Rev.Entomol.* **46**, 221-250.

HART, S. J., KNEZETIC, J. A., PETZEL, D. H. (2002). Cloning and tissue distribution of two Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchangers from the Malpighian tubules of *Aedes aegypti*. *Arch.Insect Biochem.Physiol* **51**, 121-135.

HAUNERLAND, N. H. (2005) Invertebrate Metabolism. in *Encyclopedia of Life Sciences*, 1-5.

HAYASHI, M. (2001). Phosphorylation of a new member of the bicarbonate cotransporter superfamily. *Kidney Int.* **60**, 462-465.

HEGYI, P., RAKONCZAY, Z., GRAY, M.A., ARGENT, B.E. (2004). Measurements of intracellular pH in Pancreatic Duct Cells. *Pancreas* **28**, 427-434.



- HESLOP, J. P., BERRIDGE, M. J. (1980). Changes in cyclic AMP and cyclic GMP concentrations during the action of 5-hydroxytryptamine on an insect salivary gland. *Biochem.J.* **192**, 247-255.
- HEWETT-EMMETT, D., TASHIAN, R. E. (1996). Functional diversity, conservation, and convergence in the evolution of the alpha-, beta-, and gamma-carbonic anhydrase gene families. *Mol.Phylogenet.Evol.* **5**, 50-77.
- HILLE, C. (2006). Charakterisierung von Transportmechanismen in der Speicheldrüse der Schabe *Periplaneta americana*. Dissertation
- HILLE, C. AND WALZ, B. (2007). A vacuolar-type H<sup>+</sup>-ATPase and a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger contribute to intracellular pH regulation in cockroach salivary ducts. *J Exp.Biol.* **210**, 1463-1471.
- HOGAN, E. M., COHEN, M. A., BORON, W. F. (1995). K<sup>+</sup>- and HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-dependent acid-base transport in squid giant axons I. Base efflux. *J.Gen.Physiol.* **106**, 821-844.
- HOUSE, C. R., GINGSBORG, B. L. (1985). Salivary gland. *Pergamon Press* **11**, 196-224.
- HUSS, M., INGENHORST, G., KÖNIG, S., GASSEL, M., DRÖSE, S., ZEECK, A., ALTENDORF, K., WIECZOREK, H. (2002). Concanamycin A, the specific inhibitor of V-ATPases, binds to the V<sub>0</sub> Subunit c. *The Journal of Biological Chemistry* **277**, 40544-40548.
- IANOWSKI, J. P., CHRISTENSEN, R. J., O'DONELL, M. J. (2002). Intracellular ion activities in Malpighian tubule cells of *Rhodnius prolixus*: evaluation of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> cotransport across the basolateral membrane. *J Exp.Biol.* **205**, 1645-1655.
- IANOWSKI, J. P., O'DONNELL, M. J. (2006). Electrochemical gradients for Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> and H<sup>+</sup> across the apical membrane in Malpighian (renal) tubule cells of *Rhodnius prolixus*. *J Exp.Biol.* **209**, 1964-1975.
- ILUNDAIN, A. (1992). Intracellular pH regulation in intestinal and renal epithelial cells. *Comp Biochem.Physiol Comp Physiol* **101**, 413-424.
- IRVINE, R.F., BERRIDGE, M.J., LETCHER, A.J., DAWSON, R.M. (1982). Phosphatidylinositol-hydrolysing enzymes in the blowfly salivary glands. *Biochem.J.* **204**, 361-364.

ISHIGURO, H., STEWARD, M.C., WILSON, R.W., CASE, R.M. (1996). Bicarbonate secretion in interlobular ducts from guinea-pig pancreas. *J Physiol* **495** (Pt1), 179-191.

KANAI, Y., HEDIGER, M. A. (1992). Primary structure and functional characterization of a high-affinity glutamate transporter. *Nature* **360**, 467-471.

KANAI, Y. (1997). Family of neutral and acidic amino acid transporters: molecular biology, physiology and medical implications. *Curr.Opin.Cell Biol.* **9**, 565-572.

KANAI, Y., HEDIGER, M. A. (2004). The glutamate/neutral amino acid transporter family SLC1: molecular, physiological and pharmacological aspects. *Pflugers Arch.* **447**, 469-479.

KAWANO, T., TAKUWA, K., KUNIYOSHI, H., JUNI, N., NAKAJIMA, T., YAMAMOTO, D., KIMURA, Y. (1999). Cloning and characterization of a *Drosophila melanogaster* cDNA encoding a glutamate transporter. *Biosci.Biotechnol.Biochem.* **63**, 2042-2044.

KLEYMAN, T. R., CRAGOE, E. J., JR. (1988). Amiloride and its analogs as tools in the study of ion transport. *J Membr.Biol.* **105**, 1-21.

KOSAKAI, K., YOSHINO, M. (2001). A Na<sup>+</sup>-dependent electrogenic glutamate transporter current in voltage-clamped cells of corpora allata in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *J Comp Physiol [B]* **171**, 303-312.

KUCHARSKI, R., BALL, E.E., HAYWARD, D.C., MALESZKA, R. (2000). Molecular cloning and expression analysis of a cDNA encoding a glutamate transporter in the honeybee brain. *Gene* **242**, 399-405.

LEEM, C. H., VAUGHAN-JONES, R. D. (1998). Sarcolemmal mechanisms for p*H*<sub>i</sub> recovery from alkalosis in the guinea-pig ventricular myocyte. *The Journal of Physiology* **509**, 487-496.

LEPIER, A., AZUMA, M., HARVEY, W.R., WIECZOREK, H. (1994). K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport in the tobacco hornworm midgut: the K<sup>+</sup>-transporting component of the K<sup>+</sup> pump. *J Exp.Biol.* **196**, 361-373.

LEVIEL, F., BORENSZTEIN, P., HOUILLIER, P., PAILLARD, M., BICHARA, M. (1992). Electroneutral K<sup>+</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> cotransport in cells of medullary thick ascending limb of rat kidney. *J Clin.Invest* **90**, 869-878.

- LI, X., ALVAREZ, B., CASEY, J.R., REITHMEIER, R.A., FLIEGEL, L. (2002). Carbonic anhydrase II binds to and enhances activity of the  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger. *J Biol.Chem.* **277**, 36085-36091.
- LI, X., LIU, Y., ALVAREZ, B.V., CASEY, J.R., FLIEGEL, L. (2006). A novel carbonic anhydrase II binding site regulates NHE1 activity. *Biochemistry* **45**, 2414-2424.
- LUO, X., CHOI, J.Y., KO, S.B., PUSHKIN, A., KURTZ, I., AHN, W., LEE, M.G., MUALLEM, S. (2001).  $\text{HCO}_3^-$  salvage mechanisms in the submandibular gland acinar and duct cells. *J Biol.Chem.* **276**, 9808-9816.
- MADSHUS, I. (1988). Regulation of intracellular pH in eukaryotic cells. *Biochem J* **250**, 1-8.
- MALNIC, G., GEIBEL, J. P. (2000). Cell pH and  $\text{H}^+$  secretion by S3 segment of mammalian kidney: role of  $\text{H}^+$ -ATPase and  $\text{Cl}^-$ . *J Membr.Biol.* **178**, 115-125.
- MALO, M. E., FLIEGEL, L. (2006). Physiological role and regulation of the  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger. *Can.J Physiol Pharmacol.* **84**, 1081-1095.
- MARCAGGI, P., THWAITES, D.T., DEITMER, J.W., COLES, J.A. (1999). Chloride-dependent transport of  $\text{NH}_4^+$  into bee retinal glial cells. *European Journal of Neurosciences* **11**, 167-177.
- MARCAGGI, P., COLES, J. A. (2000). A  $\text{Cl}^-$  transporter selective for  $\text{NH}_4^+$  over  $\text{K}^+$  in glial cells of bee retina. *J.Gen.Physiol.* **116**, 125-141.
- MCLEAN, H., CAVENEY, S. (1993).  $\text{Na}^+$ -dependent medium-affinity uptake of L-glutamate in the insect epidermis. *J Comp Physiol [B]* **163**, 297-306. 1993.
- MELVIN, J.E., YULE, D., SHUTTLEWORTH, T., BEGENISICH, T. (2005). Regulation of fluid and electrolyte secretion in salivary gland acinar cells. *Annu.Rev.Physiol.* **67**, 445-469.
- MILTON, A. E., WEINER, I. D. (1998). Regulation of B-type intercalated cell apical anion exchange activity by  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ . *Am J Physiol* **274**, F1086-F1094.

MURER, H., HOPFER, U., KINNE, R. (1976). Sodium/proton antiport in brush-border-membrane vesicles isolated from rat small intestine and kidney. *Biochem.J* **154**(3), 597-604.

NAUNTOFTE, B. (1992). Regulation of electrolyte and fluid secretion in salivary acinar cells. *Am J Physiol* **263**, G823-G837.

NGUYEN, M. H., JAFRI, M. S. (2005). Mitochondrial calcium signaling and energy metabolism. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **1047**, 127-137.

NICOLA, P.A., TAYLOR, C.J., WANG, S., BARRAND, M.A., HLADKY, S.B. (2008). Transport activities involved in intracellular pH recovery following acid and alkali challenges in rat brain microvascular endothelial cells. *Pflugers Arch* **456**(5), 801-812.

NISHIMORI, I., VULLO, D., INNOCENTI, A., SCOZZAFAVA, A., MASTROLORENZO, A., SUPURAN, C.T. (2005). Carbonic anhydrase inhibitors: Inhibition of the transmembrane isozyme XIV with sulfonamides. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **15**, 3828-3833.

ORLOWSKI, J., GRINSTEIN, S. (1997). Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchangers of mammalian cells. *J Biol.Chem.* **272**, 22373-22376.

ORLOWSKI, J., GRINSTEIN, S. (2004). Diversity of the mammalian sodium/proton exchanger SLC9 gene family. *Pflugers Arch.* **447**, 549-565.

OSCHMAN, J. L., BERRIDGE, M. J. (1970). Structural and functional aspects of salivary fluid secretion in *Calliphora*. *Tissue & Cell* **2**, 281-310.

PANTAZIS, A., KEEGAN, P., POSTMA, M., SCHWIENING, C.J. (2005). The effect of neuronal morphology and membrane-permeant weak acid and base on the dissipation of depolarization-induced pH gradients in snail neurones. *Pflügers Arch - Eur J Physiol* 1-13.

PETZEL, D.H. (2000). Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange in mosquito Malpighian tubules. *Am J Physiol Regulatory Integrative Com Physiol* **279**, R1996-R2003.

PIERMARINI, P. M., CHOI, I., BORON, W. F. (2007). Cloning and characterization of an electrogenic Na<sup>+</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> cotransporter from the squid giant fiber lobe. *Am J Physiol Cell Physiol* **292**, C2032-C2045.

PINES G, DANBOLT NC, BJØRÅS M, ZHANG Y, BENDAHAN A, EIDE L, KOEPSSELL H, STORM-MATHISEN J, SEEBERG E, KANNER BI. (1992). Cloning and expression of a rat brain L-glutamate transporter. *Nature* **360(6403)**, 464-467.

PRINCE, W. T., BERRIDGE, M. J. (1972). The effects of 5-hydroxytryptamine and cyclic AMP on the potential profile across isolated salivary glands. *J Exp.Biol.* **56**, 323-333.

PRINCE, W. T., BERRIDGE, M. J., RASMUSSEN, H. (1972). Role of Calcium and Adenosine-3'5'-cyclic monophosphate in controlling fly salivary gland secretion. *Proc.Natl.Acad.Sci.* **69**, 553-557.

PULLIKUTH, A. K., FILIPPOV, V., GILL, S. S. (2003). Phylogeny and cloning of ion transporters in mosquitoes. *J Exp.Biol.* **206**, 3857-3868.

PULLIKUTH, A.K., AIMANOVA, K., KANGETHE, W., SANDERS, H.R., GILL, S.S. (2006). Molecular characterization of sodium/proton exchanger 3 (NHE3) from the yellow fever vector, *Aedes aegypti*. *J Exp.Biol.* **209**, 3529-3544.

PUSHKIN, A. AND KURTZ, I. (2006). SLC4 base ( $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ) transporters: classification, function, structure, genetic diseases, and knockout models. *Am J Physiol Renal Physiol* **290**, F580-F599.

PUTNAM, R. W. (2001). Intracellular pH Regulation. In: Cell Physiology Sourcebook: A Molecular Approach, Third Edition. *Academic Press*, 357-376.

RAMIREZ, M., FERNANDEZ, R., MALNIC, G. (1999). Permeation of  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$  and cell pH in colonic crypts of the rat. *Pflugers Arch.* **438**, 508-515.

RAPP, P. E., BERRIDGE, M. J. (1981). The control of transepithelial potential oscillations in the salivary gland of *Calliphora erythrocephala*. *J Exp.Biol.* **93**, 119-132.

REBECCHI, M. J., PENTYALA, S. N. (2000). Structure, function, and control of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Physiol Rev.* **80**, 1291-1335.

REIN, J., ZIMMERMANN, B., HILLE, C., LANG, I., WALZ, B., BAUMANN, O. (2006). Fluorescence measurements of serotonin-induced V-ATPase-dependent pH changes at the luminal surface in salivary glands of the blowfly *Calliphora vicina*. *J Exp.Biol.* **209**, 1716-1724.

REIN, J., VOSS, M., BLENAU, W., WALZ, B., BAUMANN, O. (2008). Hormone-induced assembly and activation of V-ATPase in blowfly salivary glands is mediated by protein kinase A. *Am J Physiol Cell Physiol* **294**, C56-C65.

RHEAULT, M.R., OKECH, B.A., KEEN, S.B., MILLER, M.M., MELESHKEVITCH, E.A., LINSER, P.J., BOUDKO, D.Y., HARVEY, W.R. (2007). Molecular cloning, phylogeny and localization of AgNHA1: the first Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter (NHA) from a metazoan, *Anopheles gambiae*. *J Exp.Biol.* **210**, 3848-3861.

RINK, T. J., TSIEN, R. Y., POZZAN, T. (1982). Cytoplasmic pH and free Mg<sup>2+</sup> in lymphocytes. *The Journal of Cell Biology* **95**, 189-196.

RO, H., CARSON, J. H. (2004). pH microdomains in Oligodendrocytes. *The Journal of Biological Chemistry* **279**, 37115-37123.

ROBINSON, M. B. (1998). The family of sodium-dependent glutamate transporters: a focus on the GLT-1/EAAT2 subtype. *Neurochem.Int.* **33**, 479-491.

ROMERO, M.F., HENRY, D., NELSON, S., HARTE, P.J., DILLON, A.K., SCIORTINO, C.M. (2000). Cloning and characterization of a Na<sup>+</sup>-driven anion exchanger (NDAE1). *The Journal of Biological Chemistry* **275**, 24552-24559.

ROMERO, M. F., FULTON, C. M., BORON, W. F. (2004). The SLC4 family of HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> transporters. *Pflügers Arch - Eur J Physiol* **447**, 495-509.

ROOS, A., BORON, W. F. (1981). Intracellular pH. *Physiological Reviews* **61**, 296-421.

ROTTE, C. (2006). Morphologische und funktionelle Charakterisierung des thorakalen Anteils der Speicheldrüsen von *Calliphora vicina*. Diplomarbeit.

ROTTE, C., WALZ, B., BAUMANN, O. (2008). Morphological and functional characterization of the thoracic portion of blowfly salivary glands. *Arthropod Structure & Development* **37**, 372-382.

SÁNCHEZ-ARMÁSS S, SENNOUNE SR, MAITI D, ORTEGA F, MARTÍNEZ-ZAGUILÁN R. (2006). Spectral imaging microscopy demonstrates cytoplasmic pH oscillations in glial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **290(2)**, C524-38.

SARDANELLI, A.M., TECHNIKOVA-DOBROVA, Z., SPERANZA, F., MAZZOCCA, A., SCACCO, S., PAPA, S. (1996). Topology of the mitochondrial cAMP-dependent protein kinase and its substrates. *FEBS Lett.* **396**, 276-278.

SCHEWE, B. (2005). Charakterisierung Serotonin-induzierter pH-Änderungen in den Speicheldrüsen von *Calliphora vicina*. Diplomarbeit.

SCHEWE, B., SCHMAELZLIN, E., WALZ, B. (2008). Intracellular pH homeostasis and serotonin-induced pH changes in *Calliphora* salivary glands: the contribution of V-ATPase and carbonic anhydrase. *J Exp.Biol.* **211**, 805-815.

SCHMÄLZLIN, E., VAN DONGEN J.T., KLIMANT, I., MARMODÉE, B., STEUP, M., FISAHN, J., GEIGENBERGER, P., LÖHMANNSRÖBEN, HG. (2005). An optical multifrequency phase-modulation method using microbeads for measuring intracellular oxygen concentrations in plants. *Biophys.J* **89**, 1339-1345.

SCHMÄLZLIN, E., WALZ, B., KLIMANT, I., SCHEWE, B., LÖHMANNSRÖBEN, H.-G. (2006). Monitoring hormone-induced oxygen consumption in the salivary glands of the blowfly, *Calliphora vicina*, by use of luminescent microbeads. *Sensors and Actuators B* **119**, 251-254.

SCHMIDT, R. (2006). Signalwege und Steurmechanismen in den Speicheldrüsen von Dipteren. Dissertation.

SCHMIDT, R., BAUMANN, O., WALZ, B. (2008). cAMP potentiates InsP<sub>3</sub>-induced Ca<sup>2+</sup> release from the endoplasmic reticulum in blowfly salivary glands. *BMC.Physiol* **8**, 10.

SCHWIENING, C. J., THOMAS, R. C. (1992). Mechanism of pH<sub>i</sub> regulation by locust neurones in isolated ganglia: a microelectrode study. *Journal of Physiology* **447**, 693-709.

SCHWIENING, C. J., WILLOUGHBY, D. (2002). Depolarization-induced pH microdomains and their relationship to calcium transients in isolated snail neurones. *Journal of Physiology* **538.2**, 371-382.

SCIORTINO, C.M., SHRODE, L.D., FLETCHER, B.R., HARTE, P.J., ROMERO, M.F. (2001). Localization of endogenous and recombinant Na<sup>+</sup>-driven anion exchanger protein NDAE1 from *Drosophila melanogaster*. *Am J Physiol Cell Physiol* **281**, 449-463.

SEKI, G., FRÖMTER, E. (1992). Acetazolamide inhibition of basolateral base exit in rabbit renal proximal tubule S2 segment. *Pflügers Arch.* **422**, 60-65.

SHANBHAG, S., TRIPATHI, S. (2005). Electrogenic H<sup>+</sup> transport and pH gradients generated by a V-H<sup>+</sup>-ATPase in the isolated perfused larval *Drosophila* midgut. *J.Membrane Biol.* **206**, 61-72.

SHIGERI, Y., SEAL, R. P., SHIMAMOTO, K. (2004). Molecular pharmacology of glutamate transporters, EAATs and VGLUTs. *Brain Res.Brain Res.Rev.* **45**, 250-265.

SKAER, H. B., BERRIDGE, M. J., LEE, W. M. (1975). A freeze-fracture study of adult *Calliphora* salivary glands. *Tissue & Cell* **7**, 677-688.

STERLING, D., REITHMEIER, R. A. F., CASEY, J. R. (2001). A Transport Metabolon. *The Journal of Biological Chemistry* **276**, 47886-47894.

STERLING, D., CASEY, J. R. (2002). Bicarbonate transport proteins. *Biochem.Cell Biol.* **80**, 483-497.

STEWART, A. K., BOYD, C. A., VAUGHAN-JONES, R. D. (1999). A novel role for carbonic anhydrase: cytoplasmic pH gradient dissipation in mouse small intestinal enterocytes. *Journal of Physiology* **516.1**, 209-217.

STONE, D.K., SELDIN, D.W., KOKKO, J.P., JACOBSON, H.R. (1983). Anion dependence of rabbit medullary collecting duct acidification. *J Clin.Invest* **71**, 1505-1508.

STORCK, T., SCHULTE, S., HOFMANN, K., STOFFEL, W. (1992). Structure, expression, and functional analysis of a Na<sup>+</sup>-dependent glutamate/aspartate transporter from rat brain. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **89**, 10955-10959.

STRAZZABOSCO, M., BOYER, J. L. (1996). Regulation of intracellular pH in the hepatocyte. Mechanisms and physiological implications. *J Hepatol.* **24**, 631-644.

SUPURAN, C. T., SCOZZAFAVA, A., CASINI, A. (2003). Carbonic anhydrase inhibitors. *Medicinal Research Reviews* **23**, 146-189.

SWIETACH, P., LEEM, C.H., SPITZER, K.W., VAUGHAN-JONES, R.D. (2005). Experimental generation and computational modeling of intracellular pH gradients in cardiac myocytes. *Biophysical Journal* **88**, 3018-3037.



SWIETACH, P., VAUGHAN-JONES, R. D. (2005). Spatial Regulation of intracellular pH in the ventricular myocyte. *Ann.N.Y.Acad.Scie* **1047**, 271-282.

SWIETACH, P., ROSSINI, A., SPITZER, K.W., VAUGHAN-JONES, R.D. (2007). H<sup>+</sup> ion activation and inactivation of the ventricular gap junction: a basis for spatial regulation of intracellular pH. *Circ.Res.* **100**, 1045-1054.

THOMAS, J.A., BUCHSBAUM, R.N., ZIMNIAK, A., RACKER, E. (1979). Intracellular pH measurements in ehrlich ascites tumor cells utilizing spectroscopic probes generated *in situ*. *Biochemistry* **18**, 2210-2218.

TRIPP, B. C., SMITH, K., FERRY, J. G. (2001). Carbonic anhydrase: New insights for an ancient enzyme. *The Journal of Biological Chemistry* **276**, 48615-48618.

TSACOPOULOS, M., POITRY-YAMATE, C. L., POITRY, S. (1997). Ammonium and glutamate released by neurons are signals regulating the nutritive function of a glial cell. *J Neurosci.* **17**, 2383-2390.

TSUCHIMOTO, M., AOKI, M., TAKADA, M., KANOU, Y., SASAGAWA, H., KITAGAWA, Y., KADOWAKI, T. (2004). The changes of gene expression in honeybee (*Apis mellifera*) brains associated with ages. *Zoolog.Sci.* **21**, 23-28.

TSUCHIYA, Y., HAYASHI, H., SUZUKI, Y. (2001). Na<sup>+</sup>-dependent recovery of intracellular pH from acid loading in mouse colonic crypt cells. *Tohoku J.Exp.Med.* **193**, 1-11.

TSUGANEZAWA, H., KOBAYASHI, K., IYORI, M., ARAKI, T., KOIZUMI, A., WATANABE, S., KANEKO, A., FUKAO, T., MONKAWA, T., YOSHIDA, T., KIM, D.K., KANAI, Y., ENDOU, H., HAYASHI, M., SARUTA, T. (2001). A new member of the HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> transporter superfamily is an apical anion exchanger of beta-intercalated cells in the kidney. *J Biol.Chem.* **276**, 8180-8189.

TURNER, R. J., SUGIYA, H. (2002). Understanding salivary fluid and protein secretion. *Oral Dis.* **8**, 3-11.

UMESH, A., COHEN, B.N., ROSS, L.S., GILL, S.S. (2003). Functional characterization of a glutamate/aspartate transporter from the mosquito *Aedes aegypti*. *J Exp.Biol.* **206**, 2241-2255.

VAUGHAN-JONES, R. D. , SPITZER, K. W. (2002). Role of bicarbonate in the regulation of intracellular pH in the mammalian ventricular myocyte. *Biochem.Cell Biol.* **80**, 579-596.

VIGNE, P., FRELIN, C., CRAGOE, E.J. JR., LAZDUNSKI, M. (1983). Ethylisopropylamiloride: a new and highly potent derivative of amiloride for the inhibition of the  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchange system in various cell types. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **116**, 86-90.

VINCE, J. W. , REITHMEIER, R. A. F. (1998). Carbonic anhydrase II binds to the carboxy terminus of human band 3, the erythrocyte  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  exchanger. *The Journal of Biological Chemistry* **273**, 28430-28437.

VIRKKI, L.V., CHOI, I., DAVIS, B.A., BORON, W.F. (2003). Cloning of a  $\text{Na}^+$ -driven  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  exchanger from squid giant fiber lobe. *Am J Physiol Cell Physiol* **285**, C771-C780.

VOSS, M., VITAVSKA, O., WALZ, B., WIECZOREK, H., BAUMANN, O. (2007) Stimulus-induced phosphorylation of V-ATPase by protein kinase A. *J. Biol. Chem.* **282**, 33735-33742.

VOSS, M. (2008). Regulation der vakuolären  $\text{H}^+$ -ATPase durch reversible Proteinphosphorylierung. Dissertation.

WAGNER, C.A., GIEBISCH, G., LANG, F., GEIBEL, J.P. (1998). Angiotensin II stimulates vesicular  $\text{H}^+$ -ATPase in rat proximal tubular cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **95(16)**, 9665-9668.

WESSING, A., BERTRAM, G., ZIEROLD, K. (1993). Effects of bafilomycin A1 and amiloride on the apical potassium and proton gradients in *Drosophila* Malpighian tubules studied by X-ray microanalysis and microelectrode measurements. *J Comp Physiol [B]* **163**, 452-462.

WHITTAM, R., WHEELER, K. P., BLAKE, A. (1964). Oligomycin and active transport reactions in cell membranes. *Nature* **203**, 720-724.

WIECZOREK, H., PUTZENLECHNER, M., ZEISKE, W., KLEIN, U. (1991). A vacuolar-type proton pump energizes  $\text{K}^+/\text{H}^+$  antiport in an animal plasma membrane. *The Journal of Biological Chemistry* **266**, 15340-15347.

- WIECZOREK, H. (1992). The insect V-ATPase, a plasma membrane proton pump energizing secondary active transport: molecular analysis of electrogenic potassium transport in the tobacco hornworm midgut. *J Exp.Biol.* **172**, 335-343.
- WIECZOREK, H., BROWN, D., GRINSTEIN, S., EHRENFELD, J., HARVEY, W.R. (1999). Animal plasma membrane energization by proton-motive V-ATPases. *BioEssay* **21**, 637-648.
- WILLOUGHBY, D. , SCHWIENING, C. J. (2002). Electrically evoked dendritic pH transients in rat cerebellar purkinje cells. *Journal of Physiology* **544.2**, 487-499.
- WU, M. L., TSAI, M. L., TSENG, Y. Z. (1994). DIDS-sensitive pHi regulation in single rat cardiac myocytes in nominally HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> free conditions. *Circ.Res.* **75**, 123-132.
- ZEISKE, W., MEYER, H., WIECZOREK, H. (2002). Insect midgut K<sup>+</sup> secretion: concerted run-down of apical/basolateral transporters with extra-/intracellular acidity. *J Exp.Biol.* **205**, 463-474.
- ZERANGUE, N., KAVANAUGH, M. P. (1996). Flux coupling in a neuronal glutamate transporter. *Nature* **383**, 634-637.
- ZHANG, G. H., CRAGOE, E. J., MELVIN, J. E. (1992). Regulation of cytoplasmic pH in rat sublingual mucous acini at rest and during muscarinic stimulation. *J.Membrane Biol.* **129**, 311-321.
- ZIMMERMANN, B., WALZ, B. (1997). Serotonin-induced intercellular calcium waves in salivary glands of the blowfly *Calliphora erythrocephala*. *Journal of Physiology* **500.1**, 17-28.
- ZIMMERMANN, B. (1998). Calcium store depletion activates two distinct calcium entry pathways in secretory cells of the blowfly salivary gland. *Cell Calcium* **23(1)**, 53-63.
- ZIMMERMANN, B., WALZ, B. (1999). The mechanism mediating regenerative intercellular Ca<sup>2+</sup> waves in the blowfly salivary gland. *The EMBO Journal* **18**, 3222-3231.
- ZIMMERMANN, B. DAMES, P., WALZ, B., BAUMANN, O. (2003). Distribution and serotonin-induced activation of vacuolar-type H<sup>+</sup>-ATPase in the salivary glands of the blowfly *Calliphora vicina*. *J Exp.Biol.* **206**, 1867-1876.

## 6 Anhang

### 6.1 Abkürzungsverzeichnis

1,2-DAG	1,2-Diacylglycerol
5-HT	5-Hydroxytryptamine, Serotonin
8-CPT-cAMP	8-(4-Chlorophenylthio)-zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
ACTZ	Acetazolamid
AE	$\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Antiporter
AM-Ester	Acetoxymethylester
AS-Sequenz	Aminosäure-Sequenz
ATP	Adenosintriphosphat
$\beta$	Pufferkapazität
$\beta_{\text{CO}_2}$	bicarbonatabhängige Pufferkapazität
$\beta_i$	intrinsische Pufferkapazität
$\beta_{\text{ges}}$	Gesamtpufferkapazität
bp	Basenpaare
BCECF	2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5-(and-6)-carboxyfluorescein
BSA	Bovines Serumalbumin
cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
$\text{CH}_3\text{COOH}$	Essigsäure
$\text{CH}_3\text{COO}^-$	Acetat-Anion
Con A	Concanamycin A
CPA	<i>Cation Proton Antiporter</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DF	elektrochemische Triebkraft ( <i>Driving Force</i> )
DIDS	4,4-Diisothiocyanostilben-2,2-disulfonat
EAAT	$\text{Na}^+$ -abhängiger Glutamat-Transporter
EIPA	5-(N-Ethyl-N-isopropyl)-Amiloride
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtOH	Ethanol
$\text{H}^+$	Protonen
HAF	Hexadecanoylaminofluorescein
$\text{HCO}_3^-$	Bicarbonat
$\text{H}_2\text{CO}_3$	Kohlensäure
IBMX	3-Isobutyl-1-methyl-Xanthin
$\text{IP}_3$	Inositol(1,4,5)-trisphosphat
IPTG	Isopropyl-Thio-D-Galaktopyranosid

kb	Kilobasen
LED	Leuchtdiode
mRNA	poly(A) <sup>+</sup> -RNA
MW	Mittelwert
Na-acetat	Natrium-acetat
NBC	Na <sup>+</sup> /HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -Cotransporter
NCBI	<i>National Center of Biotechnology Information</i>
NDCBE	Na <sup>+</sup> -getriebener Cl <sup>-</sup> /HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -Antiporter
NH <sub>4</sub> Cl	Ammoniumchlorid
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ammoniumsulfat
NHA	K <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> -Antiporter
NHE	Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> -Antiporter
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH <sub>i</sub>	intrazellulärer pH
pH <sub>o</sub>	extrazellulärer pH
PKA	Proteinkinase A
pK <sub>s</sub>	Säurekonstante
PLC	Phospholipase C
PtdIns(4,5)P <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat
PtPFPP	Pt(II)-tetra-pentafluorophenylporphyrin, Pt-Porphyrin, P3
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SE	Standardfehler
SERCA-Pumpe	Ca <sup>2+</sup> -ATPase am ER
TAE	Tris-acetat-EDTA-Puffer
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TEP	Transepitheliales Potential
UE	Untereinheit
V-ATPase	vakuoläre H <sup>+</sup> -ATPase
V <sub>m</sub>	Membranpotential
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl-β-D-galaktopyranosid

## 6.2 Degenerierte Primer

Verwendeter Basencode = *Base Ambiguity Code*

<b>M</b>	=	A	oder	C	<b>H</b>	=	A, C	oder	T
<b>R</b>	=	A	oder	G	<b>D</b>	=	A, G	oder	T
<b>W</b>	=	A	oder	T	<b>B</b>	=	C, G	oder	T
<b>K</b>	=	G	oder	T	<b>V</b>	=	A, C	oder	G
<b>S</b>	=	C	oder	G	<b>Y</b>	=	C	oder	T
<b>I</b>	=	A, C, G	oder	T					

Tab. 6.1: Degenerierte Primer

Sequenz	Primer F = Vorwärtsprimer R = Rückwärtsprimer	erwartete Fragmentlängen
EAAT	EAAT F1: 5'-AAYATGGAYGGMACKGC-3' EAAT F2: 5'-GGMACKGCIYTITAYGARGC-3' EAAT R1: 5'-CGRTCSARIADCCARTC-3' EAAT R2: 5'-CCWATVSWIGCYGCGYTIGC-3'	F1/R1: 236 bp F1/R2: 128 bp F2/R1: 227 bp F2/R2: 119 bp
NHE	NHE F1: 5'-TTYTTYHWDWBHTSYTGCCICC-3' NHE F2: 5'-GGBGARWSBITVCTVAACGATGC-3' NHE R1: 5'-GCATCGTTBAGBAIVSWYTCVCC-3' NHE R2: 5'-GCDCCICGHARKCC-3'	F1/R1: 316-326 bp F1/R2: 899-924 bp F2/R2: 606-621 bp
NHA	NHA F1: 5'-GCIRTITCICRRMYGTIGTSGT-3' NHA R1: 5'-GCIGCYTGIACIGTIGCYTT-3'  NHA1 F1: 5'-GCIGTITCICCRGCGYTIGTSGTICC-3' NHA1 F2: 5'-GGMGGIYTIGGITYGG-3' NHA1 F3: 5'-TTCTGGATGATMTTCGARCC-3' NHA1 R1: 5'-GGYTCGAAKATCATCCAGAA-3' NHA1 R2: 5'-GCYTGIACYGTIGCYTTIGMCATCC-3'	F1/R1: 682-711 bp  F1/R1: 482-485 bp F1/R2: 683-686 bp F2/R1: 275 bp F2/R2: 476 F3/R2: 221 bp
CA	CA F1: 5'-GGWCRICGYCARTCRCC-3' CA F2: 5'-TCIGAGCACACYITMGMCG-3' CA R1: 5'-CGKCKAIRGTGTGCTCIGA-3' CA R2: 5'-CCARATRACIGAYTCIGMGCA-3'	F1/R1: 238-262 bp F1/R2: 533-570 bp F2/R2: 314-327 bp
C-UE V-ATPase	UE-C F1: 5'-GARGATCAGCGSGAYAAGC-3' UE-C F2: 5'-TGGGAYMTGGCYAAGTAYCC-3' UE-C R1: 5'-GGICCAAAYTGYYTCTTCTTGTC-3' UE-C R2: 5'-ACGGAYTCIACRAASACACG-3'	F1/R1: 593 bp F1/R2: 680 bp F2/R1: 515 bp F2/R2: 602 bp

### 6.3 Nukleotid-Sequenzen der erhaltenen PCR-Fragmente

#### Na<sup>+</sup>-abhängiger Glutamat-Transporter

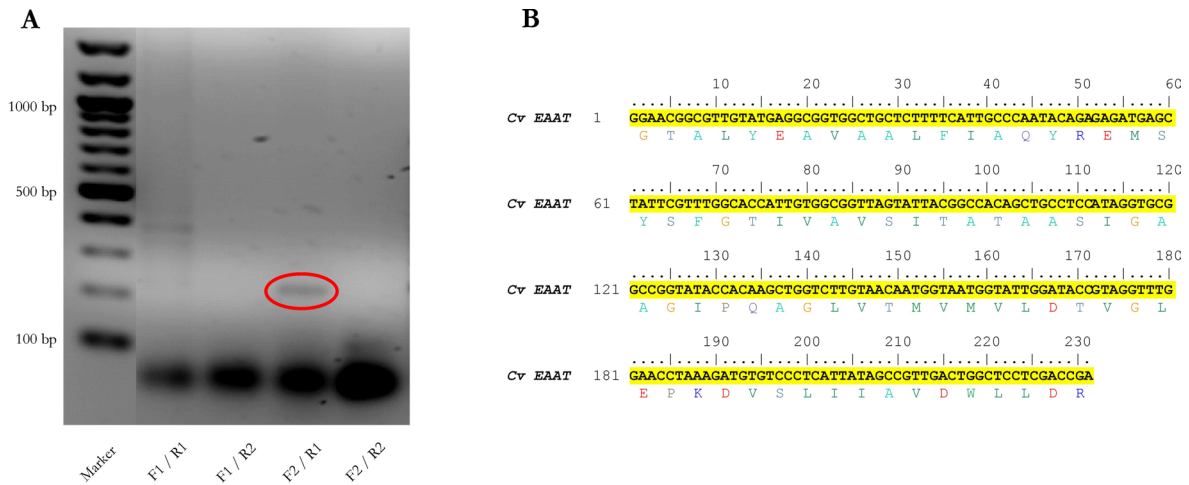


Abb. 6.1: Nukleotid-Sequenz des Na<sup>+</sup>-abhängigen Glutamat-Transporters aus *Calliphora vicina* (*Cv EAAT*)

(A) Zeigt das Ergebnis einer PCR mit degenerierten Primern. Das Fragment, das kloniert wurde und dessen Nukleotid-Sequenz in (B) dargestellt ist, ist rot umrandet.

#### K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Antiporter

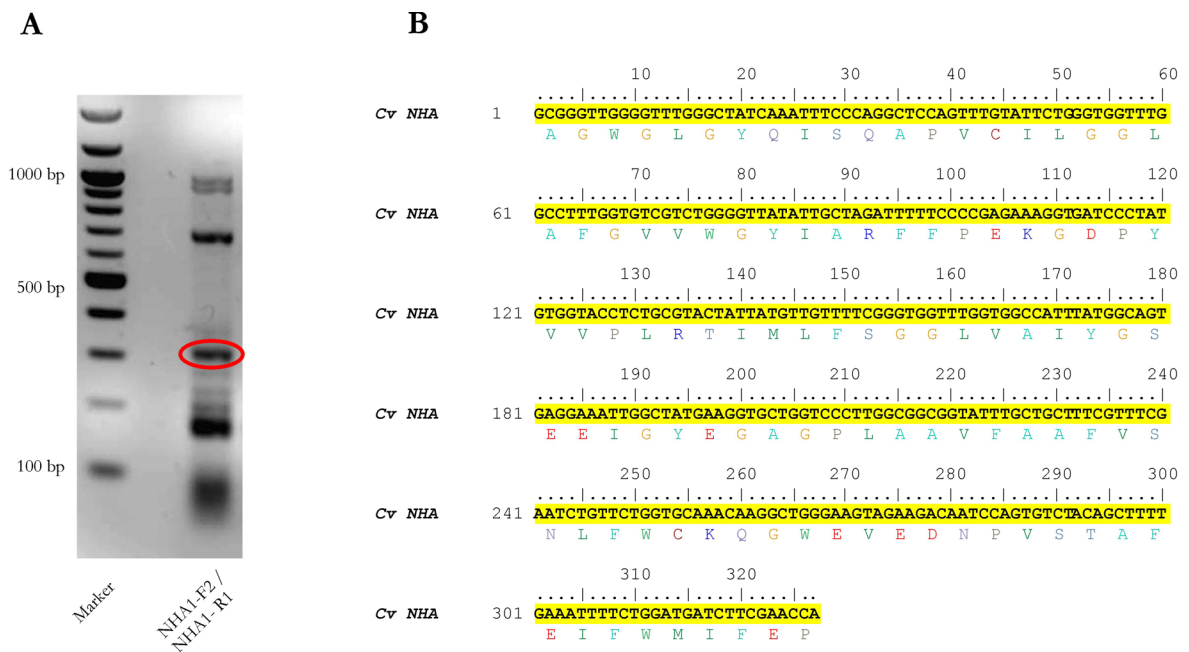
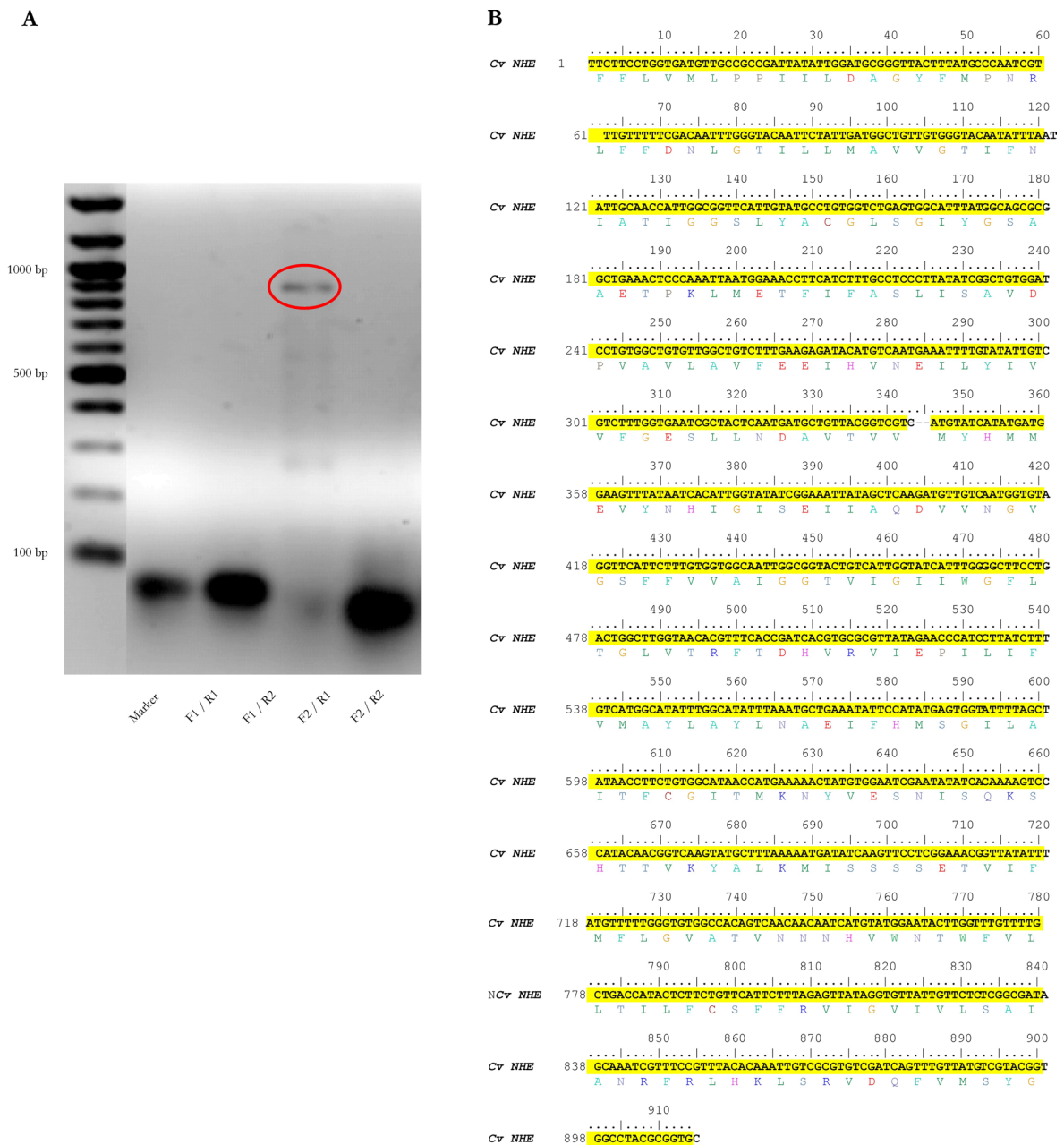


Abb. 6.2: Nukleotid-Sequenz des K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Antiporter aus *Calliphora vicina* (*Cv NHA*)

(A) Zeigt das Ergebnis einer PCR mit degenerierten Primern. Das Fragment, das kloniert wurde und dessen Nukleotid-Sequenz in (B) dargestellt ist, ist rot umrandet.

Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-AntiporterAbb. 6.3: Nukleotid-Sequenz des Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Antiporter aus *Calliphora vicina* (*Cv NHE*)

(A) Zeigt das Ergebnis einer PCR mit degenerierten Primern. Das Fragment, das kloniert wurde und dessen Nukleotid-Sequenz in (B) dargestellt ist, ist rot umrandet.



## Carboanhydrase

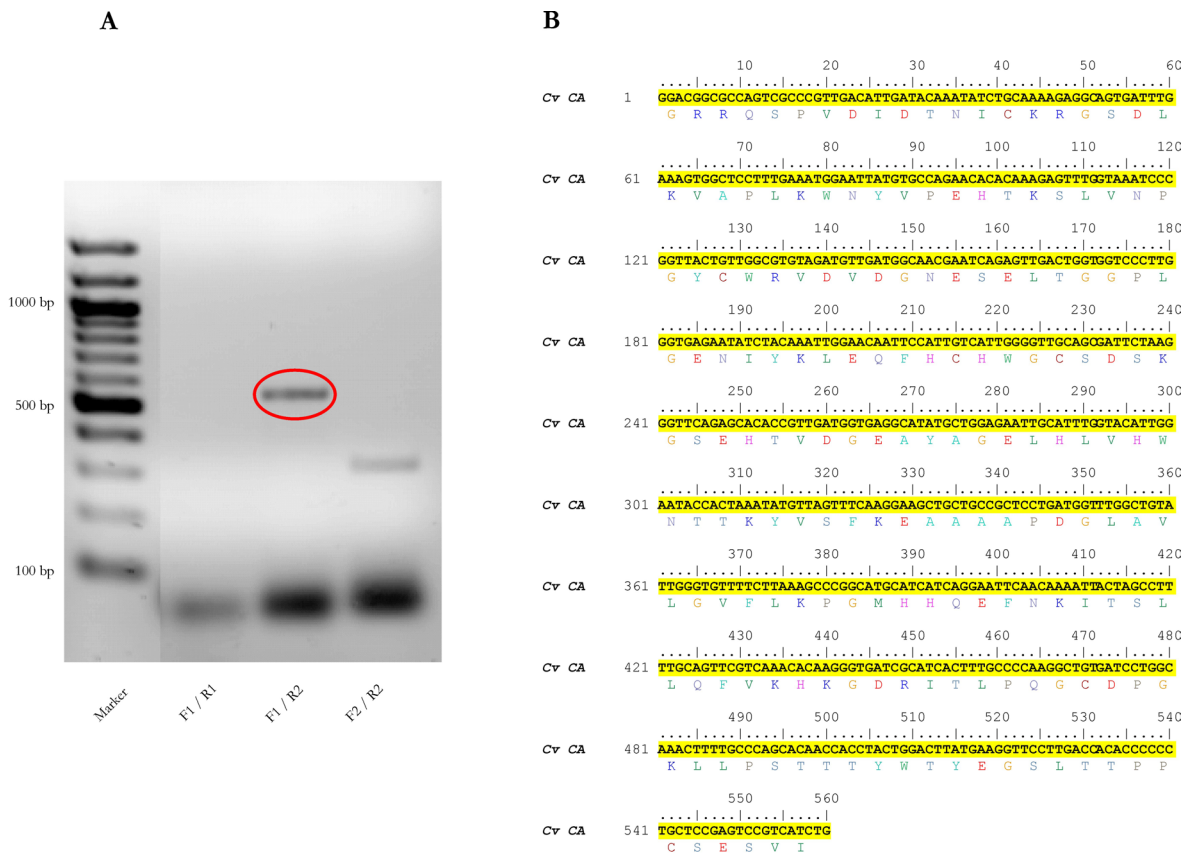
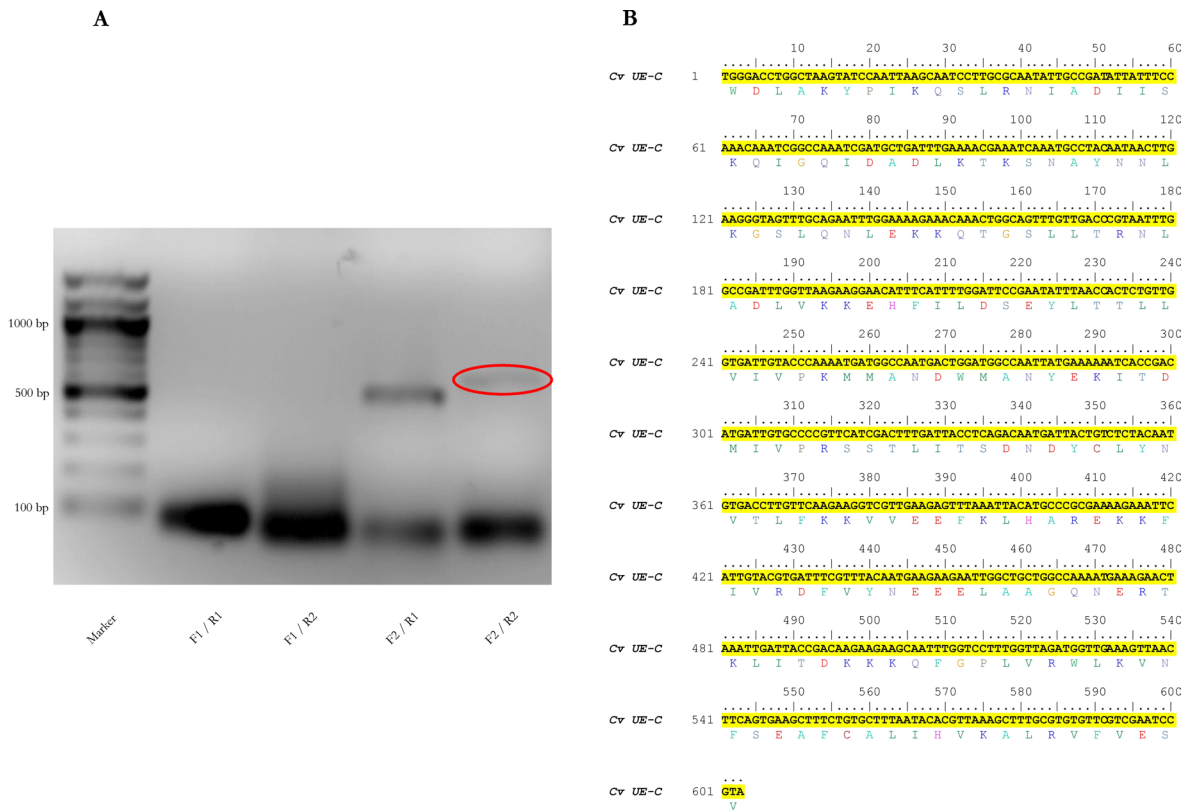


Abb. 6.4: Nukleotid-Sequenz der Carboanhydrase aus *Calliphora vicina* (*Cv CA*)

(A) Zeigt das Ergebnis einer PCR mit degenerierten Primern. Das Fragment, das kloniert wurde und dessen Nukleotid-Sequenz in (B) dargestellt ist, ist rot umrandet.

## UE-C der V-ATPase

Abb. 6.5: Nukleotid-Sequenz der UE-C der V-ATPase aus *Calliphora vicina* (*Cv UE-C*)

(A) Zeigt das Ergebnis einer PCR mit degenerierten Primern. Das Fragment, das kloniert wurde und dessen Nukleotid-Sequenz in (B) dargestellt ist, ist rot umrandet.

## 6.4 Spezifische Primer für RT-PCR

Tab. 6.2: Spezifische Primer für RT-PCR

Sequenz	Primer vorwärts	Primer rückwärts
EAAT	5'-GCGGTGGCTGCTCTTTTCAT-3'	5'-CGGTGAGGAGCCAGTCAAC-3'
NHE	5'-GCGGGTTACTTTATGCCCAA-3'	5'-CCGTACGACATAACAAACTG-3'
NHA	5'-CCCAGGCTCCAGTTTGTAT-3'	5'-TCCCAGCCTTGTTTGCACCA-3'
CA	5'-CAGTCGCCCGTTGACATTGA-3'	5'-GGTGTGGTCAAGGAACCTTC-3'
C-UE V-ATPase	5'-CCAATTAAGCAATCCTTGCG-3'	5'-CGGATTTCGACGAACACACG-3'

## Danksagung

Ich danke *Prof. Dr. Bernd Walz* für die Überlassung dieses interessanten Themas, die exzellente Betreuung und das in mich gesetzte Vertrauen.

*Prof. Dr. Ralph Gräf*, *Prof. Dr. Hans-Joachim Pflüger* und *Prof. Dr. Holger Martens* danke ich für die Bereitschaft zur Übernahme der Begutachtung dieser Arbeit.

Ein großes Dankeschön richte ich an die gesamte *AG Zoophysiology*, die mich nie den Spaß neben der Arbeit vergessen ließ, und mich auch in schwierigen und „dunklen“ Zeiten motivierte. Ich danke *Dr. Wolfgang Blenau* für die Hilfestellung in Bezug auf die molekularbiologischen Experimente, sowie *PD Dr. Otto Baumann* und *Dr. Stefan Böse* für anregende Diskussionen und praktische Hilfeleistungen. *Dr. Elmar Schmälzlin* vom Institut für Physikalische Chemie der Universität Potsdam danke ich für die Möglichkeit Messungen zum Sauerstoffverbrauch durchführen zu können.

*Angela Hubig* und *Bärbel Wuntke* danke ich für die Einarbeitung in den Laboralltag und die jederzeit gewährte Unterstützung und Hilfestellung.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Bürokolleginnen *Britta Troppmann* und *Cathleen Rotte*, ohne die die letzten Jahre nur halb so schön gewesen wären. Danke für die letzten Jahre, ich werde sie und euch nicht vergessen. Weiterhin danke ich alle ehemaligen und aktuellen Diplomanden und Doktoranden der *AG Zoophysiology*, die dafür sorgten dass es nie langweilig wurde. Ein besonderer Dank geht an *Dr. Carsten Hille* für kritisches Lesen dieser Arbeit und anregende Diskussionen rund um die  $\text{pH}_i$ -Regulation.

Bei den Mitgliedern des Graduiertenkollegs 837 „*Functional Insect Science*“ bedanke ich mich für die gute Atmosphäre und das Bemühen mir die Koordination des Graduiertenkollegs so einfach wie möglich zu machen. In diesem Zusammenhang danke ich *Birgit Herold* und *Katrin Kania*, die mir durch den Verwaltungsdschungel halfen und mir meine Fehler immer verziehen.

Bei meinen *Freunden* (jedem einzelnen zu danken, würde den Rahmen sprengen, auch wenn es jeder einzelne verdient hätte), bedanke ich mich für die immer gewährte Unterstützung abseits der, für die meisten fremden, Welt der Physiologie.

Der größte Dank geht an meine *Familie*, die immer hinter mir steht und mich unterstützt. *Jens*, ich danke dir aus tiefsten Herzen, dass du immer für mich da bist, mich immer unterstützt, aufbaust, alle meine Krisen der letzten Jahre mit mir gemeistert hast und mich nie hast vergessen lassen, was wirklich wichtig ist. Ohne euch wäre ich nie soweit gekommen. DANKE.

---

# Lebenslauf

## PERSÖNLICHE INFORMATIONEN

---

Name: Bettina Schewe  
Geburtsdatum: 23.05.1981  
Geburtsort: Meißen

## WISSENSCHAFTLICHER WERDEGANG

---

seit 11/2005 Promotionsstudent und wissenschaftlicher Mitarbeiter in der AG Zoophysiologie am Institut für Biochemie & Biologie der Universität Potsdam, Koordinatorin des Graduiertenkollegs 837 "Functional Insect Science", assoziiertes Mitglied im Graduiertenkolleg 837 „Functional Insect Science“

01/2005 - 10/2005 Diplomarbeit zum Thema „Charakterisierung Serotonin-induzierter pH-Änderungen in den Speicheldrüsen von *Calliphora vicina*“

01/2004 - 10/2005 Studentische Hilfskraft in der AG Zoophysiologie am Institut für Biochemie & Biologie der Universität Potsdam

10/2000 - 10/2005 Studium der Diplom-Biologie an der Universität Potsdam  
Abschluss: Diplom-Biologin

## SCHULAUSBILDUNG

---

09/1993 - 09/2000 Einstein-Gymnasium Potsdam  
Abschluss: Abitur

08/1987 - 08/1993 Grundschule "Große Stadtschule Potsdam"

## Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Dissertation selbstständig, ohne die Hilfe Dritter und nur mit den angegebenen Quellen und Hilfsmitteln angefertigt zu haben. Diese Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Hochschule vorgelegen.

Potsdam, den 11.08.2008

Bettina Schewe