

# Signalwege und Steuermechanismen in den Speicheldrüsen von Dipteren

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

„doctor rerum naturalium“

(Dr. rer. nat.)

in der Wissenschaftsdisziplin „Zoophysiology“

eingereicht an der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität Potsdam

von

Ruth Maria Schmidt

Potsdam, 2006

## Publikationen

Dames, P., Zimmermann, B., Schmidt, R., Rein, J., Voss, M., Schewe, B., Walz, B., Baumann, O. (2006). cAMP regulates plasma membrane V-ATPase assembly and activity in blowfly salivary glands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**(10), 3921-3931.

Schmidt, R., Walz, B. Spatiotemporal Ca<sup>2+</sup> signalling in blowfly salivary glands: differences between serotonin- and histamine-induced responses. Manuskript in Revision.

Schmidt, R., Walz, B. cAMP-dependent potentiation of InsP<sub>3</sub>-induced Ca<sup>2+</sup> release from the ER in blowfly salivary glands. Manuskript in Vorbereitung.

Schmidt, R., Walz, B., Baumann, O. Distribution of the cAMP-dependent protein kinase in blowfly salivary glands. Manuskript in Vorbereitung.

## Konferenzbeiträge

Schmidt, R., Walz, B. 2004. Serotonin and histamine produce different spatiotemporal Ca<sup>2+</sup> signals in blowfly salivary glands. *European Journal of Cell Biology* Vol. 83, Poster S 2-3

Dames, P., Schmidt R., Walz B., Baumann, O. 2004. Regulation of vacuolar-type H<sup>+</sup>-ATPase (vATPase) in blowfly salivary glands. *European Journal of Cell Biology* Vol. 83, Poster S 2-39

Schmidt, R., Walz, B. 2004. Spatiotemporal calcium signalling in blowfly salivary glands: differences after serotonin and histamine stimulation. Abstractband zur 97. Jahresversammlung der Deutschen Zoologischen Gesellschaft, Rostock, S. 153, Poster P16

Schmidt, R., Walz, B. 2004. Different spatiotemporal calcium signalling in blowfly salivary glands. 8th Meeting of the European Calcium Society, Cambridge, England, Programme, Abstracts, Lists of Participants S. 55, Poster 1-23

Schmidt, R., Baumann, O., Walz, B. (2005) cyclicAMP-dependent potentiation of InsP<sub>3</sub>-induced Ca<sup>2+</sup> release from the ER. Abstractband 14th International Symposium on Calcium Binding Proteins in Health and Disease, Banff, Alberta, Kanada, Poster P7

## Abstract

Fluid- and protein-secretion in the salivary glands of insects are controlled by hormones or neurotransmitters. These agonists activate two signalling cascades: the cAMP-pathway and the  $IP_3/Ca^{2+}$ -pathway. The functional crosstalk between these two signalling pathways is poorly understood.

Functional crosstalk between cAMP-pathway and  $IP_3/Ca^{2+}$ -pathway was investigated in the salivary glands of the blowfly, *Calliphora vicina*. Histamine and 5- $\alpha$ -methyltryptamine were used in an attempt to activate the cAMP-pathway selectively, as suggested previously. By using transepithelial potential-measurements and microfluorometric  $Ca^{2+}$ -imaging it was demonstrated that both substances activate the cAMP- and the  $IP_3/Ca^{2+}$ -pathway. The physiological effects of histamine were investigated in detail. These experiments show that histamine causes an intracellular  $Ca^{2+}$ -elevation that, in some preparations exhibits oscillations with concentration-dependent frequencies. In contrast to 5-HT induced intracellular  $Ca^{2+}$ -oscillations and propagating intercellular  $Ca^{2+}$ -waves histamine produces local  $Ca^{2+}$ -oscillations in single cells or synchronous „ $Ca^{2+}$ -beating“ in the whole gland.

In addition the effects of increasing  $[cAMP]_i$  on the  $IP_3/Ca^{2+}$ -pathway in the salivary glands of the blowfly were studied. It could be demonstrated that cAMP augments the 5-HT-induced  $Ca^{2+}$ -increase in glands stimulated with low doses of 5-HT. This potentiation is the result of a PKA-mediated sensitisation of the  $IP_3$ -receptor/ $Ca^{2+}$ -channel for  $IP_3$ . Results of immunocytochemical analyses show that the PKA is spatially associated with the ER.

These results show for the first time that in invertebrates as well as in vertebrates the second messenger cAMP sensitises the  $IP_3$ -receptor/ $Ca^{2+}$ -channel for  $IP_3$  by the action of a PKA.

## Kurzzusammenfassung

Flüssigkeitssekretion und Proteinsekretion werden in Speicheldrüsen von Insekten über Hormone und Neurotransmitter gesteuert. Diese entfalten ihre physiologische Wirkung in den sekretorischen Drüsenzellen hauptsächlich über den zyklischen Adenosinmonophosphat (cAMP)-Signalweg und den Inositoltrisphosphat ( $IP_3$ ) /  $Ca^{2+}$ -Signalweg. Die Mechanismen möglicher Wechselwirkungen zwischen diesen Signalwegen und ihre physiologischen Auswirkungen sind unzureichend bekannt.

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand die Frage, ob und wie sich der  $Ca^{2+}$ -Signalweg und der cAMP-Signalweg in der Speicheldrüse der Diptere *Calliphora vicina* beeinflussen. Substanzen wie 5-Fluoro- $\alpha$ -Methyltryptamin und Histamin wurden in früheren Arbeiten als Agonisten genutzt, um in den Speicheldrüsen von *C. vicina* selektiv den cAMP-Signalweg (getrennt vom  $IP_3$ / $Ca^{2+}$ -Signalweg) zu aktivieren. Es zeigte sich in transepithelialen Potentialmessungen und mikrofluorometrischen  $Ca^{2+}$ -Untersuchungen, dass beide Substanzen sowohl den cAMP-Weg als auch den  $Ca^{2+}$ -Signalweg aktivierten. Die physiologischen Ursachen der Histamin-induzierten  $Ca^{2+}$ -Erhöhung wurden genauer untersucht. Zusammengefasst zeigten diese Untersuchungen, dass Histamin wie 5-HT den cAMP-Weg und die Phosphoinositidkaskade aktivierte. Im Gegensatz zu den 5-HT-induzierten  $Ca^{2+}$ -Oszillationen, welche durch interzelluläre  $Ca^{2+}$ -Wellen synchronisiert werden, verursachte Histamin bei niedrigen Konzentrationen lokale  $Ca^{2+}$ -Oszillationen in einzelnen Zellen (keine Wellen). Bei höheren Histamin-Konzentrationen war eine anhaltende  $Ca^{2+}$ -Erhöhung oder ein synchrones „ $Ca^{2+}$ -beating“ in der gesamten Drüse zu beobachten.

Des Weiteren wurde die Frage untersucht, ob eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration den  $IP_3$ / $Ca^{2+}$ -Signalweg in den Epithelzellen der Speicheldrüse beeinflussen kann. Es zeigte sich, dass cAMP den durch schwelennahe 5-HT-Konzentrationen induzierten  $Ca^{2+}$ -Anstieg verstärkte. Diese Verstärkung wurde durch eine PKA-vermittelte Sensitivierung des  $IP_3$ -Rezeptor/ $Ca^{2+}$ -Kanals für  $IP_3$  verursacht. Immunzytochemische Untersuchungen deuten darauf hin, dass die Proteinkinase A eng mit dem  $IP_3$ -Rezeptor/ $Ca^{2+}$ -Kanal assoziiert ist. Diese Messungen zeigen erstmals, dass auch bei Invertebraten der Botenstoff cAMP, PKA-vermittelt, den  $IP_3$ -Rezeptor/ $Ca^{2+}$ -Kanal des ER für  $IP_3$  sensitiviert.

# Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	viii
Tabellenverzeichnis	x
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 G-Protein-gekoppelte Signalwege	2
1.1.1 Der cAMP-Signalweg	2
1.1.2 Der Ca <sup>2+</sup> -Signalweg	3
1.2 Die Speicheldrüse von <i>Calliphora vicina</i> als Modellobjekt	4
1.2.1 Morphologische Aspekte	5
1.2.2 Die Signalwege in den sekretorischen Zellen der Speicheldrüsen	6
1.2.3 Ca <sup>2+</sup> -Oszillationen und Ca <sup>2+</sup> -Wellen in den Speicheldrüsen von <i>C. vicina</i>	8
1.3 Zielstellung dieser Arbeit	9
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>11</b>
2.1 Verwendete Substanzen und Lösungen	11
2.2 Verwendete Antikörper	13
2.3 Tierhaltung und Präparation	14
2.4 Biochemische Methoden	15
2.4.1 Probenaufbereitung	15
2.4.2 Diskontinuierliche Gelelektrophorese	15
2.4.3 Proteintransfer	16

2.4.4	Immundetektion . . . . .	16
2.4.5	Messung der Proteinkinase-Aktivität . . . . .	17
2.5	Mikroskopische Techniken . . . . .	18
2.5.1	Herstellung haftfähiger Deckgläser . . . . .	18
2.5.2	Kryostatschnitte . . . . .	19
2.5.3	Indirekte Immunfluoreszenz . . . . .	19
2.5.4	Mikroskopie und Bildverarbeitung . . . . .	20
2.5.5	Mikrofluorometrische $\text{Ca}^{2+}$ -Messungen . . . . .	20
2.5.5.1	Versuchsdurchführung und Auswertung . . . . .	21
2.5.6	Messung der $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Lumen des ER . . . . .	23
2.5.6.1	Versuchsdurchführung . . . . .	23
2.5.7	Messung des transepithelialen Potentials (TEP) . . . . .	24
2.5.7.1	Versuchsdurchführung . . . . .	24
2.5.8	Datenanalyse und Statistik . . . . .	26
2.5.8.1	Bioinformatische Analyse und Werkzeuge . . . . .	26
2.5.8.2	Statistik . . . . .	26
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>27</b>
3.1	5-Fluoro- $\alpha$ -Methyltryptamin und Histamin als selektive Agonisten der cAMP-Signalkaskade? . . . . .	27
3.1.1	Wirkung von 5-F- $\alpha$ -MT und Histamin auf das TEP . . . . .	27
3.1.2	Histamin induziert in den Drüsenzellen eine Änderung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . . . . .	30
3.1.3	Über welchen membranständigen Rezeptor führt Histamin zu einem Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ? . . . . .	34
3.1.4	Vergleich der 5-HT- und Histamin-induzierten $\text{Ca}^{2+}$ -Änderungen . . . . .	36
3.2	Wirkung von cAMP auf den $\text{IP}_3/\text{Ca}^{2+}$ -Signalweg . . . . .	39
3.2.1	Wirkung von $[\text{cAMP}]_i$ auf das transepitheliale Potential (TEP) . . . . .	39
3.2.2	Wirkung der $[\text{cAMP}]_i$ auf die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . . . . .	40
3.2.3	Wirkung von cAMP auf die $\text{IP}_3$ -induzierte $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem ER . . . . .	44

3.2.3.1	Wird die cAMP-abhängige Verstärkung der IP <sub>3</sub> -induzierten Ca <sup>2+</sup> -Freisetzung durch Epac oder PKA vermittelt? . . . . .	48
3.2.3.2	Hemmung der cAMP-vermittelten Verstärkung der Ca <sup>2+</sup> -Freisetzung . . . . .	53
3.2.4	Lokalisation der PKA in den Speicheldrüsen . . . . .	54
3.2.4.1	Western-Blot-Analysen . . . . .	57
3.2.4.2	Immunofluoreszenz-Lokalisation der PKA . . . . .	57
3.3	5-HT-induzierte Änderungen in den Proteinkinase-Aktivitäten . . . . .	60
3.3.1	5-HT-induzierte Änderung der PKA-Aktivität . . . . .	60
3.3.2	5-HT-induzierte Änderung der CaM-Kinase II-Aktivität . . . . .	61
3.3.3	5-HT-induzierte Änderung der PKC-Aktivität . . . . .	62
3.3.4	Lokalisation der PKC in den Speicheldrüsen . . . . .	62
3.3.4.1	Western-Blot-Analysen . . . . .	64
3.3.4.2	Immunofluoreszenz-Untersuchungen . . . . .	65
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> . . . . .	<b>67</b>
4.1	5-F- $\alpha$ -MT und Histamin als selektive Agonisten der cAMP-Signalkaskade? . . . . .	68
4.1.1	5-F- $\alpha$ -MT und Histamin induzieren Änderungen der [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> . . . . .	69
4.1.2	Histamin aktiviert die Phosphoinositidkaskade und induziert eine Ca <sup>2+</sup> -Freisetzung aus dem ER . . . . .	71
4.1.3	Histamin ist in den Speicheldrüsen von <i>C. vicina</i> kein natürlicher Agonist der Flüssigkeitssekretion . . . . .	73
4.1.4	Unterschiede zwischen 5-HT- und Histamin-induzierten TEP- und Ca <sup>2+</sup> -Oszillationen: Phänomenologie und mögliche Ursachen . . . . .	74
4.2	Wirkung von cAMP auf den IP <sub>3</sub> /Ca <sup>2+</sup> -Signalweg . . . . .	77
4.2.1	Ein Anstieg der [cAMP] <sub>i</sub> potenziert die 5-HT-induzierte Negativierung des TEP . . . . .	77
4.2.2	cAMP führt in der stimulierten Drüse zu einem Anstieg der [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> . . . . .	78
4.2.3	cAMP sensitiviert die IP <sub>3</sub> -induzierte Ca <sup>2+</sup> -Freisetzung aus dem ER . . . . .	80

---

4.2.3.1	cAMP sensitiviert die IP <sub>3</sub> -induzierte Ca <sup>2+</sup> -Freisetzung aus dem ER über die Aktivierung einer PKA . . . . .	82
4.3	Lokalisation der PKA in den Speicheldrüsen . . . . .	85
4.4	5-HT-induzierte Änderungen in den Proteinkinase-Aktivitäten . . . . .	89
4.4.1	5-HT induziert eine Änderung der PKA-Aktivität . . . . .	90
4.4.2	5-HT induziert eine Änderung der CaM-Kinase II-Aktivität . . . . .	91
4.4.3	5-HT induziert eine Änderung der PKC-Aktivität . . . . .	92
4.4.4	Lokalisation der PKC in den Speicheldrüsen . . . . .	93
4.5	Ausblick . . . . .	94
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>96</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>100</b>
<b>A</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>I</b>
	<b>Anhang</b>	<b>III</b>



# Abbildungsverzeichnis

1.1	Übersicht über die Hauptsignalwege G-Protein-gekoppelter Rezeptoren . . . . .	3
1.2	Die Speicheldrüse von <i>C. vicina</i> . . . . .	6
1.3	Schematische Darstellung der Speicheldrüse von <i>C. vicina</i> . . . . .	7
1.4	Schematische Darstellung der Signalwege in den sekretorischen Zellen von <i>C. vicina</i> . . . . .	8
2.1	Schematische Darstellung der Apparatur für abbildende $\text{Ca}^{2+}$ -Messungen ( <i>ratiometric imaging</i> ) . . . . .	21
2.2	Schematische Darstellung der Permeabilisierung von Mag-Fura-2-beladenen sekretorischen Zellen der Speicheldrüse . . . . .	23
2.3	Schematische Darstellung des für die TEP-Messung verwendeten Versuchsaufbaus . . . . .	25
2.4	Verlauf des transepithelialen Potentials nach einer kurzen Stimulierung mit 30 nM 5-HT . . . . .	25
3.1	Einfluss von 30 nM 5-HT und 100 5-F- $\alpha$ -MT auf das TEP einer isolierten Speicheldrüse . . . . .	28
3.2	Einfluss von 30 nM 5-HT und Histamin auf das TEP einer isolierten Speicheldrüse . . . . .	29
3.3	Einfluss von 30 nM 5-HT, 3 nM 5-HT und 10 mM Histamin auf das TEP einer Speicheldrüse . . . . .	30
3.4	Einfluss von 10 mM Histamin und 3 nM 5-HT auf $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . . . . .	31
3.5	Dosisabhängige, Histamin-induzierte Änderung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . . . . .	32
3.6	Vergleich der Histamin- und 5-HT-induzierten Oszillationen . . . . .	33
3.7	Histamin-induzierte $\text{Ca}^{2+}$ -Änderung in $\text{Ca}^{2+}$ -freien und $\text{Ca}^{2+}$ -haltigen Ringer . . . . .	33
3.8	Blockierung der Histamin-induzierten $\text{Ca}^{2+}$ -Änderung nach Inkubation mit U73122 . . . . .	34
3.9	Wirkung von Yohimbin auf die 5-HT-induzierten TEP- und $\text{Ca}^{2+}$ -Änderungen . . . . .	35
3.10	Wirkung von Yohimbin auf die 5-HT- und Histamin-induzierten $\text{Ca}^{2+}$ -Änderungen . . . . .	36
3.11	Darstellung der induzierten $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen im <i>space-time plot</i> . . . . .	37
3.12	Verlauf des TEP nach Stimulierung mit 500 $\mu\text{M}$ IBMX im $\text{Ba}^{2+}$ -haltigen Ringer . . . . .	40
3.13	Wirkung von $[\text{cAMP}]_i$ auf die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in unstimulierten Drüsen . . . . .	41
3.14	Wirkung von $[\text{cAMP}]_i$ auf die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in der mit 3 nM 5-HT stimulierten Drüse . . . . .	42
3.15	Einfluss einer Erhöhung von $[\text{cAMP}]_i$ auf $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in der mit 30 nM 5-HT stimulierten Drüse . . . . .	43
3.16	Einfluss einer Erhöhung von $[\text{cAMP}]_i$ auf $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in der stimulierten Drüse in $\text{Ca}^{2+}$ -freiem Ringer . . . . .	43

3.17	Wirkung von cAMP oder IP <sub>3</sub> auf [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>ER</sub> in permeabilisierten Zellen . . . . .	44
3.18	cAMP-vermittelte Verstärkung der IP <sub>3</sub> -induzierten Ca <sup>2+</sup> -Freisetzung aus dem ER . . . . .	45
3.19	Dosis-Wirkungskurve der cAMP-vermittelten Verstärkung der IP <sub>3</sub> -induzierten Ca <sup>2+</sup> -Freisetzung aus dem ER . . . . .	46
3.20	Einfluss eines Medienwechsels und Wirkung von 8-Br-Rp-cAMPS auf die IP <sub>3</sub> -induzierte Ca <sup>2+</sup> -Freisetzung aus dem ER . . . . .	47
3.21	Dosis-Wirkungskurve für die cAMP-abhängige Verstärkung der IP <sub>3</sub> -induzierten Ca <sup>2+</sup> -Freisetzung aus dem ER . . . . .	48
3.22	Wirkung von 8-CPT-cAMP auf die IP <sub>3</sub> -induzierte Ca <sup>2+</sup> -Freisetzung aus dem ER . . . . .	50
3.23	Wirkung von Epac-Aktivatoren auf die IP <sub>3</sub> -induzierte Ca <sup>2+</sup> -Freisetzung aus dem ER . . . . .	51
3.24	Wirkung spezifischer PKA-Aktivatoren auf die IP <sub>3</sub> -induzierte Ca <sup>2+</sup> -Freisetzung aus dem ER . . . . .	52
3.25	Wirkung der PKA-Inhibitoren auf die 8-CPT-cAMP-vermittelte Verstärkung der IP <sub>3</sub> -induzierten Ca <sup>2+</sup> -Freisetzung . . . . .	54
3.26	Aminosäuresequenzvergleich von <i>D. melanogaster</i> PKA-C1 mit PKA-C2, PKA-C3 und mit <i>A. mellifera</i> PKA-C1 . . . . .	55
3.27	Aminosäuresequenzvergleich von <i>D. melanogaster</i> PKA-RII mit <i>A. mellifera</i> PKA-RII und mit <i>A. gambiae</i> PKA-RII . . . . .	56
3.28	Kreuzreaktivität der Antiseren gegen PKA-Untereinheiten aus <i>D. melanogaster</i> mit entsprechenden Proteinen aus <i>C. vicina</i> . . . . .	58
3.29	Lokalisation der PKA in den Speicheldrüsenzellen . . . . .	59
3.30	Änderung der PKA-Aktivität nach Stimulierung mit 5-HT . . . . .	61
3.31	Änderung der CaM-Kinase II-Aktivität nach Stimulierung mit 5-HT . . . . .	62
3.32	Änderung der PKC-Aktivität nach Stimulierung mit 5-HT . . . . .	63
3.33	Aminosäuresequenzvergleich von <i>H. sapiens</i> PKC $\alpha$ mit <i>D. melanogaster</i> PKC . . . . .	64
3.34	Kreuzreaktivität des anti-cPKC $\alpha$ mit entsprechenden Proteinen aus <i>D. melanogaster</i> und <i>C vicina</i> . . . . .	65
3.35	Lokalisation der PKC in den Speicheldrüsenzellen . . . . .	66
4.1	Schematische Darstellung der bekannten und postulierten Signalwege in den sekretorischen Zellen der Speicheldrüse von <i>C. vicina</i> . . . . .	89
A.1	Dosis-Wirkungskurve der cAMP-vermittelten Verstärkung der IP <sub>3</sub> -induzierten Ca <sup>2+</sup> -Freisetzung aus dem ER . . . . .	III
A.2	Einfluss eines Medienwechsels und Wirkung von 8-Br-Rp-cAMPS auf die Ca <sup>2+</sup> -Freisetzungsrates aus dem ER . . . . .	IV

# Tabellenverzeichnis

2.1	Zusammensetzung der verwendeten Intrazellulären Medien (ICM) . . . . .	11
2.2	Zusammensetzung der verwendeten Ringer-Lösungen . . . . .	12
2.3	Verwendete Substanzen . . . . .	12
2.4	Verwendete primäre Antikörper . . . . .	14
2.5	Verwendete sekundäre Antikörper . . . . .	14
4.1	Vergleich der 5-HT- und Histamin-induzierten Effekte . . . . .	69

# Kapitel 1

## Einleitung

Speichel enthält Wasser, Elektrolyte und häufig auch Proteine. Die Bestandteile des Speichels erfüllen vielfältige Aufgaben. Zu diesen Aufgaben gehören die Vorverdauung von Kohlehydraten, die Verflüssigung der Nahrung, die Befeuchtung der Mundhöhle und die Abwehr von Erregern (Review: [Cook et al., 1994](#)). Der Speichel blutsaugender Tiere kann zudem noch Substanzen enthalten, welche die Blutgerinnung und Verengung der Blutgefäße verhindern ([Ribeiro, 1995](#); [Walker, 2003](#)). In Vertebraten und in Invertebraten übernehmen paarig angeordnete Speicheldrüsen die Produktion des Speichels. Die Speicheldrüsen sind entweder innerviert oder sie werden durch Hormone und Modulatoren in der umgebenden Körperflüssigkeit kontrolliert. Die sekretorischen Zellen in Speicheldrüsen haben zwei Funktionen: (1.) Die Flüssigkeitsekretion, d.h. die Sekretion von Elektrolyten und Wasser, (2.) die Sekretion von Proteinen. Es ist bekannt, dass die Flüssigkeitssekretion sowie die Proteinsekretion über Hormone und Neurotransmitter gesteuert werden, welche in den sekretorischen Zellen hauptsächlich zwei Signalwege aktivieren (Review: [House, 1980](#); [House und Ginsborg, 1985](#); [Cook et al., 1994](#)). Ein Signalweg führt in der Regel zur Bildung des intrazellulären Botenstoffes zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP), während der zweite Signalweg zu einer Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) führt.

Die molekularen Teilschritte dieser Signalwege sind weitgehend bekannt. Es ist jedoch unzureichend untersucht, auf welche Weise sich beide Signalwege wechselseitig beeinflussen. Die vorliegende Arbeit soll hierzu einen Beitrag leisten.

Bevor die Zielstellung dieser Arbeit präzisiert wird, soll ein kurzer Überblick über den  $\text{Ca}^{2+}$ -

und den cAMP-Signalweg gegeben werden. Weiterhin soll das Modellobjekt, die Speicheldrüse der Diptere *Calliphora vicina* vorgestellt werden.

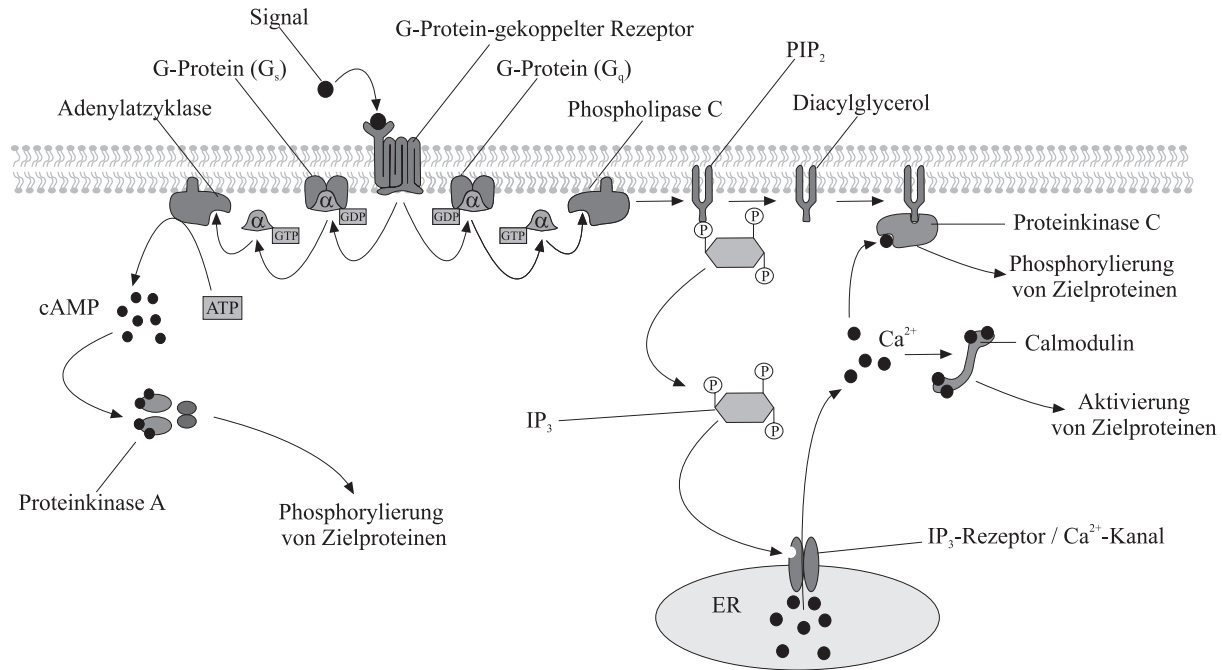
## 1.1 G-Protein-gekoppelte Signalwege

Bei der Speichelsekretion erfolgt die Übertragung der extrazellulären, meist hydrophilen Signale in das Zellinnere über membranständige Rezeptoren. Diese Rezeptoren sind überwiegend metabotrope oder G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) (Review: Kroeze *et al.*, 2003). Die Bindung der Liganden bewirkt die Aktivierung der Rezeptoren, welche zu einer Konformationsänderung des Rezeptorproteins führt. Diese Konformationsänderung wird auf der intrazellulären Seite über Protein-Protein-Wechselwirkungen an GTP-bindende G-Proteine weitergegeben. Die aktivierten G-Proteine können verschiedene Zielproteine stimulieren oder inhibieren. Stimulierende G-Proteine ( $G_s$ ) aktivieren eine Adenylatzyklase (AC) und den cAMP-Signalweg. Inhibierende G-Proteine ( $G_i$ ) hemmen die AC. G-Proteine vom  $G_q$ -Typ führen über die Stimulierung einer Phospholipase C (PLC) zur Aktivierung der Phosphoinositid-Kaskade. G-Proteine können auch noch andere Effektorproteine beeinflussen. Prominente Beispiele sind die Phosphodiesterasen (PD) ( $G_t$ ) sowie  $K^+$ -Kanäle und  $Ca^{2+}$ -Kanäle ( $G_{o/i}$ ) oder der  $Na^+/H^+$ -Austauscher ( $G_{12}$ ) (Review: Neer, 1994; Hamm, 1998; Farfel *et al.*, 1999). In Abb. 1.1 sind die cAMP- und  $Ca^{2+}$ -bzw. Phosphoinositid-Kaskaden schematisch dargestellt.

### 1.1.1 Der cAMP-Signalweg

$G_s$ -Proteine (siehe Abb. 1.1) aktivieren eine membranständige AC, welche aus ATP cAMP synthetisiert. Dieses führt zu einem Anstieg der  $[cAMP]_i$ . Eine der Hauptwirkungen des sekundären Botenstoffes (*second messenger*) cAMP ist die Aktivierung der Proteinkinase A (PKA). Die inaktive PKA ist ein Heterotetramer aus zwei identischen katalytischen Untereinheiten und zwei identischen regulatorischen Untereinheiten. Durch Bindung von cAMP an die regulatorischen Untereinheiten werden die katalytischen Untereinheiten frei und aktiviert durch Phosphorylierung von Serin- und Threoninresten spezifische Zielproteine (Review: Fimia und Sassone-Corsi, 2001).

$G_i$ -Proteine hemmen die AC. Durch diesen Mechanismus werden alle cAMP-abhängigen



**Abbildung 1.1:** Übersicht über die Hauptsignalwege G-Protein-gekoppelter Rezeptoren. Bindung eines Liganden an einen heptahelicalen G-Protein-gekoppelten Rezeptor führt zu einem Austausch von GDP gegen GTP an der  $\alpha$ -Untereinheit des heterotrimeren G-Proteins. Die  $\alpha$ -Untereinheit eines  $G_s$ -Proteins aktiviert eine AC, und stimuliert so die Synthese von cAMP. cAMP bindet an die regulatorische Untereinheit der PKA, wodurch die katalytische Untereinheit der PKA abdissoziiert und spezifisch Zielproteine phosphoryliert. Die  $\alpha$ -Untereinheit eines  $G_q$ -Proteins führt über die Stimulierung einer PLC zur Hydrolyse von  $PIP_2$  zu  $IP_3$  und DAG.  $IP_3$  bindet an  $IP_3$ -Rezeptor/ $Ca^{2+}$ -Kanäle am ER und führt so zu einem  $Ca^{2+}$ -Ausstrom aus dem ER. Bindung von  $Ca^{2+}$  und DAG an die regulatorische Untereinheit einer PKC aktiviert die katalytische Untereinheit der PKC. Weiterhin wird durch den Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  das Modulatorprotein Calmodulin aktiviert.

nachfolgenden Prozesse, wie die Aktivierung der PKA inhibiert.

### 1.1.2 Der $Ca^{2+}$ -Signalweg

G-Proteine vom  $G_q$ -Typ (siehe Abb. 1.1) aktivieren eine membranständige PLC. Dieses Enzym hydrolysiert das membrangebundene Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat ( $PIP_2$ ) zu Phosphatidylinositol-1,4,5-trisphosphat ( $IP_3$ ) und Diacylglycerol (DAG). Das diffusionsfähige  $IP_3$  bindet an  $IP_3$ -Rezeptor/ $Ca^{2+}$ -Kanäle am endoplasmatischen Retikulum (ER) und führt so zu einem Ausstrom von  $Ca^{2+}$  aus dem ER und damit zu einem Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  (Review: Berridge, 1993; Berridge *et al.*, 2000).  $Ca^{2+}$  und DAG binden an die regulatorische Unterein-

heit einer Proteinkinase C (PKC), wodurch deren katalytische Untereinheit aktiviert wird. Im aktivierten Zustand bindet die sonst frei im Zytosol vorkommende PKC an die Plasmamembran und entfaltet ihre Wirkung durch Phosphorylierung von Serin- und Threoninresten an Zielproteinen (Review: [Parker und Murray-Rust, 2004](#)).

Ein weiteres durch  $\text{Ca}^{2+}$  aktiviertes Modulatorprotein ist Calmodulin. Calmodulin aktiviert zahlreiche Proteine, unter anderem die Calmodulinkinase (CaM-Kinase) (Review: [Hook und Means, 2001](#); [Soderling und Stull, 2001](#)).

Die Speichelsekretion wird über die Aktivierung und oder Inaktivierung dieser *second messenger*-Kaskaden gesteuert. Ein Anstieg der cAMP- und/oder  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration führt letztendlich direkt oder indirekt z.B. zu einer Aktivierung membranständiger Ionenkanäle und Transporter und oder zur Exozytose von Proteinen.

## 1.2 Die Speicheldrüse von *Calliphora vicina* als Modellobjekt

Untersuchungen zur wechselseitigen Beeinflussung der cAMP- und  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalwege wurden in der Vergangenheit vorwiegend an isolierten Einzelzellen oder an Zelllinien in Kultur durchgeführt ([Cooper et al., 1995](#); [Chatton et al., 1998](#); [Garbunova und Spitzer, 2002](#); [Bruce et al., 2003](#); [Brown et al., 2004](#)). Bei dieser Art der Präparation gehen jedoch entscheidende Aspekte wie die Zell-Zell-Kontakte und die Polarität der Zellen verloren.

Das ideale System zur Untersuchung der wechselseitigen Beeinflussung der cAMP- und  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalwege würde aus einer homogenen Zellpopulation bestehen. In dieser homogenen Zellpopulation sollten die normalen Zell-Zell-Kontakte und die Polarität der Zellen erhalten sein. Aufgrund ihres einfachen Aufbaus kommt die Speicheldrüse der Diptere *Calliphora vicina* diesem Idealsystem sehr nahe. Nach der folgenden Beschreibung der mikroskopischen Anatomie und der bisher bekannten Mechanismen der Speichelsekretion wird die Wahl gerade dieses Präparates zur Untersuchung der wechselseitigen Beeinflussung der Signalwege unmittelbar verständlich werden.

### 1.2.1 Morphologische Aspekte

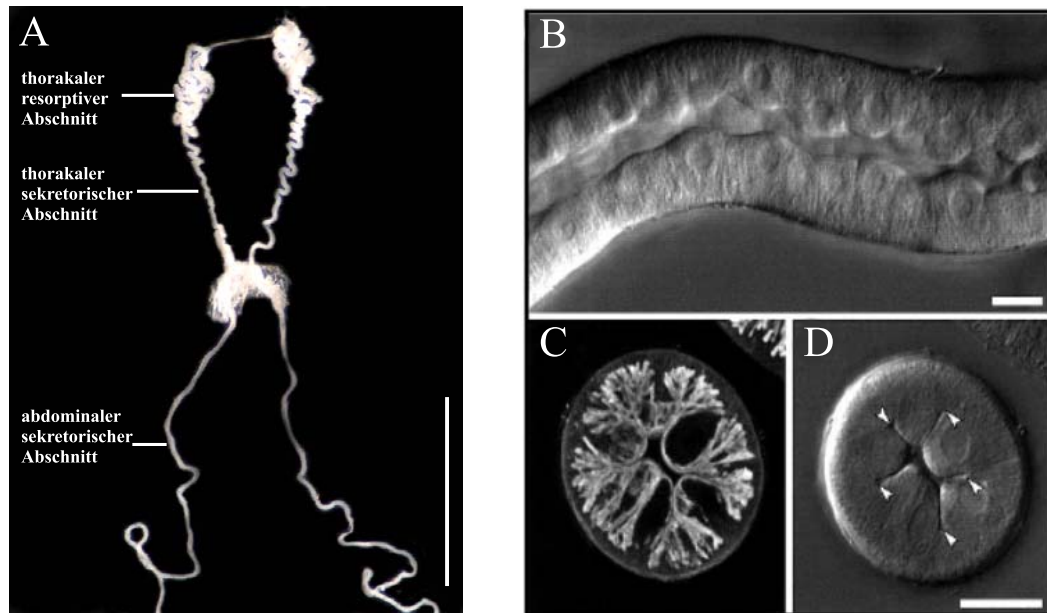
Die Speicheldrüsen der Insekten sind acinös oder tubulär aufgebaut (Review: House, 1980; House und Ginsborg, 1985; Walker, 2003). Dipteren, wie die Schmeißfliege *C. vicina*, besitzen paarige, blind endende, tubuläre Speicheldrüsen, die frei in der Hämolymphe des Tieres liegen. Sie ziehen vom Abdomen des Tieres in den Thorax, vereinigen sich dort zu einem gemeinsamen cuticulären Gang und münden im Kopfbereich in den Hypopharynx. Die Drüsen bestehen aus einem einschichtigen Epithel und sind nicht innerviert (Oschman und Berridge, 1970). Jeder Drüsentubulus besteht aus mehreren funktionellen Abschnitten (siehe Abb. 1.2 und Abb. 1.3). Der abdominale Abschnitt und ein Teil des thorakalen Drüsenabschnittes sind sekretorisch aktiv und produzieren einen isotonischen KCl-reichen Primärspeichel. Weiterhin enthält dieser Speichel die Verdauungsenzyme  $\alpha$ -Amylase,  $\alpha$ -Glukosidase und  $\alpha$ -Galaktosidase (Hansen-Bay, 1978a, b, c). Die großen pyramidal geformten Zellen in diesem Abschnitt sind durch tiefe Einfaltungen der apikalen Membran, die Canaliculi geprägt. Eine weitere Oberflächenvergrößerung in diesen Canaliculi sind dichtgepackte blättchenartige Ausstülpungen der Plasmamembran, die sogenannten Microplicae.

An den thorakalen sekretorischen Teil schließt sich cranial der reabsorbierende Abschnitt der Drüse an. In diesem Teil ist die Drüse stark aufgewunden (Abb. 1.2). Hier sind die Zellen abgeflacht, besitzen keine Canaliculi und nur kurze basale Einfaltungen. In diesem Abschnitt wird der Primärspeichel durch Resorption von  $\text{Na}^+$ -,  $\text{K}^+$ - und  $\text{Cl}^-$ -Ionen modifiziert und als hypotoner Endspeichel über den cuticulären Gang in den Hypopharynx abgegeben (Oschman und Berridge, 1970).

Die Sekretion des Primärspeichels wird durch das biogene Amin Serotonin (5-Hydroxytryptamin, 5-HT) stimuliert (Berridge und Patel, 1968). Dieses wird wahrscheinlich in neurosekretorischen Zellen eines Thorakalganglions (*Ventral thoracic neurosecretory cells*, VTNC) synthetisiert und in die Hämolymphe abgegeben (Brady und Maddrell, 1967; Duve *et al.*, 1988). Weiterhin wurden aus dem Thorakalganglion von *Calliphora vomitoria* drei Neuropeptide (calliFMRRamide 1-3) isoliert, welche ebenfalls in der Lage sind, eine Flüssigkeitssekretion in isolierten Speicheldrüsen zu induzieren (Duve *et al.*, 1992).

Die Rückresorption von  $\text{Cl}^-$ - und  $\text{K}^+$ -Ionen im thorakalen Abschnitt kann durch cAMP aktiviert werden (Oschman und Berridge, 1970). Ob Serotonin und / oder ein anderes biogenes



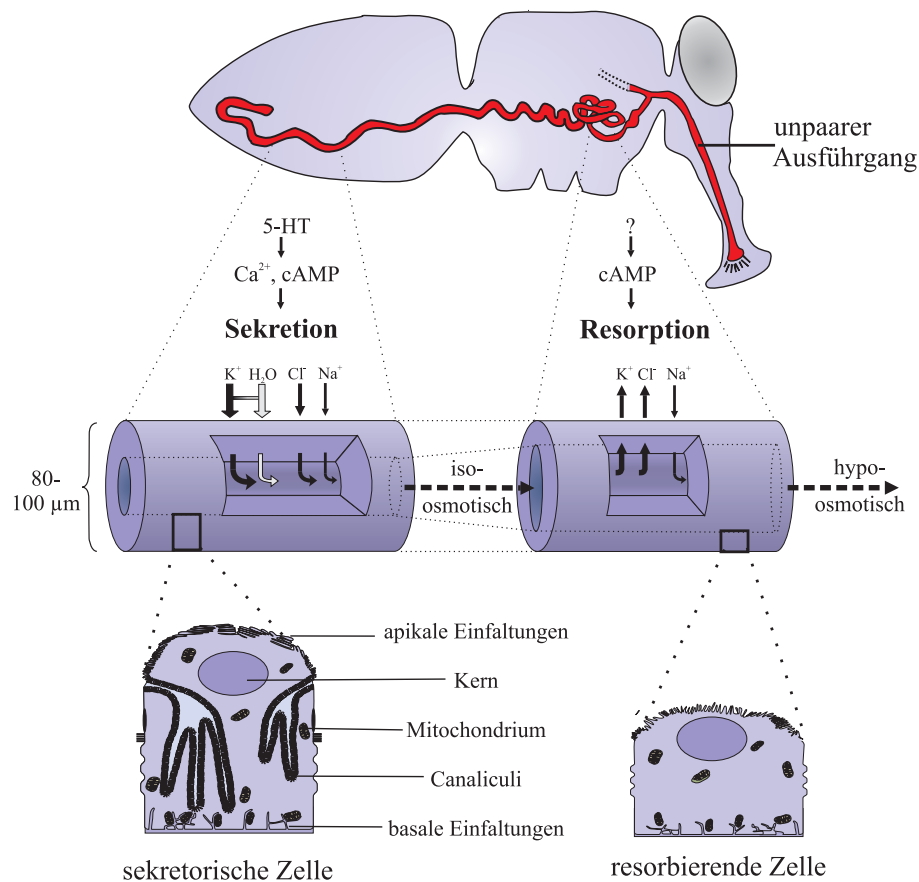


**Abbildung 1.2:** Speicheldrüse von *C. vicina*. (A) Dunkelfeldaufnahme der isolierten Speicheldrüse von *C. vicina* (nach Rotte, 2005). Balken: 3 mm. (B) Differentielle Interferenz-Kontrast (DIC)-Aufnahme eines abdominalen Drüsenabschnittes. (C) Projektion aus 25 konfokalen optischen Schnitten eines 30 µm dicken Querschnittes des abdominalen Abschnittes. Actin wurde mit Hilfe von TRITC-Phalloidin angefärbt. (D) DIC-Aufnahme desselben Querschnittes (B, C und D aus Zimmermann, 2000b). Balken: 20 µm.

Amin diese Rückresorption von  $\text{Cl}^-$ - und  $\text{K}^+$ -Ionen stimuliert, ist nicht bekannt.

### 1.2.2 Die Signalwege in den sekretorischen Zellen der Speicheldrüsen

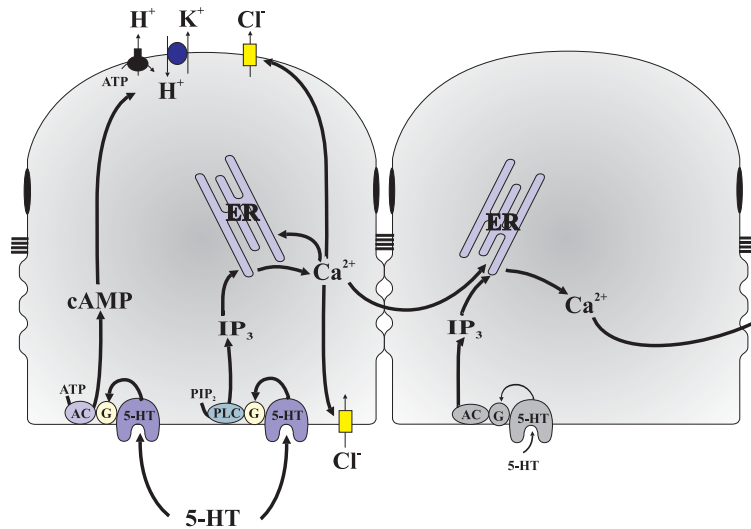
5-HT bindet in den Speicheldrüsen von *C. vicina* an zwei verschiedene G-Protein-gekoppelte Rezeptoren in der basolateralen Membran und aktiviert zwei parallele Signalkaskaden (Abb. 1.4) (Berridge, 1970; Prince *et al.*, 1973; Berridge *et al.*, 1976; Fain und Berridge, 1979a; Berridge und Heslop, 1981). Bindung von 5-HT an den einen Rezeptor führt über die Aktivierung einer AC zu einem Anstieg der  $[\text{cAMP}]_i$ . Ein Anstieg der  $[\text{cAMP}]_i$  induziert die Assemblierung und Aktivierung einer vakuolären-Protonen-ATPase ( $\text{V-H}^+$ -ATPase) vermutlich über eine PKA (Zimmermann *et al.*, 2003; Dames *et al.*, 2006). Diese  $\text{V-H}^+$ -ATPase erzeugt über der Apikalmembran einen elektrochemischen Protonengradienten, dessen Energie wahrscheinlich von einem parallelen  $\text{nH}^+/\text{K}^+$ -Antiporter zum  $\text{K}^+$ -Auswärtstransport genutzt wird (Zim-



**Abbildung 1.3:** Schematische Darstellung der Lage und Funktionsweise der Speicheldrüse von *C. vicina*. Erläuterungen im Text.

mermann *et al.*, 2003). Der Netto- $K^+$ -Transport verursacht eine positive transepitheliale Potentialdifferenz.

Die Bindung von 5-HT an den anderen Rezeptor führt über die Aktivierung der Phosphoinositid-Kaskade zur Hydrolyse von  $PIP_2$  zu  $IP_3$  und DAG (Berridge, 1980a).  $IP_3$  bindet an  $IP_3$ -Rezeptor/ $Ca^{2+}$ -Kanäle am ER und führt zu einer  $Ca^{2+}$ -Freisetzung aus dem ER und damit zu einem Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$ . Dieser Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  bewirkt die Öffnung von  $Ca^{2+}$ -abhängigen  $Cl^-$ -Kanälen in der basolateralen und apikalen Membran, wodurch es aufgrund des positiven transepithelialen Potentials (TEP) zu einem Netto- $Cl^-$ -Transport über das Epithel kommt. Aufgrund des durch den Transport von KCl entstandenen osmotischen Gradienten folgt Wasser passiv in das Lumen (Berridge und Patel, 1968; Berridge, 1970).



**Abbildung 1.4:** Schematische Darstellung der Signalwege in den sekretorischen Zellen von *C. vicina*. Erläuterungen im Text.

### 1.2.3 $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen und $\text{Ca}^{2+}$ -Wellen in den Speicheldrüsen von *C. vicina*

5-HT führt in den Zellen der Speicheldrüse konzentrationsabhängig zu zeitlich/räumlich komplexen Änderungen der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Schwellennahe ( $< 10 \text{ nM}$ ) 5-HT-Konzentrationen lösen intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Wellen aus, die sich vom basalen zum apikalen Zellpol jeder Zelle ausbreiten (Zimmermann, 2000b). Diese  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Wellen werden durch eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus intrazellulären Speichern verursacht (Zimmermann und Walz, 1997; Zimmermann, 1998). Durch  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige negative und positive Rückkopplung auf die Öffnung des  $\text{IP}_3$ -Rezeptor/ $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals kommt es zu intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen (Baumann und Walz, 1989; Iino, 1990; Bezprozvanny *et al.*, 1991; Finch *et al.*, 1991; Zimmermann und Walz, 1999).

Im intakten Zellverband der Speicheldrüsen drücken sich  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen als interzellulär fortgeleitete  $\text{Ca}^{2+}$ -Wellen aus, die sich mit einer Geschwindigkeit von  $27 \pm 7,3 \mu\text{m/s}$  über den Drüsenschlauch ausbreiten (Zimmermann und Walz, 1997). Ursache dieser interzellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Wellen ist der Umstand, dass alle Zellen im Drüsenschlauch über *gap junctions* gekoppelt sind (Zimmermann und Walz, 1999). Dieses ermöglicht  $\text{Ca}^{2+}$ -Diffusion in Nach-

barzellen, deren  $[Ca^{2+}]_i$  niedrig ist. Der geringe  $Ca^{2+}$ -Anstieg führt zu einer Sensitivierung der  $IP_3$ -Rezeptor/ $Ca^{2+}$ -Kanäle für  $IP_3$ . Diese verstärkt die  $IP_3$ -induzierte  $Ca^{2+}$ -Freisetzung (Zimmermann und Walz, 1999). Die  $Ca^{2+}$ -Oszillationen zeigen eine Erhöhung ihrer Frequenz bei ansteigenden (1-10 nM) 5-HT-Konzentrationen.

Bei einer Stimulierung mit sättigenden 5-HT-Konzentrationen ( $> 10$  nM) kommt es zu einem tonischen Anstieg der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration. Dieser tonische Anstieg wird durch  $Ca^{2+}$ -Freisetzung aus dem ER eingeleitet und aufgrund der  $Ca^{2+}$ -Entleerung des ER aufrecht erhalten, weil letzteres einen  $Ca^{2+}$ -Einstrom über die Plasmamembran hervorruft (Putney, 1986, 1990; Zimmermann, 1998). Dieser  $Ca^{2+}$ -Einstrom wird als *store operated  $Ca^{2+}$ -entry* (SOCE) bezeichnet, da er auch unabhängig von einer Stimulierung durch einen Agonisten durch Substanzen hervorgerufen werden kann, welche in der Lage sind, die intrazellulären Speicher zu entleeren (z.B. Thapsigargin, Cyclopiazonsäure) (Putney, 1986, 1990).

### 1.3 Zielstellung dieser Arbeit

Berridge *et al.* haben zwischen 1968 und 1983 am Modell der Fliegenspeicheldrüse entscheidende Aspekte der Signalübertragung in tierischen Zellen aufgeklärt (Berridge und Patel, 1968; Berridge *et al.*, 1976; Berridge, 1980a, 1982b, 2005). Diese Arbeiten lieferten einen wesentlichen Beitrag zum Verständnis der molekularen Teilschritte des cAMP-Signalweges und des  $IP_3/Ca^{2+}$ -Signalweges. Teilaspekte dieser Arbeiten ließen vermuten, dass sich der  $IP_3/Ca^{2+}$ -Signalweg und der cAMP-Signalweg gegenseitig beeinflussen. So zeigte sich, dass bei einer Stimulierung mit 5-HT die cAMP-Konzentration in den Speicheldrüsenzellen in  $Ca^{2+}$ -freien Versuchslösungen stärker ansteigt als in  $Ca^{2+}$ -haltiger Lösung (Prince *et al.*, 1973). Dies deutet auf eine hemmende Wirkung von  $Ca^{2+}$  auf den cAMP-Signalweg hin. Weiterhin zeigten Messungen des TEP der isolierten Drüsen, dass cAMP die 5-HT induzierten TEP-Oszillationen verändert. Diese Veränderungen des TEP lassen eine Beeinflussung des  $Ca^{2+}$ -Signalweges durch cAMP vermuten (Berridge, 1981a, b). Ebenso konnte keine cAMP-induzierte Flüssigkeitssekretion unter  $Ca^{2+}$ -freien Bedingungen beobachtet werden (Berridge und Prince, 1972a).

In der vorliegenden Arbeit sollen die Kenntnisse der cAMP- und  $IP_3/Ca^{2+}$ -vermittelten Signal-

übertragung am Modell der Speicheldrüse von *C. vicina* vertieft werden. Ein wesentliches Ziel der Untersuchungen war die Frage, ob/wie sich die parallel aktivierten cAMP- und  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalwege wechselseitig beeinflussen. Zur Untersuchung möglicher Wechselwirkung zwischen dem  $\text{IP}_3/\text{Ca}^{2+}$ -Signalweg und dem cAMP-Signalweg ist es von Vorteil, diese Wege pharmakologisch voneinander trennen zu können. Substanzen wie 5-Fluoro- $\alpha$ -Methyltryptamin (5-F- $\alpha$ -MT) sowie Histamin (2-(4-imidazolyl)ethylamin) wurden von Berridge *et al.* als Substanzen genutzt, um in den Speicheldrüsen von *C. vicina* selektiv den cAMP-Signalweg (getrennt vom  $\text{IP}_3/\text{Ca}^{2+}$ -Signalweg) zu aktivieren (Berridge, 1981a, b; Berridge und Heslop, 1981). In der vorliegenden Arbeit sollte zunächst mittels TEP-Messungen und intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Messungen die Wirkung dieser Agonisten überprüft und charakterisiert werden. Vertiefend sollte die Frage untersucht werden, welche Bedeutung den Proteinkinasen bei den Wechselwirkungen dieser beiden Signalwege zukommt.

# Kapitel 2

## Material und Methoden

### 2.1 Verwendete Substanzen und Lösungen

Laborchemikalien wurden von den Firmen Axxora, Biolog, Calbiochem, Fluka, Merck, Roth, Serva und Sigma bezogen und hatten Analysequalität. Angaben über die Zusammensetzung der verwendeten Medien finden sich in Tab. 2.1 und Tab. 2.2. Für das Ansetzen der Medien wurde Reinstwasser (Millipore Qualität, MQ H<sub>2</sub>O ) verwendet. Angaben über Substanzen, die in den Experimenten Verwendung finden, werden in in Tab. 2.3 aufgeführt.

**Tabelle 2.1:** Zusammensetzung der verwendeten Intrazellulären Medien (ICM)

Substanz	Konzentration im	
	ICM (ATP)	ICM (GTP)
NaCl	20 mM	20 mM
KCl	125 mM	125 mM
MgCl <sub>2</sub>	2 mM	2 mM
CaCl <sub>2</sub>	60 $\mu$ M	60 $\mu$ M
EGTA	100 $\mu$ M	100 $\mu$ M
Hepes	10 mM	10 mM
ATP	3 mM	
GTP		3 mM

Tabelle 2.2: Zusammensetzung der verwendeten Ringer-Lösungen

Substanz	Konzentration im			
	Ringer	Ringer, Cl <sup>-</sup> -frei	Ringer, Ca <sup>2+</sup> -frei	Ringer, K <sup>+</sup> -frei
NaCl	128 mM		128 mM	128 mM
KCl	10 mM		10 mM	
MgCl <sub>2</sub>	2 mM		2 mM	2 mM
CaCl <sub>2</sub>	2 mM			2 mM
Maleinsäure	2,8 mM	2,8 mM	2,8 mM	2,8 mM
Na-Glutamat	3mM	3 mM	3 mM	3 mM
Tris-HCl	10 mM		10 mM	
Glucose	10 mM	10 mM	10 mM	10 mM
Na-Isotionat		128 mM		
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		5 mM		
Ca <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> x2H <sub>2</sub> O		2 mM		
MgSO <sub>2</sub>		2 mM		
Tris Base		10 mM		10 mM
EGTA			2 mM	
BaCl <sub>2</sub>				7,5 mM

Tabelle 2.3: Verwendete Substanzen

Substanz	Konz. im Versuch	Konz. der Stammlsg.	Lsg.-mittel für Stammlsg.	Herkunft	Funktion
Serotonin (5-HT)	1-10 nM	1 μM	MQ H <sub>2</sub> O	Sigma	biogenes Amin/Agonist
Histamin	0,5-10 mM	1 M	MQ H <sub>2</sub> O	Sigma	biogenes Amin/Agonist
5-Fluoro-α-Methyltryptamin	100 μM	1 mM	MQ H <sub>2</sub> O	Sigma	Agonist
Yohimbin	1/10 μM	10 mM	DMSO	Sigma	Hemmstoff für 5-HT <sub>7</sub> -Rezeptoren
IBMX	100/500 μM	100/500 mM	DMSO	Sigma	Hemmstoff von Phosphodiesterasen
Forskolin	10/100 μM	10 mM/100 mM	DMSO	Axxora	Aktivator der Adenylatzyclase
cAMP	0,1-10 mM		Ringer	Sigma	Botenstoff
Sp-cAMPs	10/100 μM	10 mM	MQ H <sub>2</sub> O	Tocris/Biolog	cAMP Agonist/ Aktivator der PKA
6-BNZ-cAMP	10/100 μM	10 mM	MQ H <sub>2</sub> O	Biolog	Aktivator der PKA
6-MBC-cAMP	10/100 μM	10 mM	MQ H <sub>2</sub> O	Biolog	Aktivator der PKA

Tabelle 2.3: Verwendete Substanzen, Fortsetzung

Substanz	Konz. im Versuch	Konz. der Stammlsg.	Lsg.-mittel für Stammlsg.	Herkunft	Funktion
6-Phe-cAMP	10/100 $\mu$ M	10 mM	MQ H <sub>2</sub> O	Biolog	Aktivator der PKA
8-Br-Rp-cAMPs	10/100 $\mu$ M	10 mM	MQ H <sub>2</sub> O	Tocris/Biolog	cAMP Antagonist
H-89	10 $\mu$ M	10 mM	DMSO	Calbiochem	Hemmstoff der PKA
8-pCPT-2'-O-Me-cAMP	10/100 $\mu$ M	10 mM	MQ H <sub>2</sub> O	Biolog	Aktivator des EPAC
8-pHPT-2'-O-Me-cAMP	10/100 $\mu$ M	10 mM	MQ H <sub>2</sub> O	Biolog	Aktivator des EPAC
8-pMeOPT-2'-O-Me-cAMP	10/100 $\mu$ M	10 mM	MQ H <sub>2</sub> O	Biolog	Aktivator des EPAC
U73122	10 $\mu$ M	10 mM	MQ H <sub>2</sub> O	Calbiochem	Hemmstoff der PLC
$\beta$ -Escin	200 $\mu$ g/ml	200 mg/ml	DMSO	Sigma	Permeabilisierung
Fura-2, AM	5 $\mu$ M	1 mM	DMSO	Biotrend	Ca <sup>2+</sup> -sensitiver Fluoreszenzfarbstoff
MnCl <sub>2</sub>	20 mM	1 M	MQ H <sub>2</sub> O	Sigma	Auslöschung der Fura-2 Fluoreszenz
Ionomycin	10 $\mu$ M	10 mM	DMSO	Calbiochem	Ca <sup>2+</sup> -Ionophor

## 2.2 Verwendete Antikörper

Die in dieser Arbeit verwendeten primären Antikörper sind in Tab. 2.4 zusammengefasst. Geeignete Sekundärantikörper (Meerrettichperoxidase-Konjugate, (HRPO) für Western-Blot-Analysen; Fluoreszenzfarbstoff-Konjugate für Immunofluoreszenzuntersuchungen) sind in Tab. 2.5 aufgelistet.



**Tabelle 2.4:** Verwendete primäre Antikörper

prim. Antikörper	Einsatz im Blot	Einsatz Immunofluoreszenz	Spezies	Typ	Herkunft
anti-PKA-RI	1:10000	-	Kaninchen	polyklonal	Kalderon und Rubin (1988)*
anti-PKA-RII	1:1000	1:500	Kaninchen	polyklonal	Kalderon und Rubin (1988)*
anti-PKA-C1 (DC0)	1:1000	1:100	Kaninchen	polyklonal	Kalderon und Rubin (1988)*
anti-cPKC $\alpha$ (sc-208)	1:10000	1:200	Kaninchen	polyklonal	Santa Cruz Biotechn., Inc., Heidelberg

\*Columbia University, New York, USA

**Tabelle 2.5:** Verwendete sekundäre Antikörper

sek. Antikörper	Einsatz im Blot	Einsatz Immunofluoreszenz	konjugiert	Herkunft
GAR (goat-anti-rabbit)	1:200	-	HRPO	Dianova (#111-035-045)
GAR-Cy3 (goat-anti-rabbit)	-	1:500	Cy3	Dianova (#111-165-045)

## 2.3 Tierhaltung und Präparation

Die Schmeißfliegen *Calliphora vicina* Robineau-Desvoidy (Diptera: Calliphoridae) wurden bei 27°C in einem Licht-Dunkel-Rhythmus von 12 h : 12 h gehalten. Die Tiere hatten freien Zugang zu Wasser und Futter, bestehend aus in Wasser gelöster Hefe, einem in Wasser gelösten Ovomaltine-Zucker-Gemisch und Blütenpollen (Nektapoll, Werner Seip Bienenzuchtbedarf, Butzbach-Ebersgöns). Für die Versuche wurden 1-3 Wochen alte Imagines beider Geschlechter verwendet. Für die Präparation der Speicheldrüsen wurde das Abdomen der Fliegen abgetrennt, in eine mit Sylgard (Drawin Vertriebs-GmbH, Ottobrunn/Riemerling) ausgegossene und mit Ringer gefüllte Petrischale überführt und mit einer Insektennadel fixiert. Die Speicheldrüsen sind über Tracheen an den Luftsäcken befestigt und können vorsichtig mit einer Pinzette aus dem Abdomen herausgezogen werden. Für die biochemischen Arbeiten wurden auch die Köpfe

abgetrennt und weiter wie unten beschrieben verarbeitet. Weiterhin wurden Fliegen der Art *Drosophila melanogaster* (L.) (Diptera: Drosophilidae) (Stamm Oregon Red) aus laboreigener Zucht verwendet. Diese werden in mit Wattestopfen verschlossenen Plastikröhrchen auf Standard Fliegenmedium (Instant Drosophila Medium, Sigma, München) aufgezogen. Für die Versuche wurden die Köpfe abgetrennt und entsprechend weiter verarbeitet.

## 2.4 Biochemische Methoden

### 2.4.1 Probenaufbereitung

Zur Aufkonzentrierung der Proteine aus dem Speicheldrüsenhomogenat wurde eine nach [Gorg et al. \(1997\)](#) modifizierte Trichloressigsäure (TCA)/Azeton-Fällung durchgeführt. Hierzu wurde 10% TCA in Azeton gelöst und auf  $-80^{\circ}\text{C}$  gekühlt. Die Gewebeproben wurden wie oben beschrieben präpariert und sofort in ein mit flüssigem  $\text{N}_2$ -gekühltes Reaktionsgefäß übertragen. Nach der Präparation wurde das kalte TCA/Azeton Gemisch zugegeben und die Probe 2 Tage bei  $-80^{\circ}\text{C}$  kryosubstituiert. Nach dem Aufwärmen auf Raumtemperatur (RT) wurde das Azeton abgenommen, die Präparate bei RT getrocknet und anschließend in reduzierendem Probenpuffer (Roti©Load1, Roth, Karlsruhe) homogenisiert. Nach der Homogenisation wurden die Proben 4 min auf  $94^{\circ}\text{C}$  erwärmt und anschließend 5 min bei 1200 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert, das Pellet wurde verworfen.

### 2.4.2 Diskontinuierliche Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Proteine erfolgte unter denaturierenden Bedingungen mit einem Sodium-dodecylsulfat-Polyacryl-Elektrophorese-Gel-System (SDS-PAGE) nach [Laemmli \(1970\)](#). Bei der angewandten diskontinuierlichen Gelelektrophorese wurde ein Trenngel mit 12% Acrylamid<sup>1,2</sup> von einem Sammelgel mit 4,5% Acrylamid<sup>1,3</sup> überschichtet. Die Taschen des Gels wurden jeweils mit dem Homogenat aus zwei *D. melanogaster* Köpfen, 1/10 *C. vicina* Kopf bzw. vier *C. vicina* Speicheldrüsen beladen. Die Elektrophorese lief bei Raumtempe-

ratur bei konstanter Stromstärke von 15 mA. Nach der Elektrophorese wurden die Gele mit *Coomassie-Blue*<sup>4,5</sup> gefärbt oder die Proteine auf Nitrozellulosemembran transferiert (siehe Abschn. 2.4.3).

<sup>1</sup> Acrylamid-Lösung:	30% (v/v) Acrylamid/Bis-Acrylamid (37,5:1)
<sup>2</sup> Sammelgel :	4,5% (v/v) Acrylamid-Lsg. 0,5 M Tris-HCl, Ph 6,8 0,8% (v/v) SDS, 0,45% (v/v) APS, 0,3% (v/v) TEMED
<sup>3</sup> Trenngel:	12% (v/v) Acrylamid-Lsg., 1,5 M Tris pH 8,8, 0,8% (v/v) SDS, 0,45% APS, (v/v) 0,1% TEMED
<sup>4</sup> <i>Coomassie-Blue</i> -Färbelösung:	0,1% (w/v) <i>Coomassie-Blue</i> , 50% (v/v) Methanol, 20% (v/v) Essigsäure
<sup>5</sup> Entfärber:	10% (v/v) Methanol, 7% (v/v) Essigsäure
SDS-Laufpuffer:	25 mM Tris/HCL, 250 mM Glycin, 0,1% SDS, pH 8,8

### 2.4.3 Proteintransfer

Der Proteintransfer auf Nitrozellulose (Schleicher & Schuell; Roth, Karlsruhe) erfolgte im *Semi-Dry*-Verfahren zwischen Transferpuffer<sup>1,2,3</sup> getränkten Filterpapieren (Whatman; Roth, Karlsruhe). Der Transfer erfolgte bei 0,8 mA/cm<sup>2</sup>, 20 V und 6 W für 90 min. Nach dem Transfer wurde die Membran einige Male mit MQ H<sub>2</sub>O gespült und der erfolgreicher Transfer durch Färbung mit Ponceau-Rot-Färbelösung<sup>4</sup> (Serva, Heidelberg) überprüft. Hierzu wurde die Membran 1-3 min in Ponceau-Rot-Färbelösung geschwenkt und mit MQ H<sub>2</sub>O bis zum optimalen Kontrast zwischen gefärbten Proteinbanden und Hintergrund gespült.

<sup>1</sup> Anodenpuffer I:	0,3 M Tris, 20% (v/v) Methanol, pH 10,4
<sup>2</sup> Anodenpuffer II:	25 mM Tris, 20% (v/v) Methanol, pH 10,4
<sup>3</sup> Kathodenpuffer:	40 mM 6-Amino-n-Hexansäure, 20% (v/v) Methanol, pH 7,6
<sup>4</sup> Ponceau-Rot-Färbelösung:	0,1% (w/v) Ponceau-Rot , 3% (w/v) Trichloressigsäure

### 2.4.4 Immundetektion

Die Nitrozellulosemembranen wurden 30 min mit Trockenmilchpulver<sup>1</sup> (Bio-Rad, München) blockiert. Danach wurde mehrmals 5 min mit TWEEN-Puffer<sup>2</sup> gewaschen und anschließend über Nacht bei 4°C mit dem primären Antikörper verdünnt in TWEEN-Puffer inkubiert. Angaben über die verwendeten primären Antikörper finden sich in Tab. 2.4. Nach mehrmaligem Waschen mit TWEEN-Puffer und zwischenzeitlichem Spülen mit Harnstoff-Puffer<sup>3</sup>, zum Lösen der nicht spezifischen Bindungen, wurde mit dem Sekundärantikörper verdünnt in TWEEN-Puffer 1 h bei Raumtemperatur inkubiert (siehe Tab.2.4). Wiederum wurde dreimal

mit TWEEN-Puffer und anschließend mit Wasser gewaschen. Anschließend wurden die gebundenen Enzyme durch Chemilumineszenz (ECL-Kit, Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate, Pierce, Perbio, Bonn) detektiert.

<sup>1</sup>Trockenmilchpulver: 5% Trockenmilchpulver in TWEEN

<sup>2</sup>TWEEN-Puffer: 0,1% TWEEN 20, 10 mM TRIS-Base, 150 mM NaCl, pH 7,5

<sup>3</sup>Harnstoff-Puffer: 2 M Urea, 0,1 M Glycin, 1% Triton X 100

## 2.4.5 Messung der Proteinkinase-Aktivität

Die Aktivitäten der Proteinkinase A (PKA), Proteinkinase C (PKC) und CaM-Kinase II wurden nach der von Müller (1997a) entwickelten Methode bestimmt. Hierbei wird die Kinase-Aktivität *in vitro* durch die Phosphorylierung der Kinase-spezifischen Substrate in Gegenwart von radioaktiv markiertem Adenosintriphosphat ( $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP) gemessen. Um die Kinaseaktivität zu Zeitpunkten nach der Stimulierung zu bestimmen, wurde jeweils eine Speicheldrüse vom entsprechenden Versuchsansatz auf einen in flüssigem Stickstoff gekühlten Metallstift angefroren und in einer Glaskapillare in 20  $\mu$ l DEAE-Puffer<sup>1</sup> homogenisiert. Die Phosphorylierung wurde durch Zugabe von 10  $\mu$ l des Homogenats zu 20  $\mu$ l des entsprechenden Phosphorylierungspuffers<sup>2,3,4</sup> gestartet. Die Aktivität der PKA wurde durch die Phosphorylierung des Phosphatase-Inhibitors I gemessen, welcher bei Insekten ein spezifisches Substrat für die PKA ist (Hildebrandt und Müller, 1995). Als Positivkontrolle der PKA diente eine Stimulierung mit 5  $\mu$ M cAMP. Die Aktivität der PKC wurde durch die Phosphorylierung von MARCKS-Protein (Myristoyliertes, Alanin-reiches PKC-Substrat) ermittelt, welches ein spezifisches Substrat für die PKC aus Insekten ist (Müller, 1997a). Zur Ermittlung der Spezifität des Tests wurde die Phosphorylierung in Gegenwart von 2 mM CaCl<sub>2</sub> bestimmt. Die Aktivität der CaM-Kinase II wurde durch die Phosphorylierung eines synthetischen Peptides gemessen, welches die Autophosphorylierungsregion der CaM-Kinase II besitzt. Die Spezifität dieses Substrates für CaM-Kinase II in Insekten wurde bereits nachgewiesen (Altfelder *et al.*, 1991). Die Phosphorylierung wurde durch Zugabe von 6  $\mu$ l SDS-Probenpuffer<sup>4</sup> gestoppt. Nach der Phosphorylierung wurden die Proteine der Versuchsansätze in der diskontinuierlichen Gelelektrophorese aufgetrennt. Nach der Trennung wurden die Gele fünf Minuten fixiert, 30 min in Wasser gewaschen und auf Whatman-Papier (Roth, Karlsruhe) in einem Vakuum-Geltrockner

30 min getrocknet (LKB SLAB Gel Dryer). Zur Quantifizierung wurden die Gele jeweils auf einem Röntgenfilm (Kodak X-Omat AR, Sigma, München) über Nacht exponiert. Die Filme wurden entwickelt und auf einem Scanner digitalisiert. Die Schwärzung der phosphorylierten Banden wurde densitrometrisch ausgewertet, und jeweils auf die Gesamtschwärzung der betroffenen Gelspur normiert.

<sup>1</sup> DEAE-Puffer:	50 mM TRIS, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 10 mM Mercaptoethanol
<sup>2</sup> PKA-Phosphorylierungspuffer:	1 $\mu$ Ci ( $\gamma$ <sup>32</sup> P) ATP, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 10 $\mu$ M ATP, 2 $\mu$ g Phosphatase Inhibitor I, 50 mM TRIS-HCl, pH 7, 10 $\mu$ M Mercaptoethanol, 1 mM EGTA
<sup>3</sup> PKC-Phosphorylierungspuffer:	1 $\mu$ Ci ( $\gamma$ <sup>32</sup> P) ATP, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 10 $\mu$ M ATP, 6 $\mu$ g MARCKS, 50 mM TRIS-HCl, pH 7, 10 $\mu$ M Mercaptoethanol, 1 mM EGTA
<sup>4</sup> CaM-Kinase II-Phosphorylierungspuffer:	61 $\mu$ M Ci ( $\gamma$ <sup>32</sup> P) ATP, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 10 $\mu$ M ATP, 2 $\mu$ g CaM Kinase II Substrat, 50 mM TRIS-HCl, pH 7, 10 $\mu$ M Mercaptoethanol, 1 mM EGTA
<sup>4</sup> SDS-Probenpuffer:	0,5 M TRIS, 0,5% SDS, 5% Mercaptoethanol, 20% Glycin, 5% Bromphenolblau

## 2.5 Mikroskopische Techniken

### 2.5.1 Herstellung haftfähiger Deckgläser

Zur Anhaftung von Gefrierschnitten wurden Deckgläser (Roth, Karlsruhe) mit Poly-L-Lysin beschichtet. Hierzu wurden Deckgläser in entsprechende Gestelle (Plano GmbH, Wetzlar) platziert, in Seifenwasser gewaschen und anschließend mit Leitungswasser gespült. Die Gläser wurden dann 5 min in Poly-L-Lysin<sup>1</sup> gewaschen und bei 60°C getrocknet. Beschichtete Deckgläser wurden bei Raumtemperatur über einen längeren Zeitraum gelagert. Das Poly-L-Lysin wurde filtriert und im Kühlschrank aufbewahrt.

Zum stabilen Fixieren der Drüsen auf die Deckgläser für mikrofluorometrische Ca<sup>2+</sup>-Messungen, wurden zwei Beschichtungsverfahren angewandt. Zum einen wurden die Deckgläschen mit einem Tropfen (1,5  $\mu$ l) Cell Tak (New England Biolabs, Frankfurt/Main) beschichtet und 10-15 min bei 60°C getrocknet. Die so beschichteten Gläser wurden am selben Tag verwendet. Das zweite Verfahren bestand aus einer Beschichtung der Deckgläser mit Vectabond<sup>TM</sup> (Axxora, Grünberg). Hierzu wurden die Deckgläser in Gestelle (Plano GmbH, Wetzlar) platziert und 5 min in Azeton gewaschen. Anschließend kamen die Gläser für weitere 5 min in die Vectabond<sup>TM</sup>-Lösung<sup>2</sup> und wurden mehrmals mit MQ H<sub>2</sub>O gespült. Nach dem

Trocknen bei 37°C konnten die Deckgläser bei Raumtemperatur gelagert werden.

<sup>1</sup> Poly-L-Lysin-Lösung: 10% Poly-L-Lysin in MQ H<sub>2</sub>O

<sup>2</sup> Vectabond<sup>TM</sup>-Lösung: 1,86% (v/v) Vectabond<sup>TM</sup> in Azeton

## 2.5.2 Kryostatschnitte

Für die Anfertigung von Kryostatschnitten wurden die präparierten Drüsen 1 h in 4% Paraformaldehyd<sup>1</sup> fixiert und anschließend zweimal 10 min in Phosphatpuffer gewaschen. Nach dem Fixieren erfolgte eine stufenweise Entwässerung der Drüsen durch eine 10%ige Sucrose-Lösung<sup>3</sup> für 10 min und eine 25%ige Sucrose-Lösung<sup>4</sup> bei 4°C über Nacht. Zum Einfrieren wurde ein Tropfen *Tissue Embedding Medium* (Plano GmbH, Wetzlar) auf eine gekochte Schweineleber gegeben, welche vorher auf einem Stück Kork geklebt wurde. In das *Tissue Embedding Medium* wurden nun die Drüsen gegeben, in Methylbutan eingefroren, das mit flüssigem N<sub>2</sub> gekühlt war. Eingefrorene Proben wurden bei -80°C gelagert. An einem Gefriermikrotom (HM 500 OM Microm, Edgewater (USA)) wurden 8 µm dicke Gefrierschnitte angefertigt und auf Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläser übertragen. Diese wurden bei 4°C gelagert.

<sup>1</sup> Paraformaldehyd-Lsg: 4% (w/v) Paraformaldehyd in 0,1 M Phosphatpuffer

<sup>2</sup> Phosphatpuffer: 0,2 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,2 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

<sup>3</sup> 10%ige Sucroselsg: 10% (w/v) Sucrose in 0,1 M Phosphatpuffer

<sup>4</sup> 25%ige Sucroselsg: 25% (w/v) Sucrose in 0,1 M Phosphatpuffer

## 2.5.3 Indirekte Immunfluoreszenz

Für Immunfluoreszenzuntersuchungen wurden Doppelmarkierungen durchgeführt. Die verwendeten Antikörper werden im jeweiligen Ergebnisteil aufgeführt. Als Sekundärantikörperkonjugate wurden gegen speziesspezifische Immunglobuline (IgG) gerichtete Antikörper der Ziege verwendet, die mit Fluoreszenzfarbstoffen konjugiert waren. F-Aktin wurde mit OregonGreen-Phalloidin angefärbt.

Die luftgetrockneten Gefrierschnitte wurden mit einem Fettstift umrandet, und für 10 min mit Tween 20<sup>1</sup> permeabilisiert. Anschließend wurden die Schnitte mit einer NH<sub>4</sub>Cl Lösung<sup>3</sup> für 10 min inkubiert. Nach dem Waschen mit gefiltertem Phosphatpuffer (PBS)<sup>2</sup> (5 min)

wurden die Schnitte zur Verringerung der unspezifischen Antikörperbindungen 10 min mit einer Blockierungs-Lösung<sup>4</sup> behandelt. Danach wurde mit dem primären Antikörper in PBS 3 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dem Waschen mit PBS (dreimal 5 min) wurden die Schnitte 1 h mit dem sekundären Antikörper in PBS inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte mit PBS gewaschen, kurz in MQ H<sub>2</sub>O getaucht und in Mowiol (Calbiochem, Heidelberg) eingebettet. Nach dem Aushärten des Mowioles wurden die Deckgläschen zur Versiegelung mit Nagellack umrandet.

- <sup>1</sup>Tween 20: 0,01% (v/v) Tween 20 in PBS  
<sup>2</sup>PBS: 0,14 M NaCl, 3 mM KCl, 0,2 mM K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4  
<sup>3</sup>NH<sub>4</sub>Cl-Lsg.: 50 mM Na<sub>4</sub>Cl in PBS  
<sup>4</sup>Blockierungs Lösung: 1% (w/v) NGS, 0,8% (w/v) BSA, 0,1% (w/v) Fisch Gelatine, 0,5% (v/v) Triton

## 2.5.4 Mikroskopie und Bildverarbeitung

Die morphologischen Untersuchungen wurden am Konfokalmikroskop LSM 510 der Firma Carl Zeiss durchgeführt. Es wurden Laser der Anregungswellenlängen 488 nm und 543 nm verwendet. Zur Detektion der bei 488 nm angeregten Fluoreszenz wurde ein Bandpassfilter 505-530 nm verwendet. Zur Detektion der bei 543 nm angeregten Fluoreszenz wurde ein Langpassfilter 560 nm verwendet. Die Bildbearbeitung, wie Veränderungen von Kontrast und Helligkeit, erfolgte mit dem Programm 'Photo Paint' (Corel Corporation, Unterschleißheim), Anordnung und Gestaltung erfolgte in 'Corel Draw 11.0' (Corel Corporation, Unterschleißheim).

## 2.5.5 Mikrofluorometrische Ca<sup>2+</sup>-Messungen

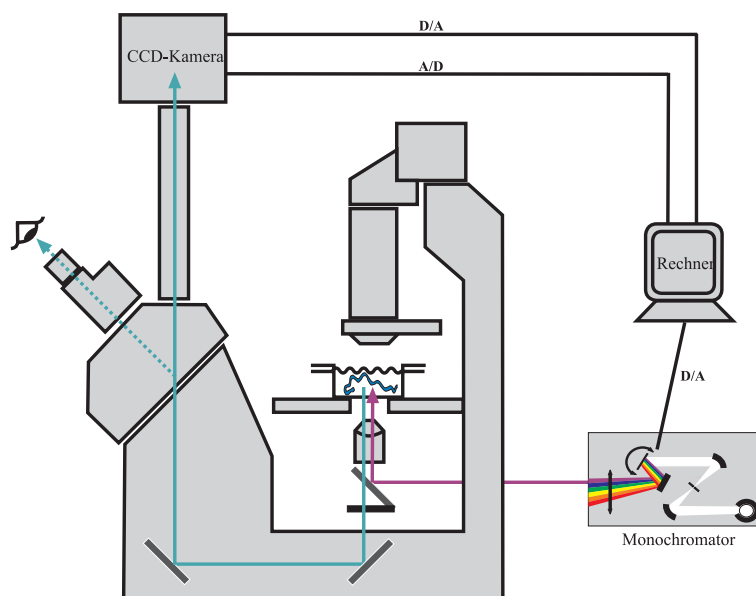
Veränderungen der freien Ca<sup>2+</sup>- Konzentration im Zytosol oder der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration im Lumen des endoplasmatischen Retikulums der Speicheldrüsenzellen wurden mit den Ca<sup>2+</sup>-sensitiven Farbstoffen Fura-2 oder Mag-Fura-2 gemessen. Als AM-Ester sind die Farbstoffe lipophil und diffundieren durch die Plasmamembran in die Zellen. In den Zellen wird der Ester durch unspezifische zytosolische Esterasen hydrolysiert. Die freien Farbstoffmoleküle binden jeweils ein Ca<sup>2+</sup>-Ion und verändern hierbei das Absorptionsspektrum. Bei Ca<sup>2+</sup>-Bindung ver-



schiebt sich das Absorptionsmaximum von 380 nm auf 340 nm. Bei Veränderung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ergeben sich somit gegenläufige Änderungen der Fluoreszenzintensitäten  $F_{340}$  und  $F_{380}$ .

### 2.5.5.1 Versuchsdurchführung und Auswertung

Für die Messungen wurden die isolierten Drüsen 45-60 min mit 5  $\mu\text{M}$  Fura-2, AM bzw. 20 min mit 0,5  $\mu\text{M}$  Mag-Fura-2, AM beladen. Nach der Inkubation wurden die Drüsen auf ein haftfähiges Deckgläschen geklebt und in eine Messkammer (4 mm x 14 mm; Gesamtvolumen  $\approx 200 \mu\text{l}$ ) gebracht. Während des Versuchs wurden die Drüsen mit einer Geschwindigkeit von 1 ml/min mit den Versuchslösungen überspült. Abbildung 2.1 illustriert schematisch den Aufbau der Apparatur.



**Abbildung 2.1:** Schematische Darstellung der Apparatur für abbildende  $\text{Ca}^{2+}$ -Messungen (*ratiometric imaging*). Erläuterungen im Text.

Die Messungen erfolgten an einem Zeiss Axiovert 135TV Mikroskop (Objektiv: Neofluar 20, n.A. 0,75). Das Anregungslicht entstammte einer 75 W Xenonkurzbogenlampe (Ushio; msscientific Chromatographie-Handel GmbH, Berlin) in einem Visichrom High Speed Polychro-



matorsystem (Visitron Systems GmbH, Puchheim). Das erzeugte monochrome Licht wurde über eine Quarzfaser in das Mikroskop eingekoppelt. Licht der Anregungswellenlängen 340 nm und 380 nm für Fura-2 und Mag-Fura-2 wurde über einen 485 nm Strahlteiler auf das Präparat reflektiert. Das emittierte Licht wurde über den 485 nm Strahlteiler durch einen 515-565 nm Bandpassfilter selektiert. 340/380 nm Bildpaare wurden alle 2 s über eine gekühlte Raster frame-transfer-CCD-Camera (TE/CCD-512EFT, Princeton Instruments Corp., Trenton, NJ, USA) in einer Auflösung von 12 Bit aufgenommen und digitalisiert. Jeweils 5 Bildpunkte wurden zusammengefasst (Binning 5x5). Die Steuerung des Monochromators und der Bildaufnahme erfolgte mit dem Programm 'MetaFluor' (Version 4.6r7 Meta Imaging Series, Universal Imaging Corp., West Chester, PA, USA). Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm 'SigmaPlot 8.0' (Jandel Scientific, San Rafael, CA, USA).

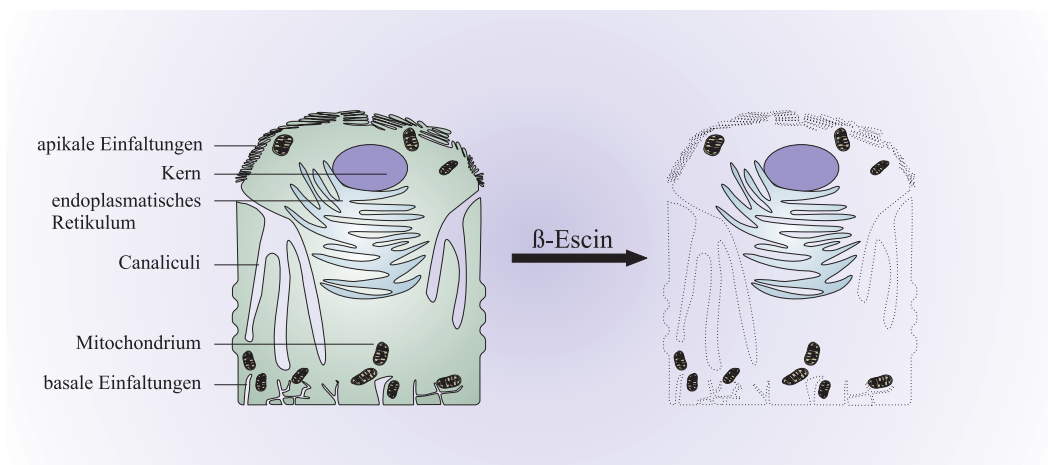
Für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Messungen wurden die fluorochromierten Drüsen sequentiell mit den Wellenlängen 340 nm und 380 nm angeregt. Aus den Abbildungen für jeden Bildpunkt wird der Quotient  $F_{340} / F_{380}$  (*ratio*) gebildet. Die *ratio* sollte weder von der Schichtdicke noch von der Farbstoff-Konzentration, sondern nur von der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration abhängig sein (Grynkiewicz *et al.*, 1985). Zur Ermittlung der Autofluoreszenz wurde nach jeder Messung 20 mM  $\text{MnCl}_2$  zugegeben. Da Fura-2 eine größere Affinität zu  $\text{Mn}^{2+}$  als zu  $\text{Ca}^{2+}$  hat, findet eine Verdrängung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus den Komplexverbindungen statt, und die Fura-2-Fluoreszenz wird gelöscht. Das so entstandene Hintergrundbild wurde bei der Auswertung von allen zuvor aufgenommenen Bildern abgezogen. Prinzipiell können mit Hilfe des Grynkiewicz-Formalismus (Grynkiewicz *et al.*, 1985)

$$[\text{Ca}^{2+}] = \frac{R - R_{\min}}{R_{\max} - R} \times K_d \times \beta$$

aus den gemessenen *ratio*-Werten die freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen berechnet werden, wenn die  $K_d$  von Fura-2 für  $\text{Ca}^{2+}$  bekannt ist. Die  $K_d$  hängt von verschiedenen Faktoren wie Temperatur, pH, Viskosität und der Ionenkonzentration ab und ist *in situ* nicht zuverlässig zu bestimmen (Hove-Madsen und Bers, 1992; Baker *et al.*, 1994; Baylor und Hollingworth, 2000). Deshalb wurde auf eine absolute Kalibrierung verzichtet. Als Maß für die freie  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wird der *ratio*-Wert angegeben.

## 2.5.6 Messung der $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Lumen des ER

Mag-Fura-2, AM akkumuliert in intrazellulären Kompartimenten. Aufgrund seiner geringeren  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität ( $K_D = 50 \mu\text{M}$ ), kann dieser Farbstoff für Messungen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im ER genutzt werden (Hofer und Machen, 1993; Chatton *et al.*, 1995; Zimmermann, 2000a). Durch Zugabe des Saponins  $\beta$ -Escin zu den isolierten Speicheldrüsen wurden selektiv Poren in der Plasmamembran erzeugt, um funktionelle Untersuchungen am ER zu ermöglichen. Die Größe der so geschaffenen Poren beträgt im Durchmesser ca.  $50 \text{ \AA}$  (Bangham *et al.*, 1962). Die spezifische Wirkung von  $\beta$ -Escin auf die Zellen rührt daher, dass es Cholesterinmoleküle komplexiert. Da der Gehalt an Cholesterinmolekülen in der Zellmembran bis zu zehnmal höher ist als in der Membran des ER, ist es durch dieses Verfahren möglich,  $\text{Ca}^{2+}$ -Änderungen im ER Lumen zu erfassen, ohne die Integrität des ER durch die Permeabilisierung zu verändern (siehe Abb. 2.2).



**Abbildung 2.2:** Schematische Darstellung der Permeabilisierung von Mag-Fura-2-beladenen sekretorischen Zellen der Speicheldrüse. Durch das Saponin  $\beta$ -Escin werden selektiv Poren in der Plasmamembran erzeugt. Durch diese Methode kommt es zu einem Verlust des zytosolischen Mag-Fura-2-Signals. Erhalten bleibt das Mag-Fura-2-Signal aus dem ER.

### 2.5.6.1 Versuchsdurchführung

Die isolierten Drüsen wurden 20 min mit  $0,5 \mu\text{M}$  Mag-Fura-2, AM beladen. Nach der Inkubation wurden die Drüsen auf ein haftfähiges Deckgläschen geklebt und in eine Messkammer

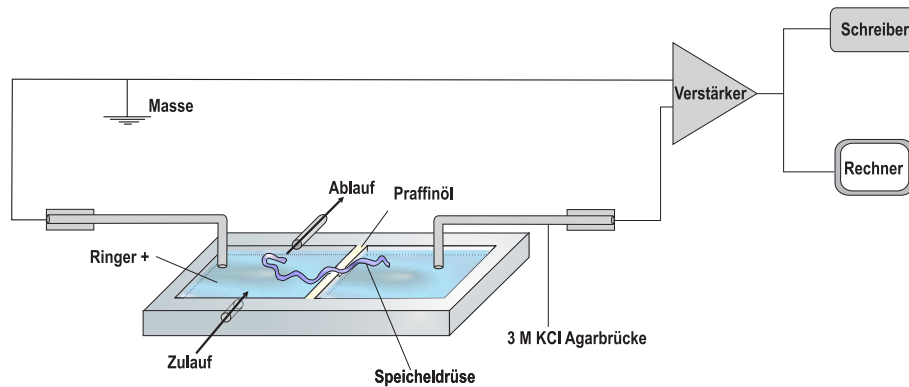
(4 mm x 14 mm; Gesamtvolumen  $\approx 200 \mu\text{l}$ ) gebracht. Die Permeabilisierung erfolgte 5-10 min mit einer  $\beta$ -Escinlösung (200  $\mu\text{g/ml}$ ). Durch die Permeabilisierung kommt es zu einem Verlust des cytosolischen Fluorochroms. Erhalten bleibt der im ER akkumulierte Farbstoff. Bildaufnahme und Auswertung erfolgten wie in Abschnitt 2.5.5.1 beschrieben.

## 2.5.7 Messung des transepithelialen Potentials (TEP)

Messungen des TEP wurden nach einer von Berridge und Prince (1972c) entwickelten Methode durchgeführt. Hierzu wurden die isolierten Drüsen in eine dreikammerigen Versuchswanne platziert (Abb. 2.3). Die beiden äußeren Kammern enthielten Ringer-Lösung und waren über eine mit Parafinöl gefüllte Kammer elektrisch voneinander getrennt. Eine der äußeren Kammern wurde kontinuierlich mit den Versuchslösungen durchspült. Die Durchflussgeschwindigkeit betrug 2 ml/min. Eine Drüse wurde so in die Messkammer gebracht, dass sie alle drei Kammern über eine mit Vaseline versehene Fuge verbindet. Das geschlossene Ende der Drüse lag in der perfundierten Kammer, während das offene Ende der Drüse über die Fuge in die andere äußere Kammer ragte. Die äußeren Kammern wurden über eine KCl-Agar-Brücke (3 M KCl) und einem AgAgCl-Pellet (Mikroelektrodenhalter, WPI International, Berlin) mit einem Differenzverstärker (npi-electronics, Tamm) verbunden. Die gemessene Potentialdifferenz (=TEP) wurde mit einer Frequenz von 2 Hz über eine A/D-Wandlerkarte digitalisiert (DAS-1600; Keithley, Germering). Datenaufnahme und Datenauswertung erfolgten mit den Programmen 'Easyest' (Asyst Software Technologies Inc., Rochester, USA) und 'SigmaPlot 8.0' (Jandel Scientific, San Rafael, CA, USA).

### 2.5.7.1 Versuchsdurchführung

Die isolierten Speicheldrüsen wurden wie in Abb. 2.5.7 beschrieben in der Versuchsanordnung platziert und kontinuierlich mit Ringer überspült. Vor jedem Experiment wurden die Drüsen für 5-10 s mit einer sättigenden ( $\leq 30 \text{ nM}$ ) 5-HT-Konzentration vorstimuliert (siehe Abb. 2.4). Der durch 5-HT-induzierte transepitheliale Elektrolyttransport führt zu komplexen Änderungen des TEP der Speicheldrüsen. Eine kurze Stimulierung mit sättigenden 5-HT-Konzentrationen führt zu biphasischen Änderungen des TEP. Diese Änderungen wurden ausführlich von Berridge et al. beschrieben und untersucht (Berridge und Patel, 1968; Berridge, 1970; Berridge und Prince,

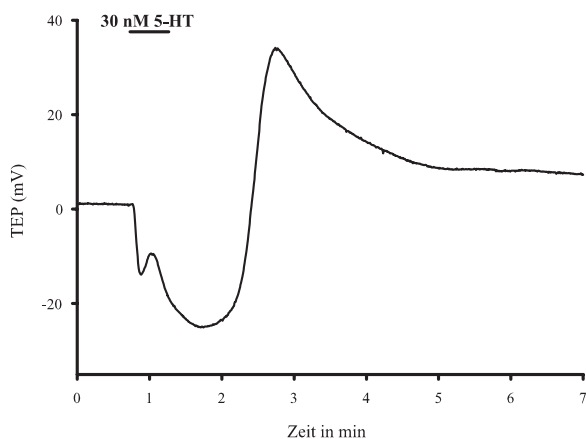


**Abbildung 2.3:** Schematische Darstellung des für die TEP-Messung verwendeten Versuchsaufbaus. Die Speicheldrüse wurde in eine dreikammerige Versuchswanne gelegt. Das geschlossene Ende der Drüse wurde kontinuierlich mit den Versuchslösungen überspült. Zur Messung des transepithelialen Potentials dienten Elektroden in den äußeren Kammern, verbunden über einen Differenzverstärker.

1972c; Berridge *et al.*, 1975; Rapp und Berridge, 1981) (Vgl. Abschnitt 1.2.1).

Die erste Phase der biphasischen Antwort beruht auf einer  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Erhöhung der  $\text{Cl}^-$ -Leitfähigkeit und führt zu einer Negativierung des TEP. Ursache der anschließenden Positivierung ist der cAMP vermittelte  $\text{K}^+$ -Transport. Hervorgerufen werden diese zeitlich versetzten Änderungen durch die schnelle Aktivierung und Inaktivierung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalweges und die verzögerte Aktivierung und Inaktivierung des cAMP-Signalweges (Berridge und Prince, 1971, 1972c).

Drüsen, die nicht das in Abb. 2.4 dargestellte biphasische Verhalten zeigten, wurden verworfen.



**Abbildung 2.4:** Verlauf des transepithelialen Potentials nach einer kurzen Stimulierung mit 30 nM 5-HT. Stimulierung mit sättigenden 5-HT-Konzentrationen ( $\leq 30$  nM) führt über eine Erhöhung der  $\text{Cl}^-$ -Leitfähigkeit zu einer Negativierung des TEP. Absetzen von 5-HT zeigt den Beitrag des aktivierten  $\text{K}^+$ -Transportes zum TEP. Dies führt zu einer Positivierung des TEP.

## 2.5.8 Datenanalyse und Statistik

### 2.5.8.1 Bioinformatische Analyse und Werkzeuge

Für die Suche nach Datenbankeneinträgen, insbesondere Aminosäure-Sequenzen und BLAST-Analysen wurden die online verfügbaren Angebote des *National Center of Biotechnology Information* (NCBI) und *The database of the Drosophila genome* (Flybase) genutzt. Analyse der Aminosäuresequenzen erfolgte mit dem Programm 'BioEdit' (Version 5.0.9., Tom Hall, North Carolina State University).

NCBI, BLAST: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>  
FlyBase: <http://flybase.bio.indiana.edu>  
BioEdit: <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>

### 2.5.8.2 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Statistikprogramm 'GraphPad Prism 4' (Version 4.01, GraphPad Software Inc., 2004). Die Messwerte sind als Mittelwerte  $\pm$  bzw. + Standardabweichung (MW  $\pm$  SD bzw. MW + SD) angegeben. Das Signifikanzniveau wurde mit 5% (\*  $p < 0,05$ ), 1% (\*\*  $p < 0,01$ ) bzw. 0,001% (\*\*\*) ( $p < 0,0001$ ) festgelegt. Zur statistischen Auswertung wurden nicht-parametrische Tests verwendet, die jeweils an entsprechender Stelle im Ergebnisteil aufgeführt sind. Für den Vergleich von mehr als zwei unabhängigen Datensätzen wurde zunächst mit einem Kruskal-Wallis-Test, bei abhängigen Datensätzen mit einem Friedman-Test auf signifikante Unterschiede getestet. Sofern diese vorhanden waren, wurden Dunn's *multiple comparison* Tests durchgeführt. Lagen nur zwei unabhängige Datensätze vor, so wurden diese mit dem Mann-Whitney U-Test miteinander verglichen. Lagen zwei abhängige Datensätze vor, wurden diese mit dem Gepaarten t-Test miteinander verglichen. In einigen Experimenten war die Stichprobe zu gering für eine statistische Auswertung. In diesen Fällen erfolgte eine rein deskriptive Auswertung der Ergebnisse.

# Kapitel 3

## Ergebnisse

### 3.1 5-Fluoro- $\alpha$ -Methyltryptamin und Histamin als selektive Agonisten der cAMP-Signalkaskade?

Zur Untersuchung möglicher Wechselwirkungen zwischen dem  $IP_3/Ca^{2+}$ -Signalweg und dem cAMP-Signalweg ist es von Vorteil, diese Wege pharmakologisch voneinander trennen zu können. Substanzen wie 5-Fluoro- $\alpha$ -Methyltryptamin (5-F- $\alpha$ -MT) sowie Histamin (2-(4-imidazolyl)ethylamin) wurden von Berridge *et al.* (Berridge, 1981a, b; Berridge und Heslop, 1981) als Substanzen genutzt, um in den Speicheldrüsen von *C. vicina* selektiv den cAMP-Signalweg (getrennt vom  $IP_3/Ca^{2+}$ -Signalweg) zu aktivieren. Dieses eröffnet prinzipiell weiterführende pharmakologische Möglichkeiten, um den Einfluss von  $Ca^{2+}$  auf Komponenten des cAMP-Signalweges zu untersuchen. Da Berridge *et al.* zum Zeitpunkt ihrer Untersuchungen keine intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Änderungen messen konnten, habe ich zunächst überprüft, ob 5-F- $\alpha$ -MT und Histamin in den Speicheldrüsen von *C. vicina* die  $Ca^{2+}$ -Konzentration beeinflussen.

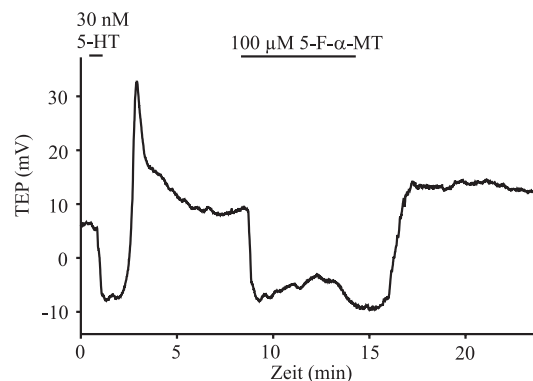
#### 3.1.1 Wirkung von 5-F- $\alpha$ -MT und Histamin auf das TEP

Eine einfache Methode, Wechselwirkungen zwischen dem  $IP_3/Ca^{2+}$ -Signalweg und dem cAMP-Signalweg zu untersuchen, besteht in der Messung des TEP. Das TEP der Speicheldrüsen ist ein empfindlicher Indikator für den transepithelialen  $K^+$ - und  $Cl^-$ -Transport.

Da der  $K^+$ -Transport über die cAMP-Signalkaskade und der  $Cl^-$ -Transport über den  $IP_3/Ca^{2+}$ -Signalweg aktiviert wird, lässt sich der Beitrag dieser beiden Signalwege zum TEP experimentell sehr gut trennen (Berridge und Patel, 1968; Berridge, 1970).

Eine Kontrollstimulierung mit 30 nM 5-HT zu Beginn des Experiments verursachte die bekannte biphasische Änderung des TEP (Abb. 3.1) (Berridge und Patel, 1968; Berridge, 1970; Berridge und Prince, 1972c; Berridge *et al.*, 1975; Rapp und Berridge, 1981). Abbildung 3.1 zeigt, dass 5-F- $\alpha$ -MT eine monophasische Negativierung des TEP verursacht. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu den von Berridge beschriebenen Ergebnissen (Berridge, 1981a, b; Berridge und Heslop, 1981).

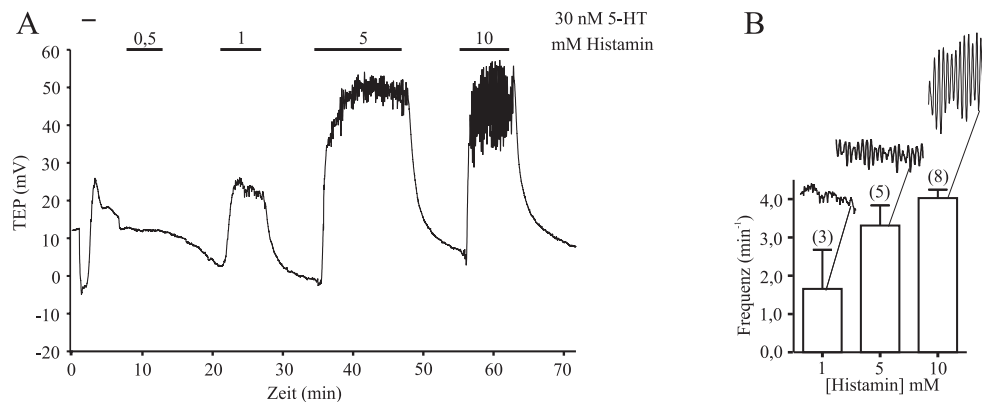
Da sich die Negativierung des TEP als Ergebnis eines  $Ca^{2+}$ -abhängigen  $Cl^-$ -Transportes erklären lässt, wurde auf die weitere Verwendung dieser Substanz als selektiver Agonist des cAMP-Signalweges verzichtet.



**Abbildung 3.1:** Einfluss von 30 nM 5-HT und 100  $\mu$ M 5-F- $\alpha$ -MT auf das TEP einer isolierten Speicheldrüse. Zeitpunkte und Dauer der Applikation sind über dieser beispielhaften Originalregistrierung durch Balken gekennzeichnet. Repräsentative Originalregistrierung für n=4 Experimente.

Abbildung 3.2 zeigt, dass Histamin eine monophasische und offenbar dosisabhängige Positivierung des TEP induzierte. Das durch Histamin positiv verschobene TEP oszillierte. Die Frequenz dieser Oszillationen war konzentrationsabhängig (Abb. 3.2B) und stieg von  $1,7 \text{ min}^{-1} \pm 1,0 \text{ min}^{-1}$  bei 1 mM über  $3,3 \text{ min}^{-1} \pm 0,5 \text{ min}^{-1}$  bei 5 mM auf  $4,0 \text{ min}^{-1} \pm 0,2 \text{ min}^{-1}$  bei 10 mM Histamin an.

Oszillationen des TEP wurden bereits von Berridge *et al.* beschrieben (Berridge und Prince,

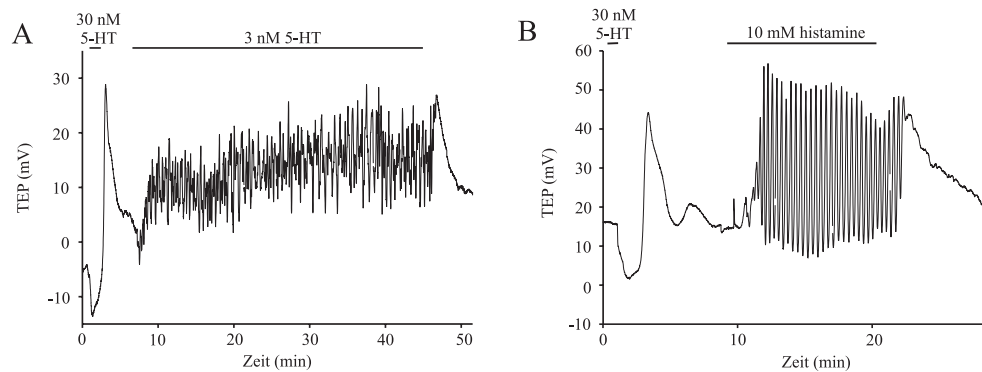


**Abbildung 3.2:** (A) Einfluss von 30 nM 5-HT und Histamin (1, 5, 10 mM) auf das TEP einer isolierten Speicheldrüse. Zeitpunkte und Dauer der Applikation sind über dieser beispielhaften Originalregistrierung durch Balken gekennzeichnet. Auf den Histamin-induzierten Änderungen des TEP "reiten" Oszillationen, deren Frequenz mit zunehmender Histamin-Konzentration ansteigt. (B) Frequenz der TEP-Oszillationen in Abhängigkeit von der Histamin-Konzentration. Die Werte sind als MW + SD angegeben. Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der getesteten Drüsen bei der jeweiligen Konzentration an.

1971, 1972c). Sie treten auf, wenn isolierte Drüsen mit schwelennahen 5-HT-Konzentrationen stimuliert werden. Abb. 3.3A zeigt beispielhaft TEP-Oszillationen, die durch Applikation von 3 nM 5-HT ausgelöst wurden.

Ein Vergleich der 5-HT-induzierten Oszillationen des TEP und der Oszillationen, die durch 10 mM Histamin ausgelöst wurden, zeigte auffällige Unterschiede (Abb. 3.3A,B). Während 5-HT-induzierte Oszillationen bereits nach einer Latenzzeit von  $8,9 \text{ s} \pm 2,8 \text{ s}$  ( $n = 5$ ) nach 5-HT Applikation auftraten, oszillierte das TEP bei Histamin-Stimulierung erst nach  $30,6 \text{ s} \pm 16,1 \text{ s}$  ( $n = 8$ ). Auffällig ist auch, dass die Histamin-induzierten Oszillationen mit einem annähernd sinusförmigen Zeitverlauf regelmäßiger erfolgten als die unregelmäßigen 5-HT-induzierten Oszillationen. Diese sinusförmigen Schwingungen der Histamin-induzierten Oszillationen des TEP konnten schon von Berridge *et al.* beobachtet werden (Berridge, 1981a; Berridge und Gallione, 1988).



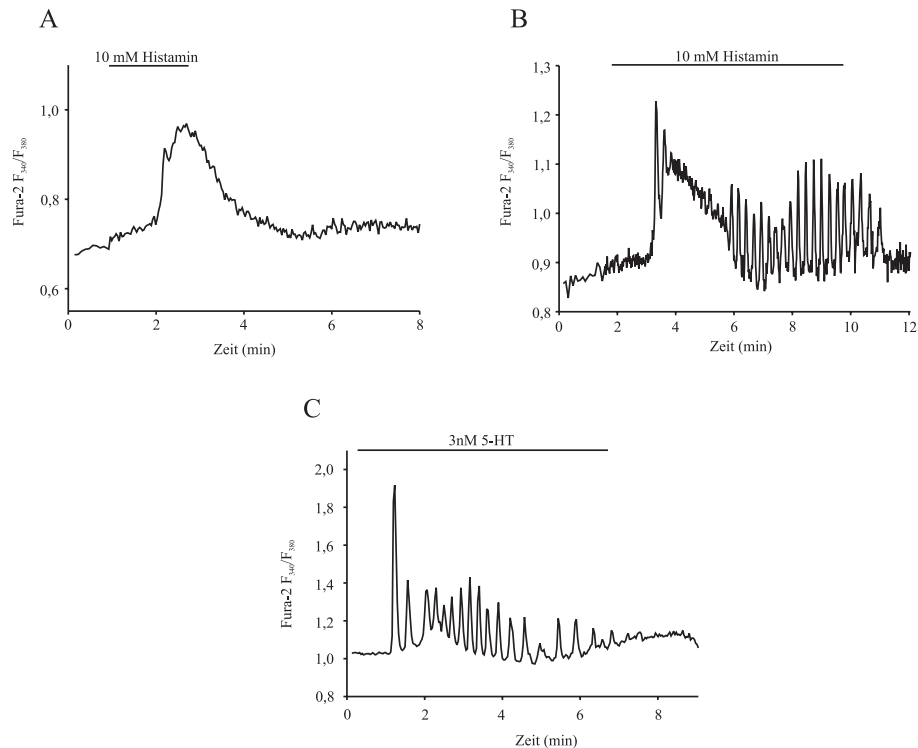


**Abbildung 3.3:** Einfluss von 30 nM 5-HT, 3 nM 5-HT und 10 mM Histamin auf das TEP einer Speicheldrüse. Zeitpunkte und Dauer der Applikation sind über diesen beispielhaften Originalregistrierungen durch Balken gekennzeichnet. Die Kontrollstimulierung mit 30 nM 5-HT zu Beginn der Experimente verursacht biphasische Änderungen des TEP. Nach Stimulierung mit 10 mM Histamin (B) oszilliert das TEP sinusförmig und auffällig regelmäßiger als nach 5-HT Stimulierung (A). Repräsentative Originalregistrierungen für n=9 (5-HT), n=8 (Histamin) Experimente.

### 3.1.2 Histamin induziert in den Drüsenzellen eine Änderung der $[Ca^{2+}]_i$

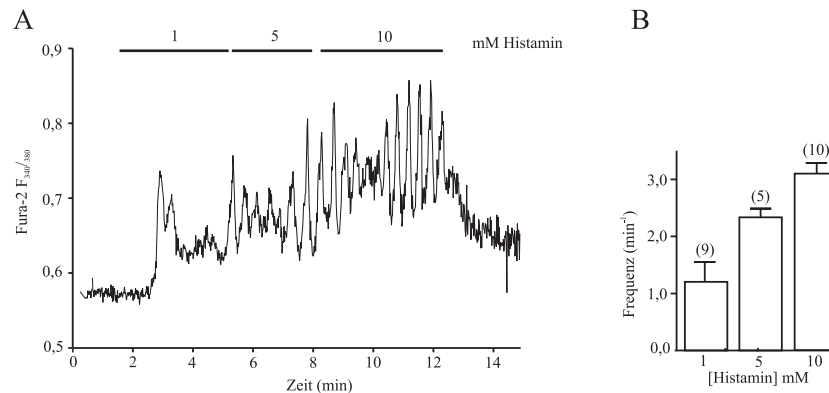
Berridge *et al.* (Berridge, 1981a, b; Berridge und Heslop, 1981) hatten beschrieben, dass Histamin nur den cAMP-Signalweg aktiviert, ohne einen Einfluss auf den  $Ca^{2+}$ -Signalweg zu besitzen. Die Positivierung des TEP bei Stimulierung mit Histamin lässt sich als Ergebnis eines cAMP-vermittelten transepithelialen  $K^+$ -Transportes erklären, nicht jedoch die TEP-Oszillationen. Oszillationen des TEP bei Stimulierung mit schwelennahen 5-HT Konzentrationen haben ihre Ursache in intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Oszillationen (Zimmermann und Walz, 1997). Deshalb wurde zur Überprüfung der von Berridge publizierten Ergebnisse die Wirkung von Histamin auf  $[Ca^{2+}]_i$  in Fura-2-beladenen Drüsen untersucht.

Es zeigte sich, dass eine Stimulierung der Zellen mit Histamin zu einem Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$  führte (Abb. 3.4A). In 65% der Experimente induzierte eine Stimulierung mit Histamin in den Zellen auch  $Ca^{2+}$ -Oszillationen (Abb. 3.4B).



**Abbildung 3.4:** Änderung der  $[Ca^{2+}]_i$  nach Stimulierung mit 10 mM Histamin (A,B) und 3 nM 5-HT (C). Zeitpunkte und Dauer der Applikation sind über diesen beispielhaften Originalregistrierungen durch Balken gekennzeichnet. Repräsentative Originalregistrierungen für  $n=3$  (A),  $n=10$  (B),  $n=9$  (C) Experimente.

Die Frequenz dieser  $Ca^{2+}$ -Oszillationen war konzentrationsabhängig und stieg von  $1,4 \pm 0,8 \text{ min}^{-1}$  bei 1 mM über  $2,3 \pm 0,3 \text{ min}^{-1}$  bei 5 mM auf  $3,1 \pm 0,6 \text{ min}^{-1}$  bei 10 mM Histamin an (Abb. 3.5). Eine Stimulierung der Drüsen mit höheren Histamin-Konzentrationen (50 mM) führte zu einem tonischen Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  ohne  $Ca^{2+}$ -Oszillationen (Daten nicht gezeigt). Ein Vergleich der Histamin- und 5-HT-induzierten  $Ca^{2+}$ -Änderungen zeigte auffällige Unterschiede (Abb. 3.4). 5-HT-induzierte  $Ca^{2+}$ -Änderungen begannen bereits nach einer Latenzzeit von  $17,8 \text{ s} \pm 11,7 \text{ s}$  (30 nM 5-HT) bzw.  $13,8 \pm 9,9 \text{ s}$  (3 nM). Histamin-induzierte  $Ca^{2+}$ -Änderungen begannen erst nach  $58,6 \text{ s} \pm 19,3 \text{ s}$ . Die Kinetik der  $Ca^{2+}$ -Oszillationen unterschied sich nach 5-HT- und Histamin-Applikation. 3 nM 5-HT erzeugte unregelmäßige  $Ca^{2+}$ -Oszillationen (Abb. 3.4C), während die durch 10 mM Histamin induzierten  $Ca^{2+}$ -Oszillationen einen regelmäßig sinusförmigen Zeitverlauf hatten (Abb. 3.4B).



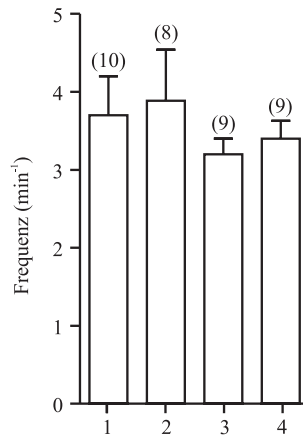
**Abbildung 3.5:** Dosisabhängige, Histamin-induzierte Änderung der  $[Ca^{2+}]_i$ . Zeitpunkte und Dauer der Applikation sind über dieser beispielhaften Originalregistrierung durch Balken gekennzeichnet. (B) Frequenz der  $Ca^{2+}$ -Oszillationen in Abhängigkeit von der Histamin-Konzentration. Die Werte sind als MW + SD angegeben. Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der getesteten Drüsen bei der jeweiligen Konzentration an.

Die Frequenzen der 5-HT- und Histamin-induzierten TEP- und  $Ca^{2+}$ -Oszillationen unterschieden sich nicht signifikant voneinander. In Abb. 3.6 ist ein zusammenfassender Vergleich der Frequenzen der Oszillationen des TEP und der  $Ca^{2+}$ -Konzentration dargestellt.

Diese Experimente zeigen: Millimolare Histamin-Konzentrationen aktivieren nicht nur den cAMP-Signalweg (Berridge und Heslop, 1981), sondern induzieren auch eine Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$ .

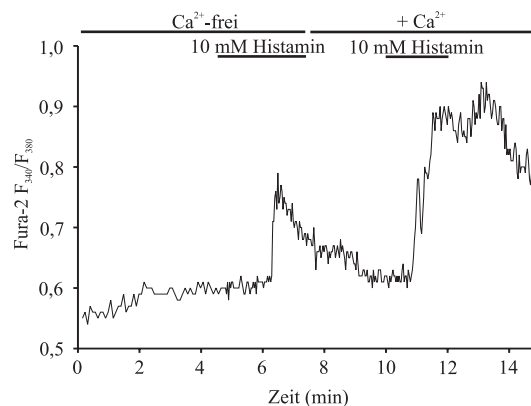
Dieser Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  kann mehrere Ursachen haben. So führt eine Stimulierung mit schwelennahen 5-HT-Konzentrationen zu einer  $IP_3$ -vermittelten  $Ca^{2+}$ -Freisetzung aus dem ER (Zimmermann und Walz, 1997). Eine Entleerung des ER/ $Ca^{2+}$ -Speichers bei Stimulation mit höheren 5-HT-Konzentrationen bewirkt über einen noch nicht genau identifizierten Weg einen kapazitiven  $Ca^{2+}$ -Einstrom (*store operated  $Ca^{2+}$ -influx*), (Putney, 1986, 1990; Parekh und J. W. Putney, 2005) (siehe auch Abschnitt 1.2.3).

Durch Stimulierung der Drüsen in  $Ca^{2+}$ -freiem Ringer kann der Beitrag des extrazellulären  $Ca^{2+}$  zur Histamin-induzierten intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Antwort geklärt werden. Eine Stimulierung mit Histamin in  $Ca^{2+}$ -freiem Ringer erzeugte einen transienten Anstieg der intrazellulären  $[Ca^{2+}]_i$  (Abb. 3.7). Stimulierung mit Histamin in  $Ca^{2+}$ -haltigem Ringer führte zu dem



**Abbildung 3.6:** Vergleich der Histamin- und 5-HT-induzierten Oszillationen des TEP- und des Ca<sup>2+</sup>-Signals. (1) Frequenz der Histamin-induzierten (10 mM) Ca<sup>2+</sup>-Oszillationen, (2) Frequenz der Histamin-induzierten (10 mM) TEP-Oszillationen, (3) Frequenz der 5-HT-induzierten (3 nM) Ca<sup>2+</sup>-Oszillationen, (4) Frequenz der 5-HT-induzierten (3 nM) TEP-Oszillationen. Die Werte sind als MW + SD angegeben. Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der getesteten Drüsen bei der jeweiligen Substanz an. Statistische Auswertung: Kruskal-Wallis-Test;  $p > 0,05$ .

zuvor beschriebenen tonischen Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  (z.B. Abb. 3.4). Abbildung 3.7 zeigt weiterhin, dass 10 mM Histamin im Ca<sup>2+</sup>-haltigen Ringer einen höheren Ca<sup>2+</sup>-Anstieg induzierte als in Ca<sup>2+</sup>-freiem Ringer. In keinem dieser Experimente wurden unter Ca<sup>2+</sup>-freien Bedingungen Histamin-induzierte Ca<sup>2+</sup>-Oszillationen beobachtet.

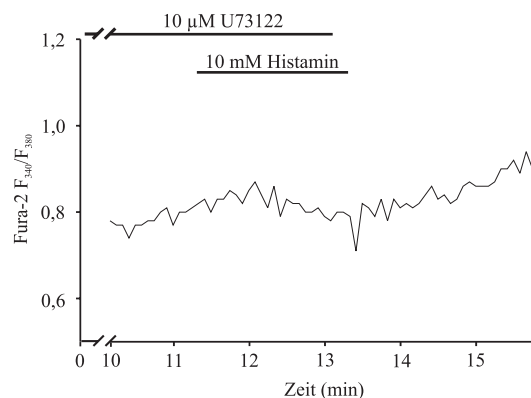


**Abbildung 3.7:** Histamin-induzierte Ca<sup>2+</sup>-Änderung in Ca<sup>2+</sup>-freiem und Ca<sup>2+</sup>-haltigem Ringer. Zeitpunkte und Dauer der Applikation sind über dieser beispielhaften Originalregistrierung durch Balken gekennzeichnet. Repräsentative Originalregistrierung für n=6 Experimente.

Diese Experimente zeigen, dass Histamin eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus intrazellulären Speichern bewirkt. Der transiente Charakter dieser  $\text{Ca}^{2+}$ -Erhöhung zeigt weiterhin, dass für die Ausbildung eines tonischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieges extrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$ -benötigt wird.

Einen weiteren Hinweis, dass die Histamin-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus intrazellulären Speichern hervorgerufen wird, lieferten Experimente mit dem Phospholipase C-Hemmstoff U73122. Diese Substanz hemmt die PLC und somit die Bildung von  $\text{IP}_3$  aus  $\text{PIP}_2$ . Zimmermann und Walz (1999) hatten gezeigt, dass U73122 die 5-HT-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Änderungen effektiv hemmt. Abbildung 3.8 zeigt, dass Histamin (10 mM) nach Vorinkubation der Drüse mit U73122 keinen Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  auslöste.

Diese Experimente bestätigen, dass Histamin eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus intrazellulären Speichern verursacht und, dass diese  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung über eine Aktivierung der Phosphoinositid-Kaskade vermittelt wird.



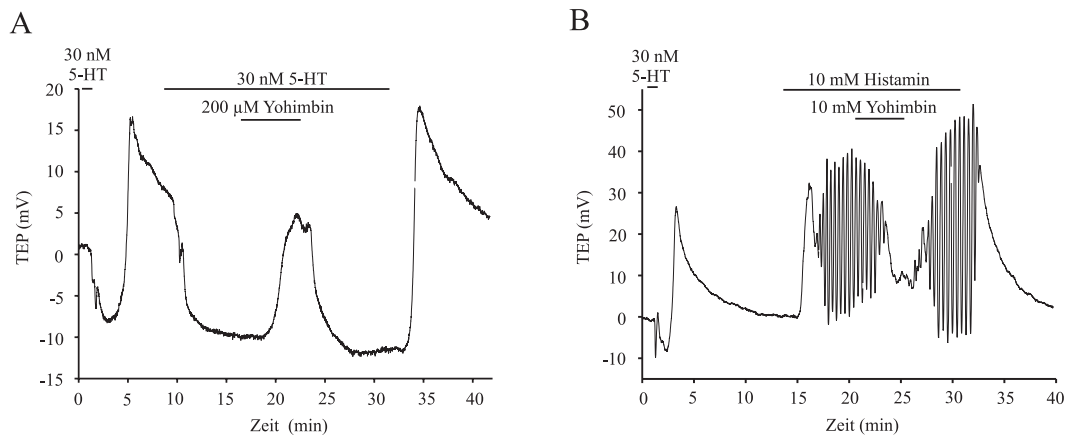
**Abbildung 3.8:** Blockierung der Histamin-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Änderung nach Inkubation mit U73122. Zeitpunkte und Dauer der Applikation sind über dieser beispielhaften Originalregistrierung durch Balken gekennzeichnet. Repräsentative Originalregistrierung für  $n=5$  Experimente.

### 3.1.3 Über welchen membranständigen Rezeptor führt Histamin zu einem Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ?

5-HT induziert die Speichelsekretion über die Aktivierung von zwei verschiedenen G-Proteingekoppelten Rezeptoren (Berridge, 1970; Prince *et al.*, 1973; Berridge *et al.*, 1976; Fain und

Berridge, 1979a; Berridge und Heslop, 1981). Yohimbin hemmt den Rezeptor, welcher an die Phosphoinositid-Kaskade koppelt (Berridge und Heslop, 1981). Um zu untersuchen, ob Histamin seine Wirkung auf die  $[Ca^{2+}]_i$  über diesen Rezeptor induziert, wurde der Einfluss von Yohimbin auf die Histamin-vermittelten Änderungen des TEP und der  $[Ca^{2+}]_i$  getestet.

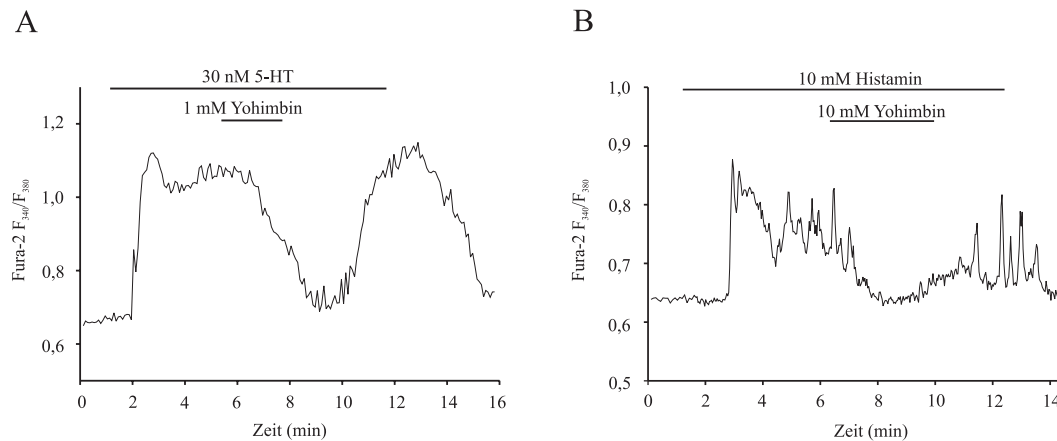
Abbildung 3.9A zeigt, dass Yohimbin die durch 30 nM 5-HT-induzierte Negativierung des TEP vollständig und reversibel hemmte.



**Abbildung 3.9:** Wirkung von Yohimbin auf die (A) 5-HT- und (B) Histamin-vermittelten Änderungen des TEP. Zeitpunkte und Dauer der Applikation sind über diesen beispielhaften Originalregistrierungen durch Balken gekennzeichnet. Repräsentative Originalregistrierung für n=5 (5-HT), n=5 (Histamin) Experimente.

Eine ähnliche Wirkung zeigte Yohimbin auf die Histamin-induzierten TEP-Änderungen (Abb. 3.9B). Applikation von Yohimbin blockierte reversibel die Histamin-induzierten TEP-Oszillationen. Die durch Histamin induzierte Positivierung des TEP wird durch Yohimbin nicht beeinflusst. Diese Ergebnisse deuten auf eine Hemmung der  $Ca^{2+}$ -vermittelten Erhöhung der  $Cl^-$ -Leitfähigkeit hin. Zur Überprüfung wurde die Wirkung von Yohimbin auf die 5-HT- und Histamin-induzierte  $Ca^{2+}$ -Änderung untersucht (Abb. 3.10). Hier zeigte sich, dass der durch 30 nM 5-HT-vermittelte tonische Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  durch Yohimbin vollständig und reversibel unterdrückt werden konnte (Abb. 3.10A). Ebenso wurden die durch Histamin induzierten  $Ca^{2+}$ -Oszillationen reversibel durch Yohimbin gehemmt (Abb. 3.10B).

Diese Ergebnisse zeigen, dass Histamin wie 5-HT beide Rezeptoren aktiviert und so zu einem Anstieg von  $[cAMP]_i$  und  $[Ca^{2+}]_i$  führte.



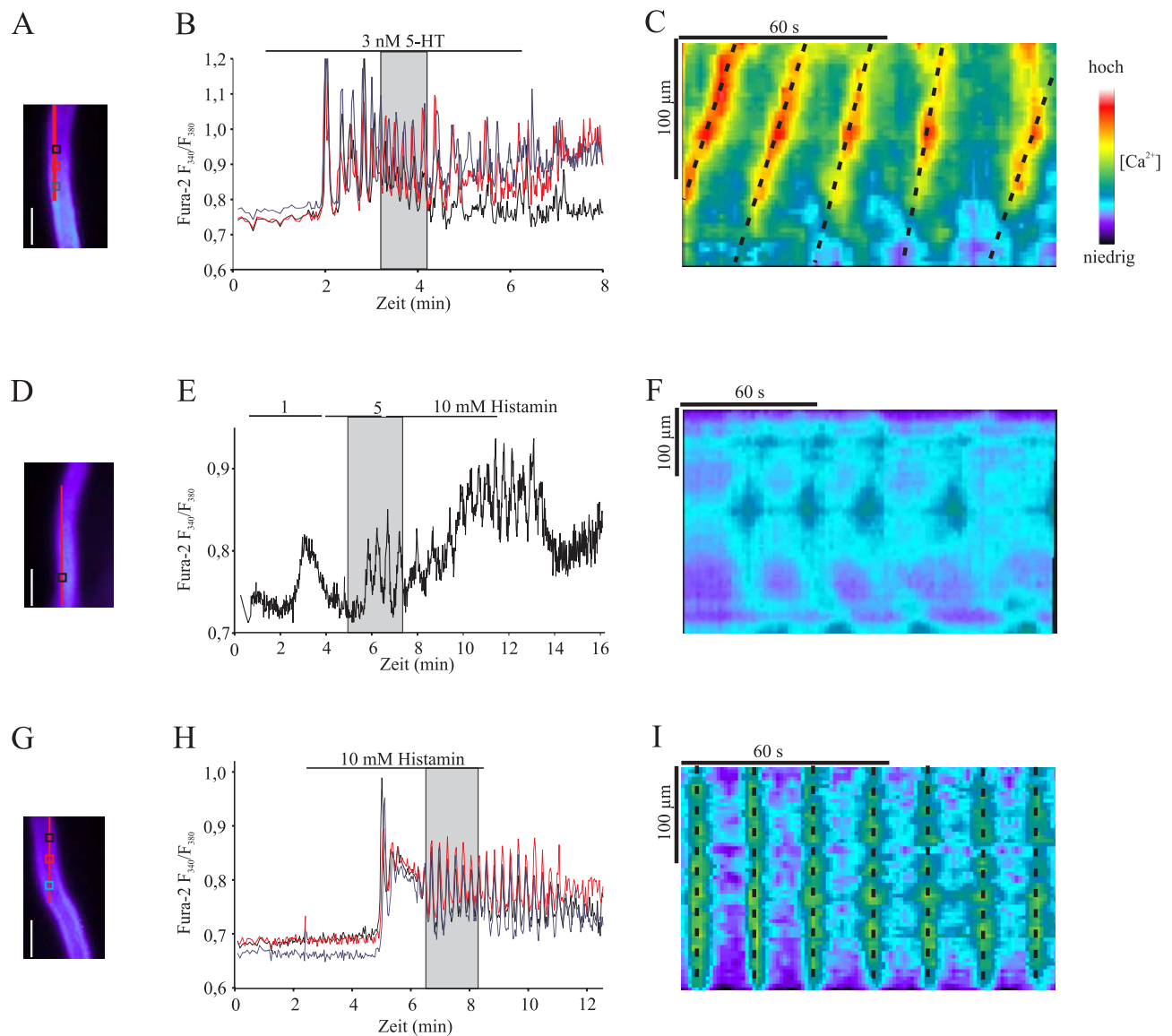
**Abbildung 3.10:** Wirkung von Yohimbin auf die (A) 5-HT- und (B) Histamin-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Änderungen. Zeitpunkte und Dauer sind über diesen beispielhaften Originalregistrierungen durch Balken gekennzeichnet. Repräsentative Originalregistrierung für  $n=7$  (5-HT),  $n=7$  (Histamin) Experimente.

### 3.1.4 Vergleich der 5-HT- und Histamin-induzierten $\text{Ca}^{2+}$ -Änderungen

Schwellennahe 5-HT-Konzentrationen führen in den Drüsenzellen zu intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen und fortgeleiteten interzellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Wellen (Zimmermann und Walz, 1997, 1999). Abbildung 3.11B,C zeigt beispielhaft die 5-HT-induzierten Änderungen der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  anhand einer zeitlichen Darstellung (Abb. 3.11B) und einer raum-zeitlichen Darstellung (*Space-time plot*) (Abb. 3.11C). Die Fortleitung der 5-HT-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Wellen entlang des betrachteten Drüsenabschnittes ( $386 \mu\text{m}$ ) (Abb. 3.11A) ist durch geneigte Linien in Abb. 3.11C verdeutlicht.

Abbildung 3.11G zeigt, dass bei einer Stimulierung mit 1, 5 und 10 mM Histamin die zuvor beschriebenen Oszillationen der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  auftreten. Im Gegensatz zu einer Stimulierung mit 3 nM 5-HT wurde bei einer Histamin-Stimulierung mit 1-5 mM eine lokale Änderung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  erzeugt (Abb. 3.11F). Bei diesen Konzentrationen beschränkten sich die  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen räumlich auf einzelne Zellen oder kleinere Zellgruppen. Eine Stimulierung mit 10 mM Histamin erzeugte  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen in einzelnen Zellen oder kleineren Zellgruppen, ähnlich denen, die ausgelöst wurden durch niedrigere Histamin-Konzentrationen. Jedoch in 5 von 24 Experimenten trat ein „ $\text{Ca}^{2+}$ -beating“, ein global-oszillierendes  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal, über den gesamten betrachteten Drüsenabschnitt auf. In Abb. 3.11I ist dieses synchrone Oszillieren der

$[Ca^{2+}]_i$  durch senkrechte, nicht-geneigte Linien verdeutlicht. In keinem dieser Experimente traten fortgeleitete  $Ca^{2+}$ -Wellen des Histamin-induzierten  $Ca^{2+}$ -Signals auf.



**Abbildung 3.11:** Darstellung der induzierten  $Ca^{2+}$ -Oszillationen im *space-time plot*. Zeitliche und raum-zeitliche Darstellung der 5-HT-induzierten (B,C) und Histamin-induzierten (E,F,H,I)  $Ca^{2+}$ -Oszillationen. (A), (D) und (G) Falschfarbendarstellung eines mit Fura-2-beladenen Drüsenabschnittes (weißer Balken, 100  $\mu$ m). Farbige Quadrate in (A), (D) und (G) markieren Messbereiche der in (B), (E), und (H) entsprechend dargestellten zeitlichen intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Änderungen. Rote Linien in (A), (D) und (G) markieren den Messbereich, graue Flächen in (B), (E), und (H) markieren das Zeitfenster des in (C), (F) und (I) entsprechend dargestellten *space-time plots* der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Änderungen.



Histamin führte also in den Speicheldrüsenzellen wie 5-HT zu einem Anstieg der intrazellulären cAMP- und  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Es zeigte sich jedoch bei Stimulierung mit Histamin ein völlig anderes Muster der induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen.

Berridge und Heslop (1981) zeigten, dass Stimulierung mit 5-HT und Histamin zu einem unterschiedlichen Anstieg der  $[\text{cAMP}]_i$  führen. Weitere TEP-Messungen zeigten, dass bei Stimulierung mit schwelennahen 5-HT-Konzentrationen eine Erhöhung der  $[\text{cAMP}]_i$  durch Phosphodiesterase-Hemmstoffe (z.B. Theophyllin) die 5-HT-induzierten TEP-Oszillationen einen sinusförmigen Verlauf annahmen, ähnlich den Histamin-induzierten TEP-Oszillationen (Berridge, 1981a, b).

Aus diesem Grund wurden Messungen durchgeführt, in denen die  $[\text{cAMP}]_i$  durch Applikation von cAMP, Forskolin (Aktivator der Adenylatzyklase) oder IBMX (Blocker der Phosphodiesterase) erhöht wurde. In Anwesenheit einer schwelennahen 5-HT-Konzentration sollte untersucht werden, ob diese erhöhte  $[\text{cAMP}]_i$  das raum-zeitliche Muster der 5-HT-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Wellen beeinflussen kann. Dies war nicht der Fall. Diese Versuche konnten das Histamin-induzierte „ $\text{Ca}^{2+}$ -beating“ nicht imitieren. Es zeigte sich jedoch ganz unerwartet, dass eine Erhöhung der  $[\text{cAMP}]_i$  zu Veränderungen der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  führte. Diese Experimente werden in Abschnitt 3.2 ausführlich beschrieben.

## 3.2 Wirkung von cAMP auf den $\text{IP}_3/\text{Ca}^{2+}$ -Signalweg

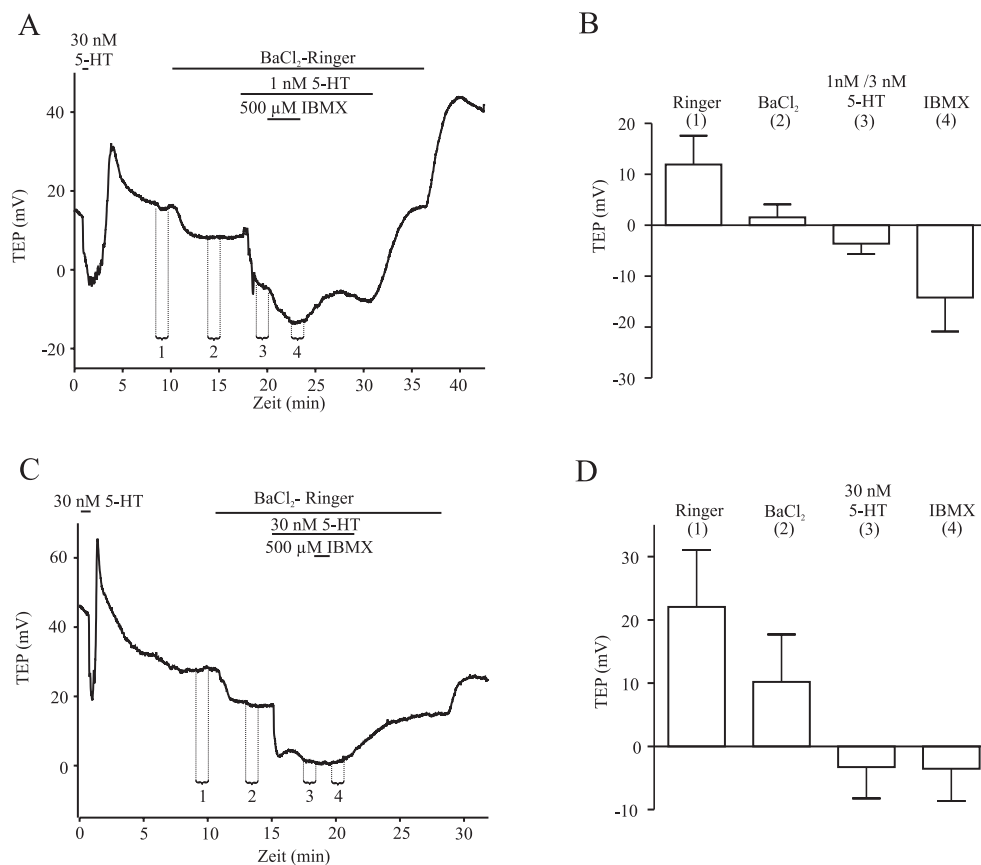
### 3.2.1 Wirkung von $[\text{cAMP}]_i$ auf das transepitheliale Potential (TEP)

Zur Klärung einer Wirkung der  $[\text{cAMP}]_i$  auf den  $\text{IP}_3/\text{Ca}^{2+}$ -Signalweg wurden zunächst TEP-Messungen durchgeführt. Es war bekannt, dass durch Bad-Applikation von cAMP oder IBMX ein transepithelialer  $\text{K}^+$ -Transport aktiviert wird und es dadurch zu einer Positivierung des TEP kommt (Berridge und Prince, 1972b, a). Um zu untersuchen, ob cAMP den  $\text{IP}_3/\text{Ca}^{2+}$ -Signalweg beeinflusst, wurden TEP-Messungen geplant, in denen die  $\text{K}^+$ -Leitfähigkeit keine Auswirkung auf das TEP-Signal zeigt, also bei Änderung des TEP selektiv Änderungen der  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten  $\text{Cl}^-$ -Leitfähigkeit sichtbar werden. Zu diesem Zweck wurde im Ringer  $\text{K}^+$  durch  $\text{Ba}^{2+}$  ersetzt. Durch  $\text{Ba}^{2+}$  werden die  $\text{K}^+$ -Kanäle in der basolateralen Membran der Drüsenzellen blockiert (Schwartz *et al.*, 1968; Nagel, 1979; Driessche und Zeiske, 1985; Hanrahan *et al.*, 1986).

Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abb. 3.12 gezeigt. Das TEP negativierte im  $\text{Ba}^{2+}$ -haltigen Ringer um ca. 10 mV von  $11,9 \pm 5,7$  mV auf  $1,6 \pm 4,4$  mV, weil auch in der unstimulierten Drüse ein basaler  $\text{K}^+$ -Transport stattfindet, der ein TEP verursacht, das einige mV positiv ist (Prince und Berridge, 1972). Dieser basale  $\text{K}^+$ -Transport wird im  $\text{Ba}^{2+}$ -haltigen Ringer unterbunden. Die Stimulierung der Drüsen mit schwelennahen 5-HT-Konzentrationen (1 nM oder 3 nM) führte in  $\text{Ba}^{2+}$ -haltigem Ringer zu einer weiteren Negativierung des TEP um ca. 5 mV auf  $-3,6 \pm 3,6$  mV. Diese Negativierung ist das Ergebnis eines 5-HT-induzierten transepithelialen  $\text{Cl}^-$ -Transportes. Nach der Applikation von IBMX in Gegenwart von schwelennahen 5-HT-Konzentrationen negativierte das TEP auf  $-14,2 \pm 6,7$  mV. Da IBMX ein Phosphodiesterase-Hemmstoff ist, lässt diese Beobachtung eine cAMP-vermittelte Verstärkung der 5-HT-induzierten Negativierung des TEP vermuten.

Abbildung 3.12C zeigt den gleichen Versuchsablauf wie oben beschrieben, jedoch bei Stimulierung mit 30 nM 5-HT, einer sättigenden 5-HT-Konzentration. Stimulierung der Drüsen mit 30 nM 5-HT im  $\text{Ba}^{2+}$ -haltigen Ringer negativierte das TEP um ca. 15 mV von  $10,2 \pm 7,5$  mV auf  $-3,3 \pm 4,9$  mV (Abb. 3.12D). Aufgrund der sättigenden 5-HT-Konzentration kommt es im Vergleich zu 3 nM 5-HT zu einer stärkeren Negativierung des TEP. Eine zusätzliche Applikation von IBMX unter diesen Bedingungen hatte keinen messbaren Effekt auf das TEP. IBMX ver-

stärkte also nur bei schwelennahen 5-HT-Konzentrationen die 5-HT-induzierte Negativierung des TEP.

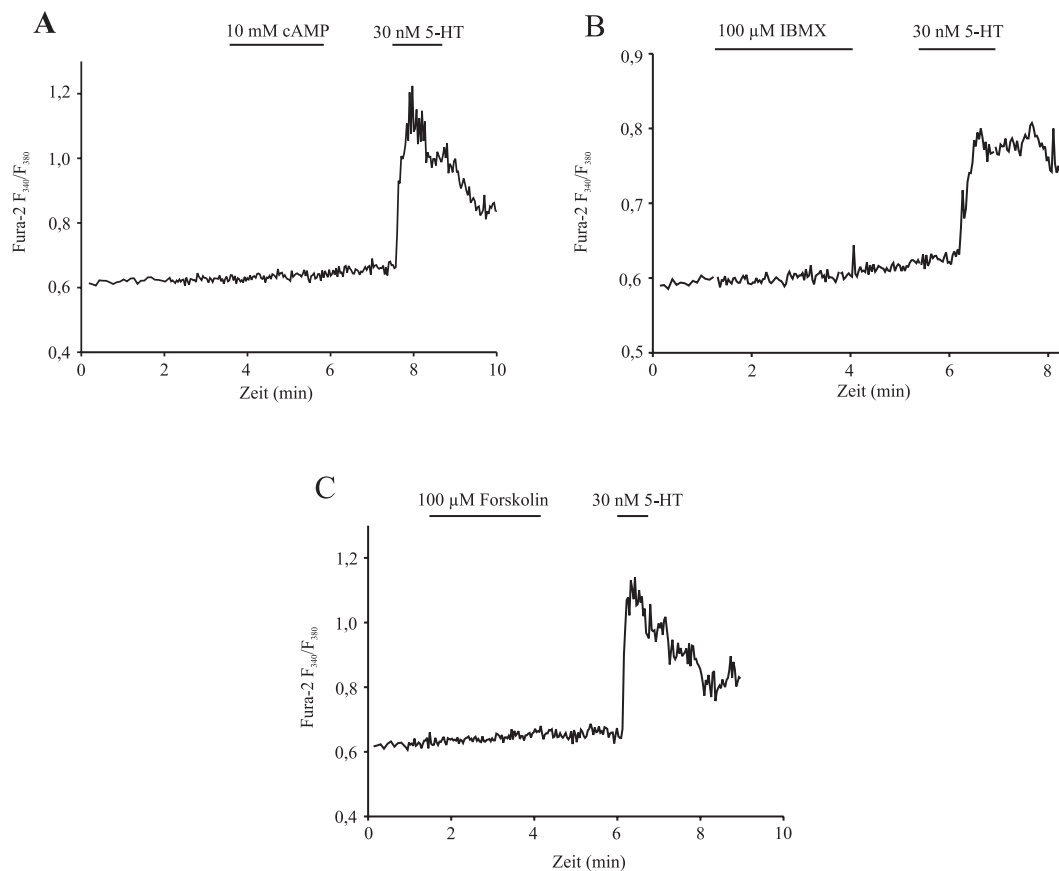


**Abbildung 3.12:** Wirkung von 500  $\mu\text{M}$  IBMX auf den Verlauf des TEP nach Stimulierung mit 5-HT im  $\text{Ba}^{2+}$ -haltigen Ringer. Zeitpunkte und Dauer der Applikation sind über diesen beispielhaften Originalregistrierungen durch Balken gekennzeichnet. (A) Repräsentative Originalregistrierung des Verlaufs des TEP nach Stimulierung mit 1 nM 5-HT und zusätzlicher Applikation von 500  $\mu\text{M}$  IBMX im  $\text{Ba}^{2+}$ -haltigen Ringer. (C) Repräsentative Originalregistrierung des Verlaufs des TEP nach Stimulierung mit 30 nM 5-HT und zusätzlicher Applikation von 500  $\mu\text{M}$  IBMX im  $\text{Ba}^{2+}$ -haltigen Ringer. (B) und (D) quantitative Zusammenfassung der in (A) und (C) exemplarisch dargestellten Experimente. Für die Auswertung wurde der Mittelwert der in (A) und (C) repräsentativ dargestellten Messpunkte über einen Zeitraum von 1 min (Nr. 1-4 in Abb. A bzw. Abb. C) berechnet (B:  $n=4$ ; D:  $n=3$ ).

### 3.2.2 Wirkung der $[\text{cAMP}]_i$ auf die $[\text{Ca}^{2+}]_i$

Die in Abschnitt 3.2.1 beschriebenen Experimente ließen vermuten, dass  $[\text{cAMP}]_i$  den  $\text{IP}_3/\text{Ca}^{2+}$ -Signalweg beeinflusst. Um dies zu überprüfen, wurde an Fura-2-beladenen Drüsen der Effekt der  $[\text{cAMP}]_i$ -Erhöhung auf die  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  untersucht. Die  $[\text{cAMP}]_i$ -Erhöhung erfolgte

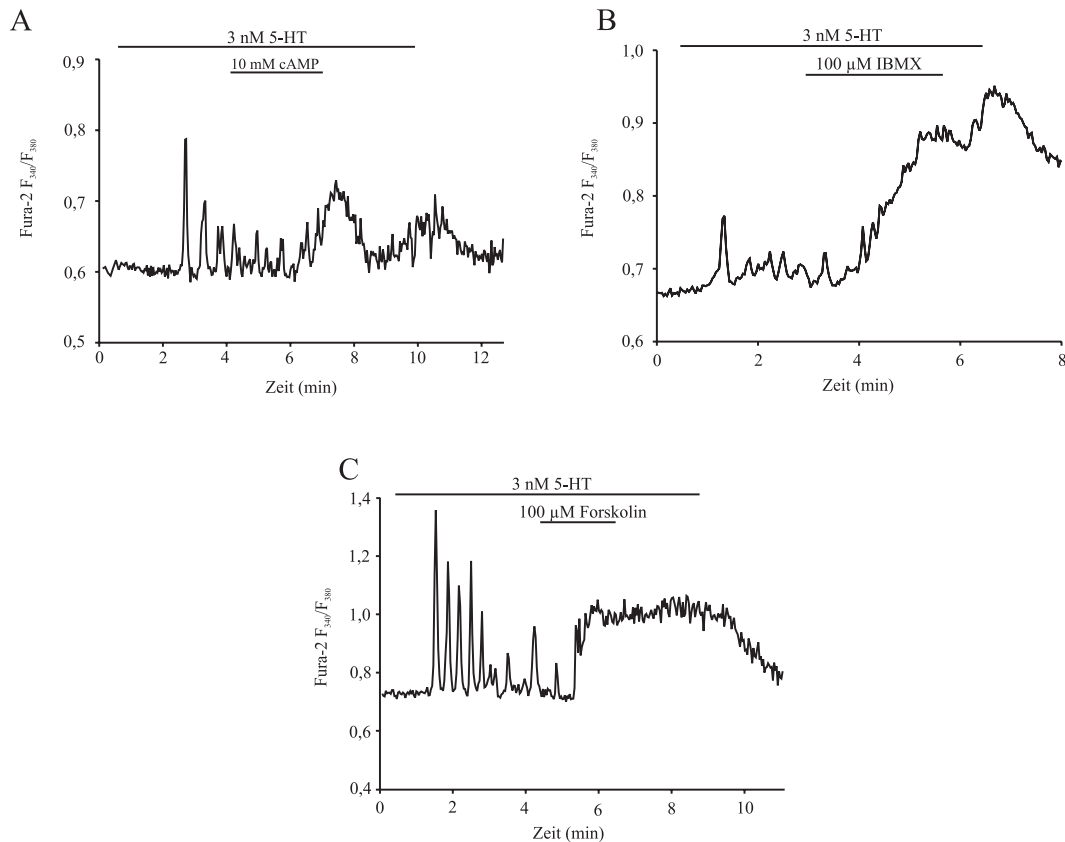
durch Applikation von cAMP, Forskolin (einem Adenylatzyklase-Aktivator) oder IBMX. Abbildung 3.13 zeigt repräsentativ die Ergebnisse dieser Experimente. Bei allen Experimenten führte eine Erhöhung der  $[cAMP]_i$  durch cAMP, IBMX oder Forskolin zu keinem sichtbaren Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$ . Um die normale Funktionalität der Drüsen zu überprüfen, wurde nach jeder cAMP-, Forskolin- oder IBMX-Applikation mit 30 nM 5-HT stimuliert. Dies führte in den Zellen zu einem  $Ca^{2+}$ -Anstieg.



**Abbildung 3.13:** Wirkung von 10 mM cAMP (A), 100  $\mu$ M IBMX (B) und 100  $\mu$ M Forskolin (C) auf die  $[Ca^{2+}]_i$  in unstimulierten Drüsen. Zeitpunkte und Dauer der Applikation sind über diesen beispielhaften Originalregistrierungen durch Balken gekennzeichnet. Repräsentative Originalregistrierung für  $n=3$  (cAMP),  $n=3$  (IBMX) und  $n=6$  (Forskolin) Experimente.

In einem zweiten Schritt wurde untersucht, ob eine Erhöhung der  $[cAMP]_i$  die  $Ca^{2+}$ -Änderungen beeinflusst, welche durch schwelennahe 5-HT-Konzentrationen verursacht werden. Stimulierung der Drüsen mit 3 nM 5-HT induzierte in den Zellen Oszillationen der

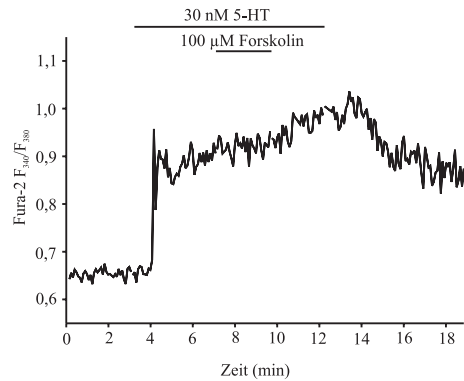
$[Ca^{2+}]_i$  (Zimmermann und Walz, 1997) (Abb. 3.14). Bad-Applikation von 10 mM cAMP, 100  $\mu$ M IBMX oder 100  $\mu$ M Forskolin zur  $[cAMP]_i$ -Erhöhung verursachte in Gegenwart von 3 nM 5-HT einen tonischen Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$ , wobei die  $Ca^{2+}$ -Oszillationen verschwanden.



**Abbildung 3.14:** Wirkung von 10 mM cAMP (A), 100  $\mu$ M IBMX (B) und 100  $\mu$ M Forskolin (C) auf die  $[Ca^{2+}]_i$  in 5-HT-stimulierten Drüsen. Zeitpunkte und Dauer der Applikation sind über diesen beispielhaften Originalregistrierungen durch Balken gekennzeichnet. Repräsentative Originalregistrierung für n=7 (cAMP), n=5 (IBMX) und n=8 (Forskolin) Experimente.

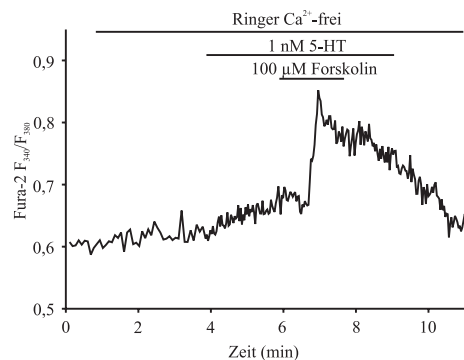
Eine Erhöhung von  $[cAMP]_i$  durch Forskolin bei sättigenden 5-HT-Konzentrationen (30 nM) zeigte keine Wirkung auf die  $[Ca^{2+}]_i$  (Abb. 3.15).

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass eine Erhöhung der  $[cAMP]_i$  in nicht-stimulierten Zellen keine Wirkung auf die  $[Ca^{2+}]_i$  hatte. Wurden die Drüsen mit schwellennahen 5-HT-Konzentrationen stimuliert, führte eine Erhöhung von  $[cAMP]_i$  zur Aufhebung der  $Ca^{2+}$ -Oszillationen und zu einem tonischen Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$ .



**Abbildung 3.15:** Einfluss einer Erhöhung von  $[cAMP]_i$  auf  $[Ca^{2+}]_i$  in der mit 30 nM 5-HT stimulierten Drüse. Zeitpunkte und Dauer der Applikation sind über dieser beispielhaften Originalregistrierung durch Balken gekennzeichnet. Repräsentative Originalregistrierung für  $n=4$  Experimente.

Zur Klärung des Beitrages des extrazellulären  $Ca^{2+}$  bei der cAMP-vermittelten  $Ca^{2+}$ -Änderung wurden Experimente in  $Ca^{2+}$ -freiem Ringer durchgeführt. Eine Stimulierung der Drüsenzellen mit 1 nM 5-HT unter  $Ca^{2+}$ -freien Bedingungen induzierte einen geringfügigen  $Ca^{2+}$ -Anstieg, der von einer  $Ca^{2+}$ -Freisetzung aus dem ER verursacht wird (Zimmermann und Walz, 1997) (Abb. 3.16). Applikation von Forskolin in Gegenwart von 1 nM 5-HT führte zu einer weiteren Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$ . Dieses Ergebnis zeigt, dass die cAMP-vermittelte Verstärkung der 5-HT-induzierten  $Ca^{2+}$ -Erhöhung durch eine  $Ca^{2+}$ -Freisetzung aus intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Speichern hervorgerufen wurde.

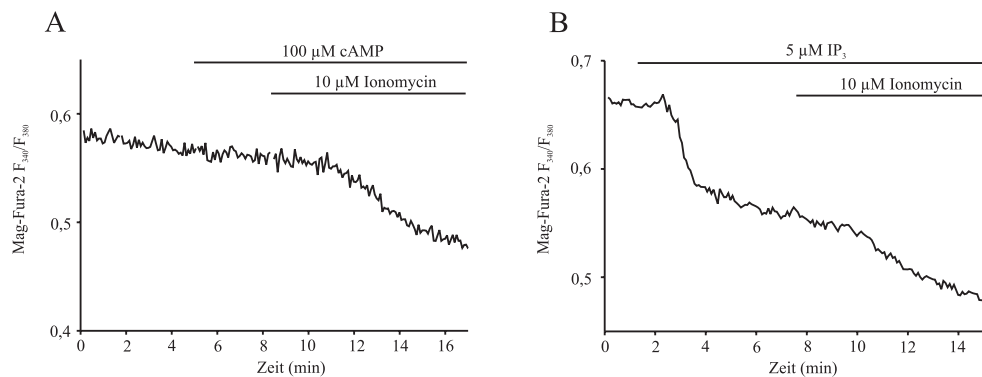


**Abbildung 3.16:** Wirkung einer Erhöhung von  $[cAMP]_i$  auf  $[Ca^{2+}]_i$  in der mit 1 nM 5-HT stimulierten Drüse in  $Ca^{2+}$ -freiem Ringer. Zeitpunkte und Dauer der Applikation sind über dieser beispielhaften Originalregistrierung durch Balken gekennzeichnet. Repräsentative Originalregistrierung für  $n=8$  Experimente.

### 3.2.3 Wirkung von cAMP auf die IP<sub>3</sub>-induzierte Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus dem ER

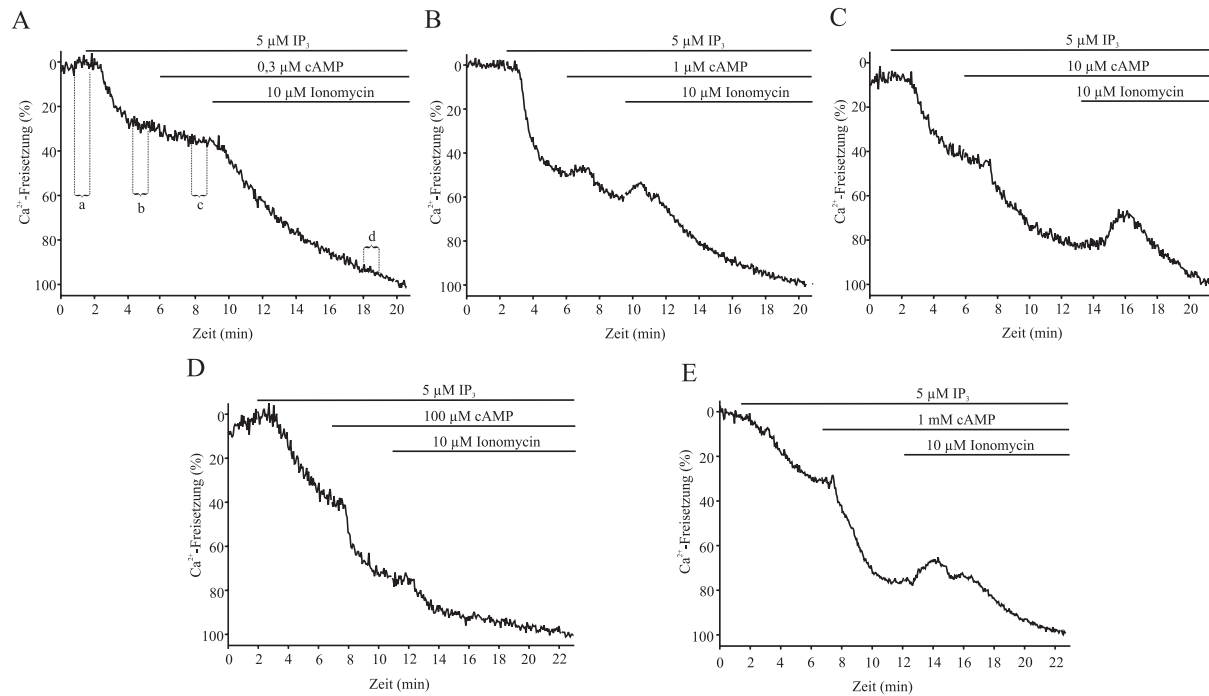
Die Mechanismen, welche die cAMP-abhängige Verstärkung der 5-HT-induzierten Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus dem ER vermitteln, wurden an Mag-Fura-2-beladenen und mit  $\beta$ -Escin permeabilisierten Drüsenzellen untersucht (siehe Material und Methoden 2.5.6). Abbildung 3.17A zeigt repräsentativ, dass cAMP in permeabilisierten Drüsenzellen die intraluminale Ca<sup>2+</sup>-Konzentration des ER ( $[Ca^{2+}]_{ER}$ ) nicht beeinflusste. Zur Kontrolle wurde nach jedem dieser und der folgenden Experimente mit dem Ca<sup>2+</sup>-Ionophor Ionomycin die ER-Membran für Ca<sup>2+</sup> permeabilisiert und so eine vollständige Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus dem ER bewirkt.

Abbildung 3.17B zeigt exemplarisch die durch 5  $\mu$ M IP<sub>3</sub> induzierte Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus dem ER. 5  $\mu$ M IP<sub>3</sub> liegt im dynamischen Bereich der Dosis-Wirkungskurve, welche die IP<sub>3</sub>-abhängige Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus dem ER beschreibt (Zimmermann, 2000a). Diese IP<sub>3</sub>-Konzentration wurde ausgewählt, um systematisch die cAMP-Empfindlichkeit der IP<sub>3</sub>-abhängigen Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus dem ER zu untersuchen.



**Abbildung 3.17:** Änderung der  $[Ca^{2+}]_{ER}$  nach Applikation von 100  $\mu$ M cAMP (A) oder IP<sub>3</sub> (B). Maximale Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus dem ER wurde durch Zugabe von Ionomycin erreicht. Zeitpunkte und Dauer der Applikation sind über diesen beispielhaften Originalregistrierungen durch Balken gekennzeichnet. Repräsentative Originalregistrierung für n=4 (cAMP) und n=8 (IP<sub>3</sub>) Experimente.

Die in Abb. 3.18A-E repräsentativ dargestellten Ergebnisse zeigen die Wirkung von ansteigenden cAMP-Konzentrationen bei konstanter IP<sub>3</sub>-Konzentration (5  $\mu$ M) auf  $[Ca^{2+}]_{ER}$ . cAMP in Konzentrationen von  $3 \times 10^{-7}$  M bis  $1 \times 10^{-3}$  M führte zu einer dosisabhängigen Verstärkung der durch 5  $\mu$ M IP<sub>3</sub> induzierten Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus dem ER.

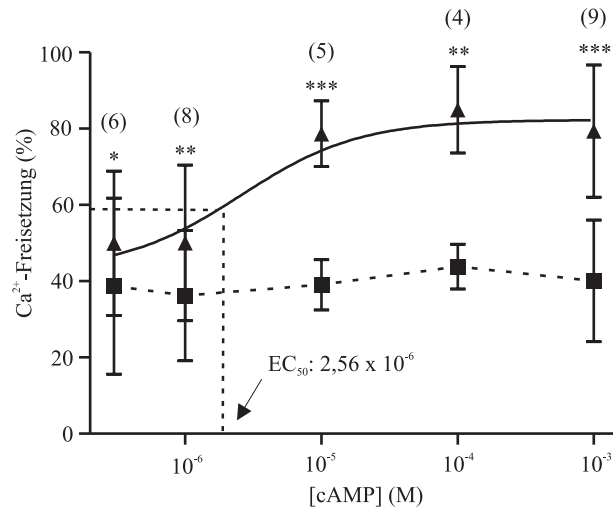


**Abbildung 3.18:** cAMP-vermittelte Verstärkung der  $\text{IP}_3$ -induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem ER. Zeitpunkte und Dauer der Applikation sind über diesen beispielhaften Originalregistrierungen durch Balken gekennzeichnet. Markierungen (a,b,c,d) in (A) geben beispielhaft die Messwertbestimmung an, welche zur Berechnung der Datensätze in Abb. 3.19A verwendet wurde. Repräsentative Originalregistrierung für  $n=6$  ( $0,3 \mu\text{M}$  cAMP),  $n=8$  ( $1 \mu\text{M}$  cAMP),  $n=5$  ( $10 \mu\text{M}$  cAMP),  $n=4$  ( $100 \mu\text{M}$  cAMP),  $n=9$  ( $1 \text{mM}$  cAMP) Experimente.

Die Berechnung der Dosis-Wirkungskurve wurde durch die Ermittlung des prozentualen Anteils der  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem ER nach  $\text{IP}_3$ -Applikation und nach zusätzlicher cAMP-Applikation durchgeführt (Abb. 3.19A). Hierzu wurden die Mittelwerte der Messpunkte im Zeitraum von 1 min vor der  $\text{IP}_3$ -Applikation, 1 min nach dem Erreichen eines Plateaus nach  $\text{IP}_3$ -Applikation und 1 min nach dem Erreichen eines Plateaus nach cAMP-Applikation berechnet. Die Werte wurden auf die maximale Ionomycin-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung normalisiert. Der Schwellenwert der cAMP-vermittelten Verstärkung lag bei  $3 \times 10^{-7} \text{ M}$  cAMP. Die halbmaximale cAMP-vermittelte Verstärkung ( $\text{EC}_{50}$ ) wurde mit  $2,6 \times 10^{-6} \text{ M}$ , eine Sättigung mit ca.  $1 \times 10^{-4} \text{ M}$  cAMP erreicht.

Um den Einfluss eines Medienwechsels auf die  $\text{IP}_3$ -induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung zu untersuchen, wurden zur Kontrolle Messungen durchgeführt, in denen zweimal hintereinander mit



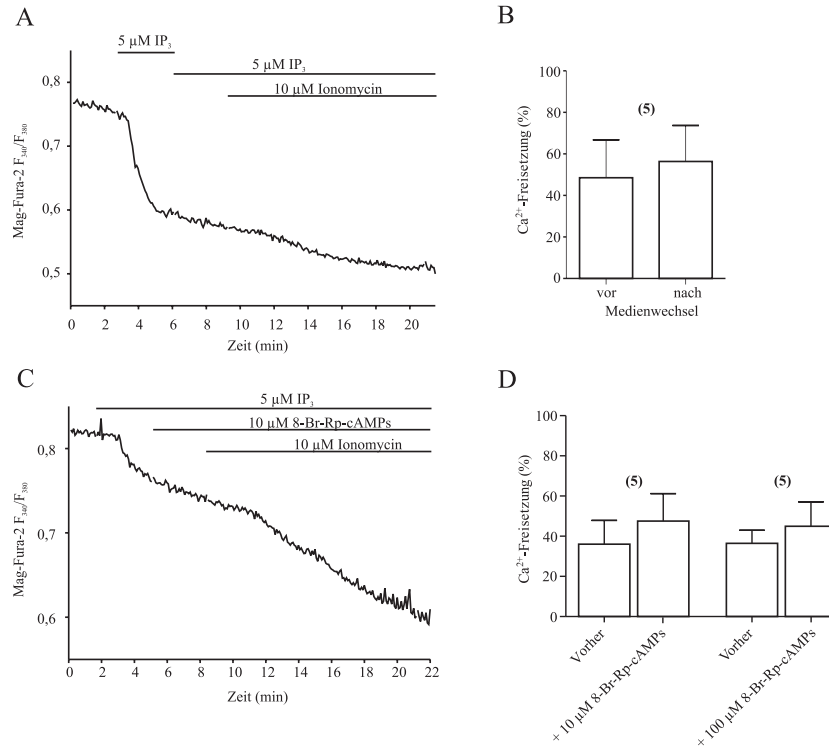


**Abbildung 3.19:** Dosis-Wirkungskurve der cAMP-vermittelten der Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus dem ER bei Stimulierung mit 5 µM IP<sub>3</sub>. Dargestellt ist die durch 5 µM IP<sub>3</sub> induzierte Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus dem ER (Quadrate) und die verstärkte Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung bei zusätzlicher Zugabe von unterschiedlichen cAMP-Konzentrationen (Dreiecke). Für die Auswertung wurde der Mittelwert der Messpunkte im Zeitraum von 1 min nach Erreichen eines Plateaus berechnet (Abb. 3.18A;a,b,c). Die so ermittelten Werte wurden auf die maximale Ionomycin-induzierte Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung normalisiert (Abb. 3.18A;d). Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der getesteten Drüsen bei der entsprechenden cAMP-Konzentration an. Statistische Auswertung: Gepaarter t-Test; \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,0001.

5 µM IP<sub>3</sub> stimuliert wurde (Abb. 3.20A,B). Diese Messungen zeigen keine signifikante Änderung der Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus dem ER bei einer zweiten Applikation von 5 µM IP<sub>3</sub>. Das vorherige Ergebnis ist deshalb nicht auf einen Medienwechsel zurückzuführen.

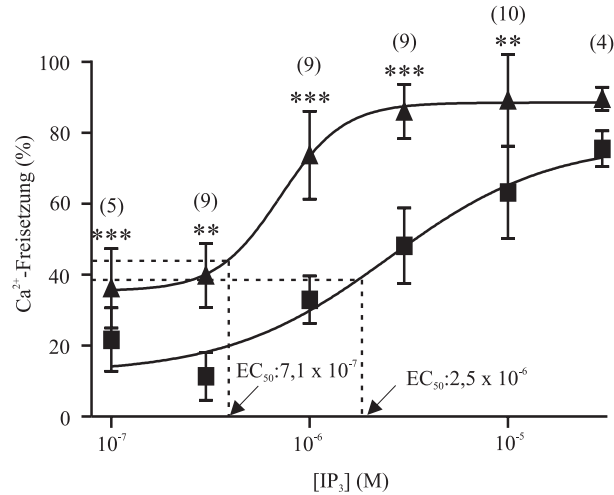
Als weitere Kontrolle diente 8-Br-Rp-cAMPS, ein Antagonist von cAMP-Zielproteinen. In Abb. 3.20C,D wird die Wirkung dieses Antagonisten auf die 5 µM IP<sub>3</sub>-induzierte Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung dargestellt. Weder bei einer Konzentration von 10 µM noch bei 100 µM zeigte 8-Br-Rp-cAMPS einen Einfluss auf die IP<sub>3</sub>-induzierte Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus dem ER.

Zur Untersuchung der Frage, ob cAMP die Affinität des IP<sub>3</sub>-Rezeptor/Ca<sup>2+</sup>-Kanals für IP<sub>3</sub> erhöht, wurde die Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus dem ER bei ansteigenden IP<sub>3</sub>-Konzentrationen (von 1 x 10<sup>-7</sup> M bis 3 x 10<sup>-4</sup> M) in Gegenwart einer sättigenden cAMP-Konzentration (100 µM) untersucht (siehe Abb. 3.21B). Die derart ermittelte Dosis-Wirkungskurve für die IP<sub>3</sub>-induzierte Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung in Gegenwart von cAMP wurde mit der Dosis-Wirkungskurve in Abwesenheit von cAMP verglichen. Applikation von ansteigenden IP<sub>3</sub>-Konzentrationen in Abwe-



**Abbildung 3.20:** Einfluss eines Medienwechsels (A) und Wirkung des Antagonisten von cAMP-Zielproteinen, 8-Br-Rp-cAMPS, (C) auf die  $\text{IP}_3$ -induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem ER. Zeitpunkte und Dauer der Applikation sind über diesen beispielhaften Originalregistrierungen durch Balken gekennzeichnet. (B) und (D) quantitative Zusammenfassung der in (A) und (C) exemplarisch dargestellten Experimente. Für die Auswertung wurde der Mittelwert der Messpunkte im Zeitraum von 1 min nach Erreichen eines Plateaus nach  $\text{IP}_3$ -Applikation und 1 min nach Applikation von  $\text{IP}_3$  bzw. 8-Br-Rp-cAMPS berechnet. Die so ermittelten Werte wurden auf die maximale Ionomycin-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung normalisiert (Abb. 3.18A;d). Dargestellt sind die MW  $\pm$  SD der  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung (%) aus dem ER. Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der getesteten Drüsen bei einem Medienwechsel bzw. bei der entsprechenden Konzentration von 8-Br-Rp-cAMPS an. Statistische Auswertung: Gepaarter t-Test,  $p > 0,05$ .

senheit von cAMP zeigte für die  $\text{IP}_3$ -induzierte  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Freisetzung einen  $\text{EC}_{50}$  für  $\text{IP}_3$  von  $2,5 \times 10^{-6}$  M. Dieser  $\text{EC}_{50}$ -Wert liegt in Nähe des von Zimmermann (2000a) ermittelten Wertes von  $1,7 \times 10^{-6}$  M. Eine Sättigung wurde bei ca.  $1,1 \times 10^{-4}$  M erreicht. In Gegenwart von  $100 \mu\text{M}$  cAMP verschob sich die Dosis-Wirkungskurve nach links ( $\text{EC}_{50}$  für  $\text{IP}_3$  bei  $7,1 \times 10^{-7}$  M). Somit zeigte sich, dass cAMP die  $\text{IP}_3$ -induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem ER  $\text{IP}_3$ -dosisabhängig verstärkte. Das bedeutet, dass die Empfindlichkeit des  $\text{IP}_3$ -Rezeptor/ $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals für  $\text{IP}_3$  durch Zugabe von cAMP erhöht wurde.



**Abbildung 3.21:** Dosis-Wirkungskurve für die cAMP-vermittelte Verstärkung der Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus dem ER bei unterschiedlichen IP<sub>3</sub>-Konzentrationen. Dargestellt ist die Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus dem ER bei unterschiedlichen IP<sub>3</sub>-Konzentrationen (Quadrate) und die verstärkte Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung bei zusätzlicher Applikation von 100 µM cAMP (Dreiecke). Für die Auswertung wurde der Mittelwert der Messpunkte im Zeitraum von 1 min nach Erreichen eines Plateaus berechnet. Die so ermittelten Werte wurden auf die maximale Ionomycin-induzierte Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung (d) normalisiert. Angegeben sind MW ± SD der Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus dem ER (%), die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der getesteten Drüsen bei der entsprechenden cAMP-bzw IP<sub>3</sub>-Konzentration an. Statistische Auswertung: Gepaarter t-Test; \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,0001.

### 3.2.3.1 Wird die cAMP-abhängige Verstärkung der IP<sub>3</sub>-induzierten Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung durch Epac oder PKA vermittelt?

Eine Erhöhung der cAMP-Konzentration kann in Zellen über zwei unterschiedliche Signalwege seine physiologische Wirkung entfalten. Einerseits aktiviert cAMP eine Proteinkinase A (PKA), welche Serin- und Threoninreste an Zielproteinen phosphoryliert (Taylor *et al.*, 2004; Seino und Shibasaki, 2005). Andererseits aktiviert cAMP ein *exchange protein activated by cAMP* (Epac), auch als *cAMP-guanine nucleotide exchange faktor* (GEF) bezeichnet, welches kleine G-Proteine (Rap-Proteine) aktivieren kann. Da es eine Reihe von cAMP-Analoga gibt, welche mehr oder weniger selektiv entweder PKA oder den Epac-Weg aktivieren, kann pharmakologisch untersucht werden, über welchen dieser beiden Signalwege cAMP seine physiologische Wirkung entfaltet. Substanzen wie 6-BNZ-cAMP, 6-MBC-cAMP und 6-Phe-cAMP aktivieren PKA, jedoch nicht Epac. cAMP-Analoga wie 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP, 8-pHPT-2'-O-Me-cAMP und 8-pMeOPT-2'-O-Me-cAMP aktivieren Epac, jedoch nicht oder nur bei sehr

hohen Konzentrationen die PKA (Enserink *et al.*, 2002; Rehmann *et al.*, 2003). 8-CPT-cAMP ist eine Substanz, die mit hoher Affinität sowohl die PKA als auch Epac aktiviert (Christensen *et al.*, 2003). Die Wirkung der cAMP-Analoga auf die durch 5  $\mu\text{M}$   $\text{IP}_3$ -induzierte  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Freisetzung aus dem ER wurde bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  untersucht.

Bei diesen intraluminalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Messungen beobachtet man auch im Ruhezustand einen mehr oder weniger starken  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausstrom aus dem ER ( $\text{Ca}^{2+}$ -leak) (hervorgehoben durch gestrichelte Linien in Abb. 3.23B,C) (Thastrup *et al.*, 1990; Hofer *et al.*, 1996; Bergling *et al.*, 1998).

Dieser  $\text{Ca}^{2+}$ -leak und dessen Variabilität zwischen den Präparaten erschwerte die Auswertung nach obiger Methode. Es erwies sich als günstiger für diese Experimente eine andere Auswertmethode heranzuziehen. Hierzu wurde die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungsrates über eine lineare Regression über einen Zeitraum von 1 min vor der Applikation einer Substanz und über einen Zeitraum von 1 min nach der Applikation einer Substanz ermittelt (siehe gestrichelte Linien in Abb. 3.22A). Die Steigungen dieser Regressions-Geraden wurden miteinander verglichen. Zur Kontrolle wurden einige der oben angeführten Experimente (Dosis-Wirkungskurve der cAMP-vermittelten Verstärkung der durch 5  $\mu\text{M}$   $\text{IP}_3$ -induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung sowie der Einfluss eines Medienwechsels und die Wirkung von 8-Br-Rp-cAMPS) nochmals mit dieser alternativen Auswertmethode analysiert. Beide Analyse-Methoden führten zu den gleichen Ergebnissen<sup>1</sup>.

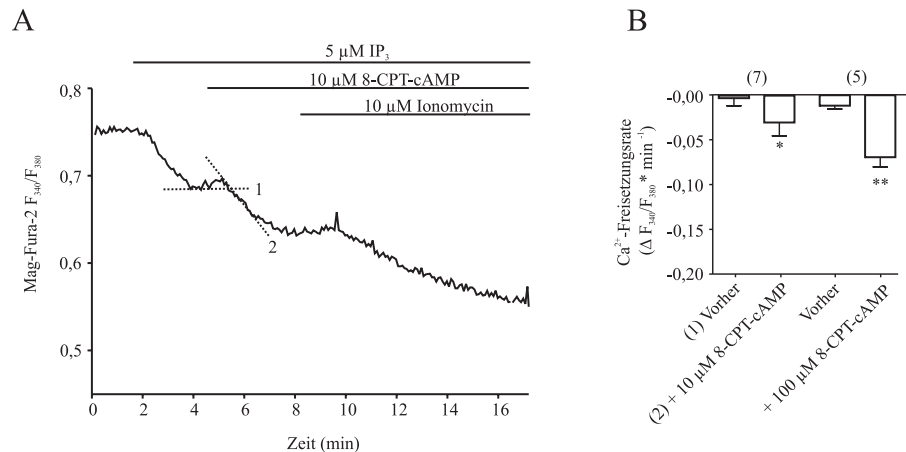
In Abb. 3.22 wird die Wirkung des cAMP-Analogons 8-CPT-cAMP auf die  $\text{IP}_3$ -induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem ER gezeigt. Die Applikation von 10  $\mu\text{M}$  8-CPT-cAMP führte zu einer signifikanten Verstärkung der  $\text{IP}_3$ -induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung. Eine Applikation von 100  $\mu\text{M}$  8-CPT-cAMP führte zu einer stärkeren  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungsrates als eine Applikation von 10  $\mu\text{M}$  8-CPT-cAMP ( $p < 0,05$ ; Ein-Wege-ANOVA, Bonferroni *Post hoc*-Tests).

In Abb. 3.23 ist zusammenfassend die Wirkung der Epac-Aktivatoren auf die  $\text{IP}_3$ -induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem ER dargestellt. In einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  zeigte keiner der verwendeten Epac-Aktivatoren eine signifikante Wirkung auf die  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Freisetzungsrates. In einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  führte einzig der Epac-Aktivator 8-pHPT-2'-O-Me-cAMP zu einer geringen signifikanten Erhöhung in der  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungsrates.

Das bei den oben beschriebenen Experimenten verwendete intrazelluläre Medium (ICM) ent-

---

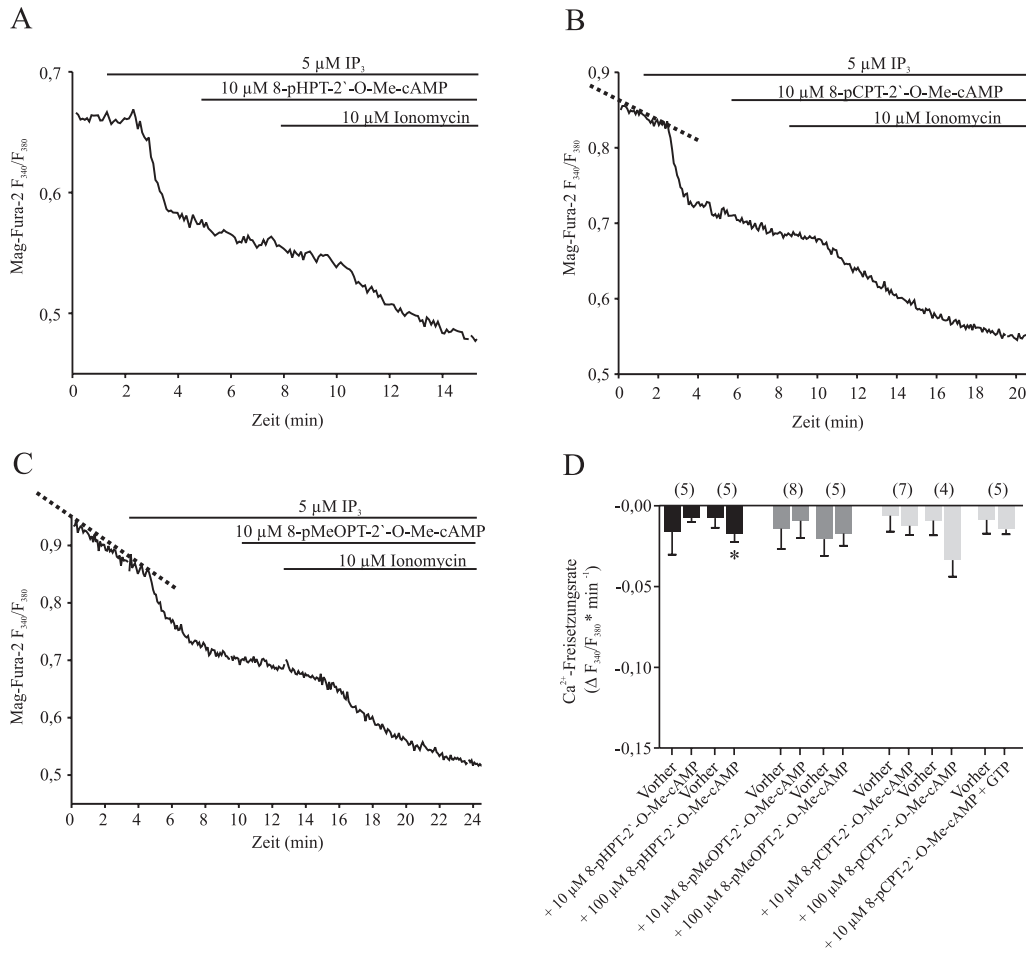
<sup>1</sup>Die Darstellung dieser Ergebnisse befindet sich im Anhang.



**Abbildung 3.22:** Wirkung von 8-CPT-cAMP auf die  $\text{IP}_3$ -induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem ER. (A) Repräsentative Originalregistrierung der Wirkung von  $10 \mu\text{M}$  8-CPT-cAMP auf die  $\text{IP}_3$ -induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem ER. Zeitpunkte und Dauer der Applikation sind über dieser beispielhaften Originalregistrierung durch Balken gekennzeichnet. Linien (1,2) in (A) geben die Ermittlung der linearen Regressionen an, welche zur Berechnung der Datensätze in (B) verwendet wurden. (B) Quantitative Zusammenfassung der Wirkung von  $10 \mu\text{M}$  und  $100 \mu\text{M}$  8-CPT-cAMP auf die  $\text{IP}_3$ -induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem ER. Zur Berechnung der Rate der  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem ER wurde eine lineare Regression über einen Zeitraum von 1 min vor der Applikation von 8-CPT-cAMP (1) und über einen Zeitraum von 1 min nach der Applikation von 8-CPT-cAMP ermittelt. Angegeben sind  $\text{MW} \pm \text{SD}$   $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungsrates aus dem ER. Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der getesteten Drüsen bei der entsprechenden Konzentration an. Statistische Auswertung: Gepaarter t-Test; \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,001$ .

hielt kein GTP. Epac-aktivierte Rap-Proteine benötigen jedoch GTP. Um zu überprüfen, ob die fehlende Wirkung der Epac-Aktivatoren auf das Fehlen von GTP im Medium zurückzuführen war, wurden Kontroll-Experimente mit  $10 \mu\text{M}$  8-pCPT-2'-O-Me-cAMP im GTP-haltigen ICM durchgeführt (Abb. 3.23). Auch bei diesen Experimenten zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungsrates nach Applikation der Epac-Aktivatoren zu der  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungsrates vor deren Applikation.

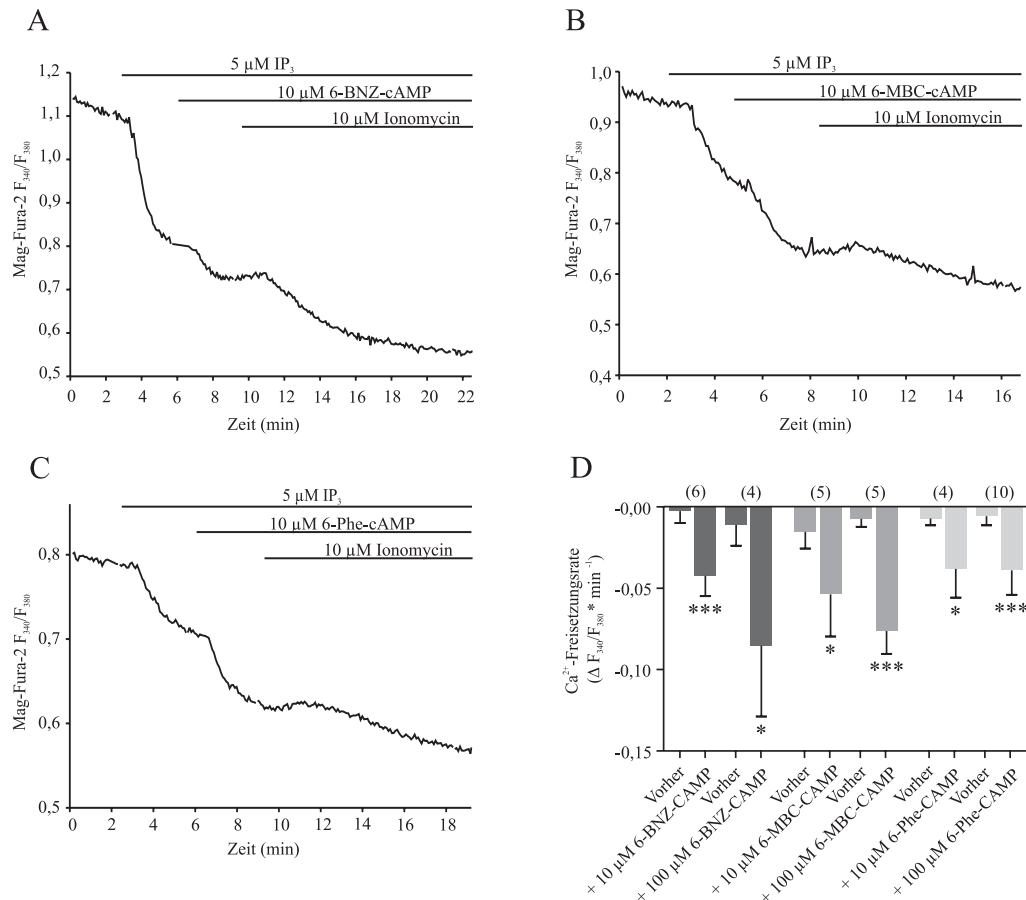
Nach diesen Ergebnissen lässt sich zusammenfassen, dass alle verwendeten Epac-Aktivatoren in einer Konzentration von  $10 \mu\text{M}$  die  $\text{IP}_3$ -induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem ER nicht verstärkten. Einzig der Epac-Aktivator 8-pHPT-2'-O-Me-cAMP führte in einer Konzentration von  $100 \mu\text{M}$  zu einer leichten Verstärkung in der  $\text{IP}_3$ -induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung.



**Abbildung 3.23:** Wirkung von Epac-Aktivatoren auf die IP<sub>3</sub>-induzierte Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus dem ER. Repräsentative Originalregistrierung der Wirkung von (A) 10  $\mu\text{M}$  8-pHPT-2'-O-Me-cAMP, (B) 10  $\mu\text{M}$  8-pMeOPT-2'-O-Me-cAMP und (C) 10  $\mu\text{M}$  8-pCPT-2'-O-Me-cAMP auf die IP<sub>3</sub>-induzierte Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus dem ER. Zeitpunkte und Dauer der Applikation sind über diesen beispielhaften Originalregistrierungen durch Balken gekennzeichnet. Linien in (B) und (C) verdeutlichen die im Ruhezustand auftretende Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung (Ca<sup>2+</sup>-leak). (D) Quantitative Zusammenfassung der in (A), (B) und (C) exemplarisch dargestellten Experimente sowie der Wirkung von jeweils 100  $\mu\text{M}$  der Epac-Aktivatoren auf die IP<sub>3</sub>-induzierte Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus dem ER. Zur Berechnung der Ca<sup>2+</sup>-Freisetzungsrates aus dem ER wurde eine lineare Regression über einen Zeitraum von 1 min vor Applikation der Epac-Aktivatoren und über einen Zeitraum von 1 min nach Applikation der Epac-Aktivatoren ermittelt. Angegeben sind MW  $\pm$  SD der Ca<sup>2+</sup>-Freisetzungsrates aus dem ER. Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der getesteten Drüsen bei der entsprechenden Substanz an. Statistische Auswertung: Gepaarter t-Test; \*  $p < 0,05$ .

Die Wirkung der PKA-Aktivatoren auf die IP<sub>3</sub>-induzierte Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung ist zusammenfassend in Abb. 3.24 dargestellt.

Alle getesteten PKA-Aktivatoren führten in einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  zu einer signifikanten Verstärkung in der Ca<sup>2+</sup>-Freisetzungsrates aus dem ER. Die Applikation von jeweils 100  $\mu\text{M}$



**Abbildung 3.24:** Wirkung spezifischer PKA-Aktivatoren auf die  $\text{IP}_3$ -induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem ER. (A) Repräsentative Originalregistrierung der Wirkung von (A) 6-BNZ-cAMP, (B) 6-MBC-cAMP und (C) 6-Phe-cAMP auf die  $\text{IP}_3$ -induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem ER. Zeitpunkte und Dauer der Applikation sind über diesen beispielhaften Originalregistrierungen durch Balken gekennzeichnet. (D) Quantitative Zusammenfassung der in (A), (B) und (C) exemplarisch dargestellten Experimente sowie der Wirkung von jeweils 100  $\mu\text{M}$  der PKA-Aktivatoren auf die  $\text{IP}_3$ -induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem ER. Zur Berechnung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungsrates aus dem ER wurde eine lineare Regression über einen Zeitraum von 1 min vor Applikation der PKA-Aktivatoren und über einen Zeitraum von 1 min nach der Applikation der PKA-Aktivatoren ermittelt. Angegeben sind MW  $\pm$  SD der  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungsrates aus dem ER. Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der getesteten Drüsen bei der entsprechenden Substanz an. Statistische Auswertung: Gepaarter t-Test; \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,0001$ .

6-BNZ-cAMP und 100  $\mu\text{M}$  6-MBC-cAMP führte zu einer stärkeren  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungsrates als die Applikation von 10  $\mu\text{M}$  dieser Analoga ( $p < 0,05$ ; Statistische Auswertung: Ein-Wege-ANOVA, Bonferroni *Post hoc*-Test). Eine Applikation von 100  $\mu\text{M}$  6-Phe-cAMP zeigte keine stärkere  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungsrates als eine Applikation von 10  $\mu\text{M}$  6-Phe-cAMP ( $p > 0,05$ ; Statistische Auswertung: Ein-Wege-ANOVA, Bonferroni *Post hoc*-Test).

Diese Ergebnisse deuten an, dass die cAMP-abhängige Verstärkung der  $\text{IP}_3$ -induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -

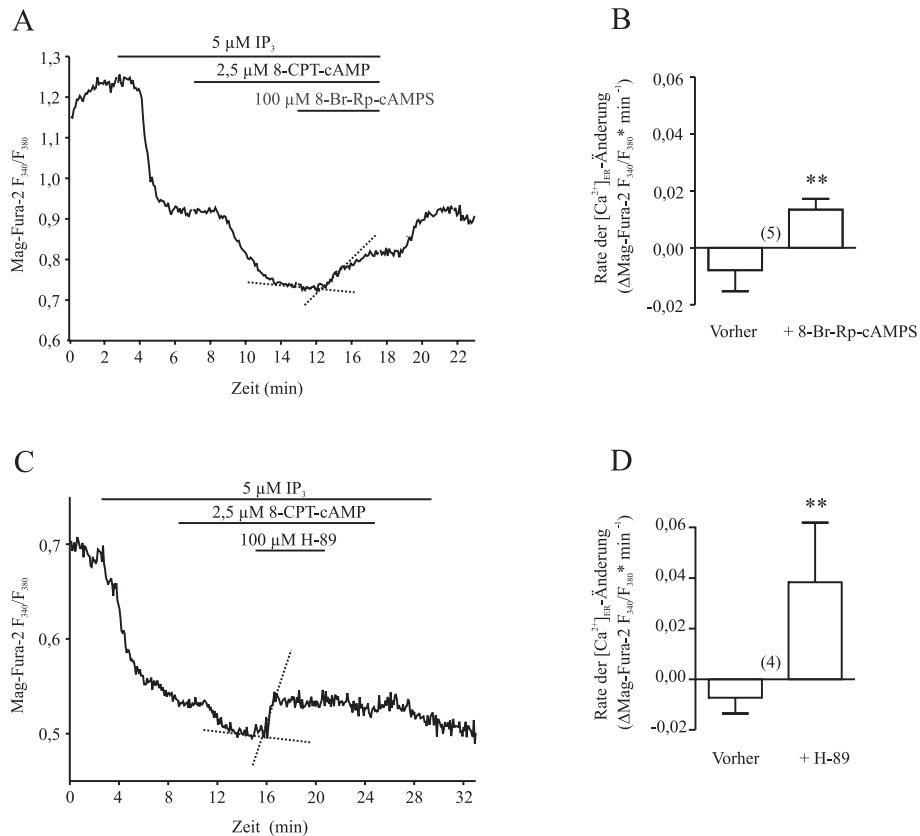
Freisetzung aus dem ER über die Aktivierung einer PKA erfolgte. Um diese Schlussfolgerung zu überprüfen wurde untersucht, ob die cAMP-vermittelte Verstärkung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung durch spezifische PKA-Hemmstoffe unterbunden werden kann.

### 3.2.3.2 Hemmung der cAMP-vermittelten Verstärkung der $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung

Nachfolgende dargestellte Ergebnisse beschreiben die Wirkung von 8-Br-Rp-cAMPS einem Antagonisten von cAMP-Zielproteinen und des spezifischen PKA-Hemmstoffes H-89 auf die 8-CPT-cAMP-vermittelte Verstärkung der  $\text{IP}_3$ -induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung (Abb. 3.25). Eine Zugabe von  $2,5 \mu\text{M}$  des unspezifischen cAMP-Analogen 8-CPT-cAMP führte zu der oben beschriebenen Verstärkung der  $\text{IP}_3$ -induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem ER. Zusätzliche Applikation des Antagonisten 8-Br-Rp-cAMPS zeigte einen signifikanten Anstieg in der Rate der  $[\text{Ca}^{2+}]_{ER}$ -Änderung von  $-0,0078 \pm 0,0074$  auf  $0,0135 \pm 0,0038$  *ratio*-Einheiten/min. Der spezifische PKA-Inhibitor H-89 führte ebenfalls zu einem signifikanten Anstieg in der Rate der  $[\text{Ca}^{2+}]_{ER}$ -Änderung von  $-0,0073 \pm 0,0062$  auf  $0,0383 \pm 0,0235$  *ratio*-Einheiten/min. Diese Messungen zeigen, dass durch den Antagonisten 8-Br-Rp-cAMPS und den spezifischen PKA-Hemmstoff H-89 der 8-CPT-cAMP-Effekt auf die  $\text{IP}_3$ -induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung unterbunden wird.

Diese Ergebnisse sind ein weiteres Indiz dafür, dass die cAMP-abhängige Verstärkung der  $\text{IP}_3$ -induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung durch eine PKA vermittelt wird.





**Abbildung 3.25:** Wirkung der PKA-Inhibitoren auf die 8-CPT-cAMP-vermittelte Verstärkung der  $\text{IP}_3$ -induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung. Repräsentative Originalregistrierung der Hemmung der 8-CPT-cAMP vermittelten Verstärkung der  $\text{IP}_3$ -induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem ER durch 8-Br-Rp-cAMPS (A) und H-89 (C). Zeitpunkte und Dauer der Applikation sind über diesen beispielhaften Originalregistrierungen durch Balken gekennzeichnet. (B) und (D) Quantitative Zusammenfassung der in (A) und (C) exemplarisch dargestellten Experimente. Zur Berechnung der Rate der Änderung der  $[\text{Ca}^{2+}]_{ER}$  wurde eine lineare Regression über einen Zeitraum von 1 min vor Applikation von 8-Br-Rp-cAMPS bzw. H-89 und über einen Zeitraum von 1 min ab dem Beginn der Hemmstoff-induzierten Änderung der  $[\text{Ca}^{2+}]_{ER}$  ermittelt. Angegeben sind MW  $\pm$  SD der Rate der Änderung der  $[\text{Ca}^{2+}]_{ER}$ . Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der getesteten Drüsen bei der entsprechenden Substanz und Konzentration an. Statistische Auswertung: Gepaarter t-Test; \*\*  $p < 0,01$ .

### 3.2.4 Lokalisation der PKA in den Speicheldrüsen

Alle zuvor beschriebenen Ergebnisse sprechen dafür, dass die cAMP-induzierte Verstärkung der  $\text{IP}_3$ -induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem ER über eine PKA vermittelt wird. Deshalb wurde in den folgenden Experimenten die Lokalisation der PKA in den Speicheldrüsenzellen untersucht. Die inaktive PKA ist ein Heterotetramer aus zwei identischen katalytischen Untereinheiten und

zwei identischen regulatorischen Untereinheiten. Die PKA existiert in zwei Isoformen, PKAI und PKAII, bezeichnet nach dem Typ der regulatorischen Untereinheiten (RI und RII) im Holoenzym. Auf Western-Blot- und in Immunfluoreszenz-Untersuchungen sollte mit Hilfe von Antisera aus Kaninchen gegen die RI und RII sowie gegen PKA-C1 von *D. melanogaster* die Lokalisation in den Speicheldrüsen und Köpfen von *C. vicina* analysiert werden (siehe Material und Methoden Tab. 2.4).

Vorab wurde durch Abgleich der Aminosäuresequenz homologer PKA-Sequenzen von *D. melanogaster*, *Apis mellifera* und *Anopheles gambiae* überprüft, ob diese Antikörper, hergestellt gegen *Drosophila* PKA-Untereinheiten, eine Kreuzreaktivität mit PKA-Untereinheiten von *C. vicina* zeigen könnten (Abb. 3.26).

PKA-C1 Dm	-----MGNNAATSN-----KKVDAAEIVKFELEQAKKEE	29
PKA-C2 Dm	-----MSOHTSQYV-----FNSKEDYNVILDNMSRRE	27
PKA-C3 Dm	MSTATCARFCTPLSSGTAGSTSKLTTGNGSGNMTSAYKIPSNNSTTANSSNTETFTFFKLGRSNGRSSSNVASSSESSDPLESDYSDE	90
PKA-C1 Am	-----MGNNAATSN-----KKVDAAEIVKFELEQAKKEE	29
PKA-C1 Dm	EDKWRRNPE--TN-----	40
PKA-C2 Dm	EEWRNHQTQSPYTN-----	41
PKA-C3 Dm	PEEQEORPEP-PAIINSRSTATTSTSSADHNDVDDEEEDDENEGGNGRDADATHDSSESIEEDDGNEDDEEDDESEESSVQ	179
PKA-C1 Am	EDKWRRNPE--TN-----	40
PKA-C1 Dm	AA-----LDDFERIKTLGTGSFGRVMIVOHKPTKDYAMKILDKQKVVKLVKQVEHTLNEKRILQATQFPFLVSLRHHFKDINSYLYMVE	124
PKA-C2 Dm	-----LENYITRAVLGNQSGFQVMLVREKSGKNYAAKMMSKEDLVRLKQVAHVHNEKHVLAANFPFLVYLVSDTRCFDYLYLILP	123
PKA-C3 Dm	AKGVRYHLLDDYQIITKTIVGTGTFGRVCLCRDRITSEKYCAMKILAMTEVIRLQTEHVKNERNILREIRHPFVLSLEWSTKDDNSLYMVE	269
PKA-C1 Am	AG-----LDDFERIKTLGTGSFGRVMIVOHKPTKDYAMKILDKQKVVKLVKQVEHTLNEKRILQATQFPFLVSLRHHFKDINSYLYMVE	124
PKA-C1 Dm	YVPGGEMFSLRVRGRFSEHHSRFYAAQIVLAFEYLYHYLDLRYRDLKPENLLIDSCGYLKWTDGFAKRVGRWTWLCGTPPEYLAPETIL	214
PKA-C2 Dm	LVNGGELFSYHRRVRKFNKHFARFYAAQVALALEYVHKMHLRYRDLKPENLLIDPQGYLKTDFGFTKRVGRWTLGCTPEYLAPETIQ	213
PKA-C3 Dm	YVCGGELFTYLRNAGKFTSOTSNFYAAEIVSALAEYLSHQLVYRDLKPENLLINRDGLKTDGFAKRLDRWTWLCGTPPEYLAPETIQ	359
PKA-C1 Am	YVPGGEMFSLRVRGRFSEHHSRFYAAQIVLAFEYLYHYLDLRYRDLKPENLLIDSCGYLKWTDGFAKRVGRWTWLCGTPPEYLAPETIL	214
PKA-C1 Dm	SKGYNKAVDWWALGVLVYEMAGYPPPEAD--OPTQIYEKIVSGKVRFPESHGSDLDKDLRNLLOVDLTKRYGNLKAGVNDIKNOKWFAS	302
PKA-C2 Dm	LEFYNKAVDWWALGVLVYEFVAGRSPFAIHNRDVILLYSKIICIDYKMFVSTSLRSLVESLLOVDLTKRLGNSNDGSDVRSHPWFQ	303
PKA-C3 Dm	SKGYNKAVDWWALGVLVYEMLVGYPPPEYDE--OPFGIYEKIVSGRIEERHMDPIAKDLIKKLLVNDRTKRLGNMKNCAADDVRRHRWFKH	447
PKA-C1 Am	SKGYNKAVDWWALGVLVYEMAGYPPPEAD--OPTQIYEKIVSGKVRFPESHGSDLDKDLRNLLOVDLTKRYGNLKAGVNDIKNOKWFAS	302
PKA-C1 Dm	TDWIATFQKKLEAPFTRCKKCPGDTSNFDDYEEETLR--ISLTERKAKEFAEF	353
PKA-C2 Dm	VDFWGLNQEVTPAYQPTISGABDLSNFENEFKDRY--KSRINRHPFLFANF	354
PKA-C3 Dm	LNWNVVSKKLEAPFIRLFDVHHDGDTKSNFDDYEEKDWKPAKAVDQDLQYFNFF	500
PKA-C1 Am	TDWIATFQKKLEAPFTRCKKCPGDTSNFDDYEEETLR--ISLTERKAKEFAEF	353

**Abbildung 3.26:** Aminosäuresequenzvergleich von *D. melanogaster* PKA-C1 (Accession number #M-18655) mit PKA-C2 (Accession number # NM-079856), PKA-C3 (Accession number # NM-079373) und mit *A. mellifera* PKA-C1 (Accession number #AJ-271674). Aminosäurereste, die in allen PKA-Untereinheiten identisch sind, sind schwarz, ähnliche Aminosäurereste grau hinterlegt. Zur Optimierung des Vergleiches wurden Lücken (-) eingefügt. Die Position der letzten Aminosäure jeder Zeile ist rechts neben der Sequenz angegeben.

In *D. melanogaster* wurden bisher drei Isoformen der katalytischen Untereinheit (PKA-C1-3) identifiziert (Foster *et al.*, 1988; Kalderon und Rubin, 1988). Ein Vergleich der Aminosäuresequenz von PKA-C1 aus *D. melanogaster* (Foster *et al.*, 1988) zeigte eine 45%ige Identi-

tät und 63%ige Ähnlichkeit mit der Aminosäuresequenz der PKA-C2 Untereinheit (Kalderon und Rubin, 1988) und eine 35%ige Identität und 49%ige Ähnlichkeit zu der Aminosäuresequenz der PKA-C3 Untereinheit (Kalderon und Rubin, 1988). Die größte Sequenzähnlichkeit von *D. melanogaster* PKA-C1 besteht mit 97% zu der PKA-C1 aus *A. mellifera* (Eisenhardt *et al.*, 2001). Hier sind insgesamt 94% der Aminosäurereste identisch. Es besteht also eine hohe Sequenzähnlichkeit zwischen PKA-C1 und weiteren bereits sequenzierten katalytischen PKA-Untereinheiten, sodass die Voraussetzung für eine Kreuzreaktivität dieses Antiserums mit homologen PKA-C-Untereinheiten aus *D. melanogaster* und mit homologen PKA-C-Untereinheiten aus *C. vicina* gegeben sind. Zudem konnten Analysen mit diesem Antiserum (anti-PKA-C1) zeigen, dass er eine Kreuzreaktivität mit der PKA-C1 aus *A. mellifera*, einer phylogenetisch weiter entfernten Spezies, aufweist (Eisenhardt *et al.*, 2001).

Ein Vergleich der Aminosäuresequenz der regulatorischen Untereinheit RII von *D. melanogaster* (Park *et al.*, 2000) zeigte eine 61%ige Identität und eine 80%ige Ähnlichkeit zu der Aminosäuresequenz der RII-Untereinheit von *A. mellifera* (Leboulle und Müller, 2004) (Abb. 3.27). Die RII-Untereinheit von *D. melanogaster* wies auch eine 72%ige Identität und eine 83%ige Ähnlichkeit zu der Aminosäuresequenz der RII-Untereinheit von *A. gambiae* auf.

```

PKA RII Dm MSSDS-SRRITQVPEELKEVLLQFSTISFLVEQPPVVDYAVEYFTKLOSER--PSVSHTDQSTDDQLSVNSQADAAEPPVMASRRKSVFAE 88
PKA RII Am MSYQRNASKIITVPDELRDVLLLEFTISYLLLEQFVDIIDYAIAFFTQLRESRQTQLIQDPAQTTTSTPDESVDDEPPIIKLAT-RRKSVFAE 89
PKA RII Ag MSSQQ-KHRIQVPPDGLRDVLLLEFSIAYLLEQFQGVVDIYAVTFFTKLQEDRKTMTITSAEFTSPDESIMSHDEEPLVNRYS-RRKSVFAE 88

PKA RII Dm AYDPEADDDDGATAVFPKTEQQRARLVESVKNVLLFRSLKEQMNQVLDAMFERKVVQPGDFTIRQGGDDGNFYVIESGVYKVVYIN---- 174
PKA RII Am TYNPEEDEDGLKIVHPKTDQQRERLADSKHLLFRSLDEDMQTDVLDAMFVKIYKSGEIVIRQGGDDGNFYVIRGKFEVYVRDQTD 179
PKA RII Ag TYDPENDEDEGARATFPKTEQQRARLQCDVKNLILFRSLDKBQMNVEVLDAMFVKIYQAKDYTIKQGGDDGNFYVIESGIYNAYVGED-- 176

PKA RII Dm -DKHINTYNNHTGLFGELALLYNMPRAATVQAEHSGLLWAMDRQTFRRILLKSAFRKRKMYEELNSVPLKALQNYERMNLADALVSKSY 263
PKA RII Am MESLIHTYDNRGAFGELALLYNMPRAATIRATINGLWAMDRQTFRRILLKSAVYKRRKMYEDLINKVPLKSLQPYERMNLADALVPKHY 269
PKA RII Ag -QKHHTYDNRGSGELALLYNMPRAATIQAEITDGLWAMDRQTFRRILLKSAFRKRKMYEALLDAVPLKTLQNYERMNLADALIPQTY 265

PKA RII Dm DNGERTIKQGDAAAGMYFIEEGTIVSVRMDQIDA-EVEISQLGKQYFGEALVTHRPRAAVYATGGVVKLAFLDVKAFAERLLGPCMDIM 352
PKA RII Am SDGDQTIKQGDASAGMYFVEEGIVRITIRGDDGREIEINRVPAQGYFGEALVTHKPRAAVAVG-EVKLAFLDVBAFAERLLGPCMEIM 358
PKA RII Ag AKGDRTIKQGDAAAGMYFIEEGKWSIRIQDQAG-EVEISNLEKGGYFGEALVTHRPRAAVAVD-NVKVLAFLDVDAFAERLLGPCMNIIM 353

PKA RII Dm KRNIIDYESQLVKIFGSKNNTIDIR 377
PKA RII Am KRNIEDYEDQIIKIFGSKNINISDIR 383
PKA RII Ag KRNIIDYETQLVKIFGSKNNTIDIR 378

```

**Abbildung 3.27:** Dargestellt ist der Aminosäuresequenzvergleich von *D. melanogaster* PKA-II (Accession number #NM-176117) mit *A. mellifera* PKA-II (Accession number #AJ-698737) und mit *A. gambiae* PKA-II (Accession number #XM-315029). Identische Aminosäuren sind schwarz, ähnliche Aminosäuren grau hinterlegt. Zur Optimierung des Vergleiches wurden Lücken (-) eingefügt. Die Position der letzten Aminosäure jeder Zeile ist rechts neben der Sequenz angegeben.

Auch hier zeigt sich eine hohe Sequenzähnlichkeit der beiden bisher bei Insekten sequenzierten RII-Untereinheiten. Diese Ähnlichkeit und der Fakt, dass es sich um ein Antiserum handelt, machen eine Kreuzreaktivität dieses Antiserums mit RII aus *C. vicina* wahrscheinlich.

Ein Sequenzvergleich der regulatorischen Untereinheit RI von *D. melanogaster* (Kalderon und Rubin, 1988; *Accession number* #P16905) mit homologen Sequenzen aus anderen Insektenspezies war nicht möglich, da diese Untereinheit bisher lediglich bei *D. melanogaster* sequenziert wurde.

#### 3.2.4.1 Western-Blot-Analysen

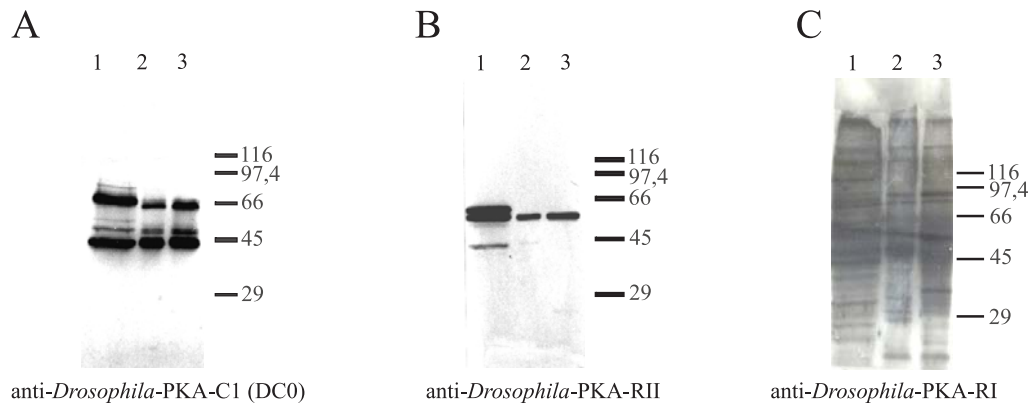
Die Kreuzreaktivität der PKA-Antiseren wurde auf Western-Blots mit Homogenat von Speicheldrüsen und Köpfen von *C. vicina* untersucht. Als Positiv-Kontrolle diente Homogenat von *D. melanogaster*-Köpfen. Das Antiserum gegen die PKA-C1 erkennt im *D. melanogaster*-Kopf-Homogenat drei prominente Banden bei 41 kDa, 47 kDa und 67 kDa (Abb. 3.28A). In den Präparationen aus *C. vicina* wurden ebenfalls drei Banden bei 41 kDa, 47 kDa und bei ca. 67 kDa markiert.

Das Antiserum gegen RII markierte in Kopf-Homogenat aus *D. melanogaster* eine Bande bei 38 kDa und eine Doppelbande bei 47 kDa und 53 kDa (Abb. 3.28B). Im Kopf-Homogenat sowie im Speicheldrüsen-Homogenat aus *C. vicina* wurde mit diesem Antiserum jeweils eine prominente Bande mit einem Molekulargewicht von 47 kDa markiert. Zusätzlich wurde eine sehr schwache Bande bei 38 kDa im Kopf-Homogenat von *C. vicina* erkannt. Analysen mit dem Antiserum gegen RI zeigte weder in Köpfen von *D. melanogaster* noch im Homogenat von *C. vicina* eine eindeutige Markierung (Abb. 3.28C).

Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Antiseren gegen die *D. melanogaster* PKA-C1 und RII mit den entsprechenden PKA-Untereinheiten aus *C. vicina* kreuzreagieren.

#### 3.2.4.2 Immunfluoreszenz-Lokalisation der PKA

Durch Immunfluoreszenz-Färbungen an Gefrierschnitten der Speicheldrüse wurde die subzelluläre Lokalisation der PKA-C1 und der PKA-RII untersucht. Zur Darstellung der zellulären Organisation wurden F-Aktin-haltige Strukturen in den Gefrierschnitten mit OregonGreen-Phalloidin markiert. Abbildung 3.29 zeigt die Ergebnisse dieser Färbungen. In den Speicheldrü-



**Abbildung 3.28:** Kreuzreaktivität der Antikseren gegen die PKA-Untereinheit C1 (DC0) (A), PKA-Untereinheit RII (B) und PKA Untereinheit RI (C) aus (1) *D. melanogaster*-Köpfen, mit entsprechenden Proteinen aus (2) Köpfen von *C. vicina* sowie (3) Speicheldrüsen von *C. vicina*.

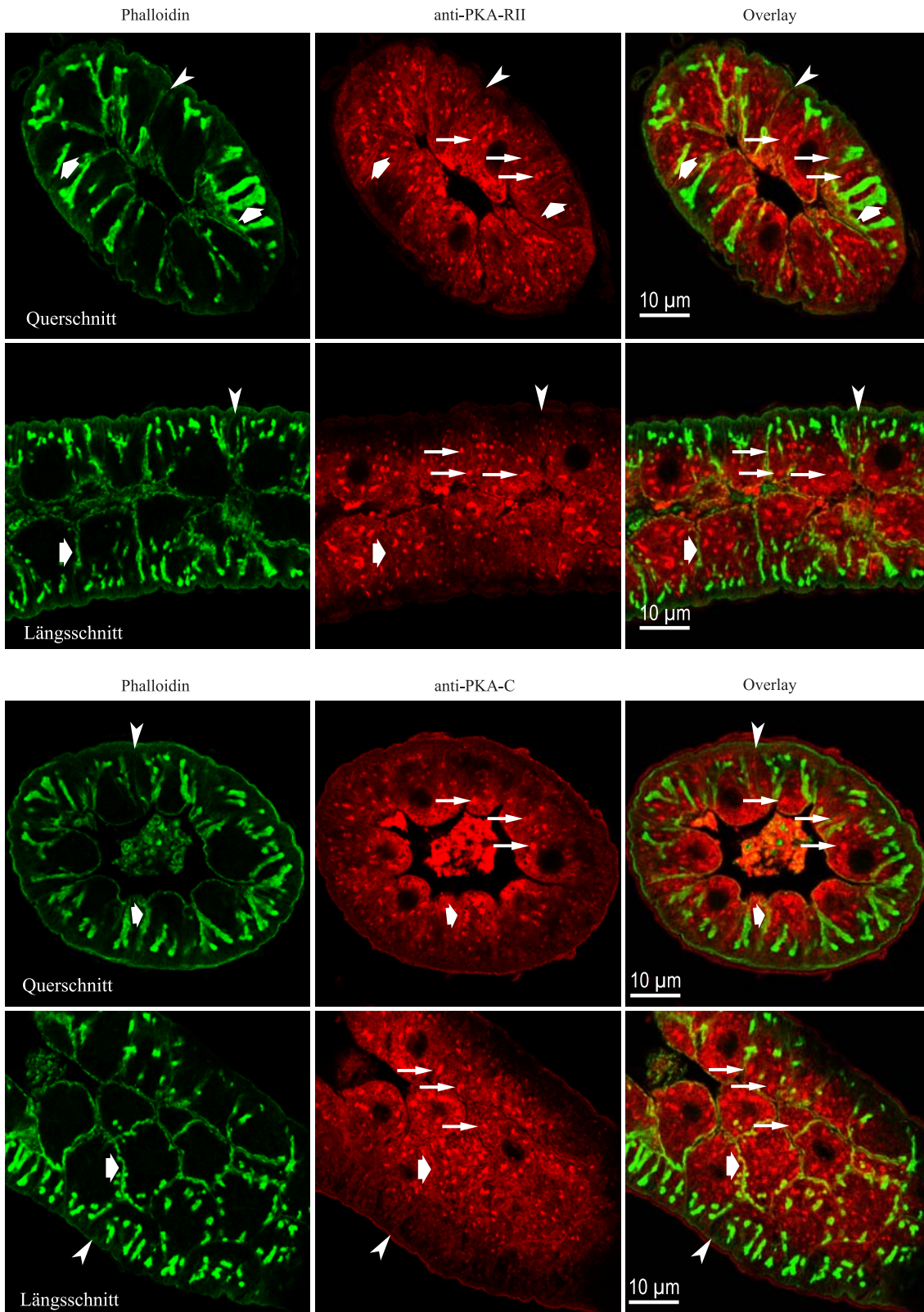
sen wurden die basolateralen und apikalen Bereiche der Plasmamembran durch OregonGreen-Phalloidin markiert. Hier lassen sich die apikalen Einfaltungen, die Canaliculi, deutlich erkennen (breite Pfeilspitzen). Ebenfalls erkennbar sind die basolateralen Einfaltungen der Plasmamembran (schmale Pfeilspitzen). In Übereinstimmung mit den Westernblot-Untersuchungen waren die beiden Untereinheiten PKA-RII und PKA-C1 in den Speicheldrüsenzellen nachweisbar. Der Antikörper gegen PKA-RII zeigte eine Lokalisation dieser Untereinheit an basolateralen und apikalen Bereichen der Plasmamembran. Zudem wurden 1-3  $\mu\text{m}$  große punkt- bis ellipsoidförmige Strukturen im gesamten Zytoplasma markiert (Pfeile). Weiterhin zeigte sich eine schwache diffuse Verteilung des Antikörpers im gesamten Zytoplasma. Immunfluoreszenzfärbungen mit anti-PKA-C1 wiesen ein ähnliches Verteilungsmuster dieser Untereinheit in den Speicheldrüsenzellen auf. Wie der Antikörper gegen die PKA-RII markierte dieser Antikörper Bereiche der basolateralen und apikalen Plasmamembranen. Ebenso wurden diskrete Strukturen im Zytoplasma detektiert.

---

Abbildung 3.29 (Seite 59):

Dargestellt sind konfokale Bilder von Quer- und Längsschnitten der Speicheldrüse. Erste Spalte: OregonGreen-Phalloidin-Markierung; zweite Spalte: Anti-PKA-RII bzw. Anti-PKA-C1; dritte Spalte Zweikanalbild. Beide Antikseren kolokalisieren mit OregonGreen-Phalloidin in den Bereichen der apikalen Plasmamembran (breite Pfeilspitzen) und der basalen Plasmamembran (schmale Pfeilspitzen). Von beiden Antikörpern wurden punkt- bis ellipsoidförmige zytoplasmatische Strukturen markiert (Pfeile).





**Abbildung 3.29:** Lokalisation der PKA in den Speicheldrüsenzellen; Erläuterungen auf S. 58.

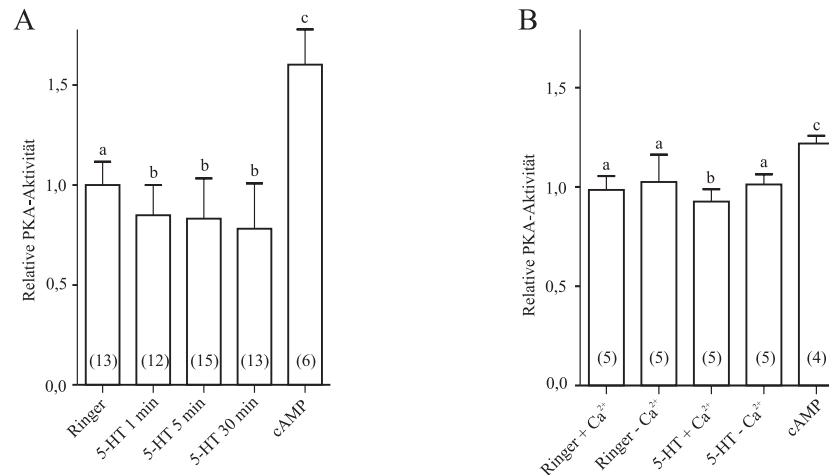
### 3.3 5-HT-induzierte Änderungen in den Proteinkinase-Aktivitäten

[cAMP]<sub>i</sub> - und [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> -Änderungen entfalten ihre physiologische Wirkung unter anderem über eine Aktivierung von Proteinkinasen (PKA, PKC, CaM-Kinase II). Im Rahmen dieser Arbeit wurde auch untersucht, ob 5-HT in den Speicheldrüsen von *C. vicina* messbare Änderungen in der Aktivität o.g. Proteinkinasen bewirkt. Diese Messungen sind zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch nicht abgeschlossen. Erste Ergebnisse sollen jedoch an dieser Stelle als Grundlage für weitergehende Untersuchungen beschrieben werden.

#### 3.3.1 5-HT-induzierte Änderung der PKA-Aktivität

Die Aktivität der PKA wurde durch die Phosphorylierung des Phosphatase-Inhibitors I in Speicheldrüsenhomogenaten gemessen. Der Phosphatase-Inhibitor I ist bei Insekten ein spezifisches Substrat der PKA (Hildebrandt und Müller, 1995). Überraschenderweise zeigte eine Stimulierung der Speicheldrüsen mit 100 nM 5-HT für 1, 5 und 30 min eine signifikante Reduzierung der PKA-Aktivität von 85% ± 15% über 83% ± 20% auf 78% ± 22% der Grundaktivität (Abb. 3.30A). Diese Änderungen waren zwar gering, erweisen sich jedoch als statistisch signifikant. Zur Kontrolle wurde eine Stimulierung der Drüsen mit 5 mM cAMP durchgeführt, was zu einer Aktivierung der PKA auf 160% ± 17% führte.

Ca<sup>2+</sup> kann in vielfältiger Weise auf den cAMP-Haushalt einwirken und deshalb auch die PKA-Aktivität beeinflussen (Cooper *et al.*, 1995; Berridge *et al.*, 2000; Bruce *et al.*, 2003). Um zu überprüfen, ob der durch 5-HT induzierte Anstieg der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> einen Einfluss auf die Aktivität der PKA besitzt, wurden PKA-Aktivitätsmessungen unter Ca<sup>2+</sup>-freien Bedingungen durchgeführt (Abb. 3.30B). Im Gegensatz zu einer 5-HT-Stimulierung in Ca<sup>2+</sup>-haltigem Ringer zeigte eine Stimulierung mit 5-HT unter Ca<sup>2+</sup>-freien Bedingungen keine Änderung der PKA-Aktivität. Eine Kontrollstimulierung mit cAMP führte in diesen Experimenten zu einem Anstieg der PKA-Aktivität auf 121% ± 4% der Grundaktivität.

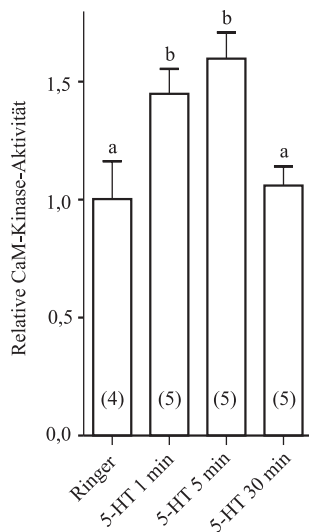


**Abbildung 3.30:** Änderung der PKA-Aktivität nach Stimulierung mit 100 nM 5-HT für 1, 5 und 30 min (A). (B) Änderung der PKA-Aktivität nach Stimulierung mit 100 nM 5-HT für 5 min unter Ca<sup>2+</sup>-freien und Ca<sup>2+</sup>-haltigen Bedingungen. Dargestellt ist der MW + SD der relativen Aktivität der PKA bezogen auf den MW der Aktivität der PKA im Ringer. Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der getesteten Drüsen bei dem entsprechenden Versuchsansatz an. Statistische Auswertung: Kruskal-Wallis-Test;  $p < 0,05$ . Mittelwerte, welche nicht mit dem gleichen Buchstaben markiert wurden, sind signifikant unterschiedlich.

### 3.3.2 5-HT-induzierte Änderung der CaM-Kinase II-Aktivität

Die Aktivität der CaM-Kinase II wurde durch die Phosphorylierung eines synthetischen Peptides in Speicheldrüsenhomogenaten gemessen. Die Spezifität dieses Substrates für CaM-Kinase II in Insekten wurde von [Altfelder \*et al.\* \(1991\)](#) nachgewiesen. [Abbildung 3.31](#) zeigt, dass eine Stimulierung der Drüsen mit 100 nM 5-HT für 1 und 5 min zu einer Steigerung der Aktivierung auf  $144\% \pm 23\%$  bzw  $159\% \pm 24\%$  der Grundaktivität der CaM-Kinase II führt. Stimulierung der Drüsen mit 100 nM 5-HT für 30 min reduzierte die CaM-Kinase II-Aktivität wieder auf ihren Ausgangswert.





**Abbildung 3.31:** Änderung der CaM-Kinase II-Aktivität nach Stimulierung mit 100 nM 5-HT. Dargestellt ist der MW + SD der relativen Aktivität der CaM-Kinase II bezogen auf den MW der Aktivität der CaM-Kinase II im Ringer. Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der getesteten Drüsen bei dem entsprechenden Versuchsansatz an. Statistische Auswertung: Kruskal-Wallis-Test;  $p < 0,05$ . Mittelwerte, welche nicht mit dem gleichen Buchstaben markiert wurden, sind signifikant unterschiedlich.

### 3.3.3 5-HT-induzierte Änderung der PKC-Aktivität

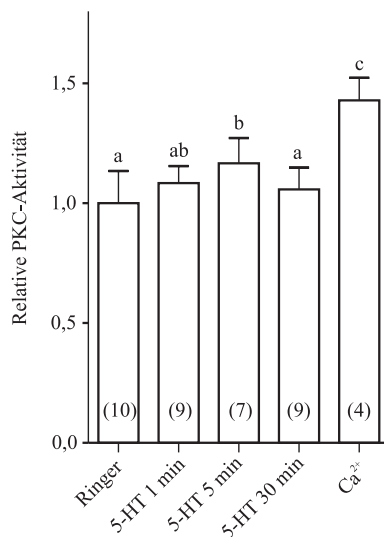
Die Aktivität einer PKC wurde durch die Phosphorylierung von MARCKS-Protein durch die PKC in Speicheldrüsenhomogenaten gemessen (Abb. 3.32). Eine Stimulierung der Speicheldrüsen mit 100 nM 5-HT für 1 min zeigte einen leichten, nicht signifikanten Anstieg der PKC-Aktivität. Eine Stimulierung der Drüsen mit 100 nM 5-HT für 5 min führte zu einem signifikanten Anstieg der Aktivität auf  $116\% \pm 10\%$  der Grundaktivität. Nach 30 min Stimulierung der Drüsen mit 100 nM 5-HT wurde die PKC-Aktivität auf ihren Ausgangswert reduziert.

Die PKC wird durch DAG und  $\text{Ca}^{2+}$  aktiviert. Daher wurde zur Kontrolle der Spezifität des Tests dem Versuchsansatz 2 mM  $\text{CaCl}_2$  zugegeben. Dies führte zu einer Aktivierung der PKC auf  $142\% \pm 9\%$  der Grundaktivität.

### 3.3.4 Lokalisation der PKC in den Speicheldrüsen

Die Messungen der PKC-Aktivität zeigten, dass die PKC in den Speicheldrüsen von *C. vicina* durch 5-HT aktiviert werden kann. Daher wurde in den nachfolgenden Experimenten die Lokalisation der PKC in den Speicheldrüsen untersucht.

Mit Hilfe eines kommerziellen Antikörpers gegen den 20 Aminosäure umfassenden Bereich des C-Terminus der PKC $\alpha$  aus *Homo sapiens* wurde in Westernblot- und Immunfluoreszenz-Untersuchungen die Lokalisation der PKC in den Speicheldrüsen analysiert.



**Abbildung 3.32:** Änderung der PKC-Aktivität nach Stimulierung mit 5-HT. Dargestellt ist der MW + SD der relativen Aktivität der PKC bezogen auf den MW der Aktivität der PKC im Ringer. Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der getesteten Drüsen bei dem entsprechenden Versuchsansatz an. Statistische Auswertung: Kruskal-Wallis-Test;  $p < 0,05$ . Mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnete Mittelwerte sind signifikant verschieden.

Durch Vergleichen der Aminosäuresequenz der cPKC $\alpha$  von *H. sapiens* (Finkenzeller *et al.*, 1990) und homologer PKC-Sequenzen aus *D. melanogaster* wurde überprüft, ob dieser Antikörper gegen den C-Terminus der PKC von *H. sapiens* eine Kreuzreaktivität mit dem C-Terminus von *C. vicina* zeigen könnte (Abb. 3.33). Ein Vergleich der PKC-Sequenz von *H. sapiens* mit den bekannten PKC-Sequenzen von *D. melanogaster* zeigte eine 65%ige Identität und eine 82%ige Ähnlichkeit mit den PKC-Sequenzen der gehirnspezifischen dPKC53E (Rosenthal *et al.*, 1987), eine 48%ige Identität und 71%ige Ähnlichkeit mit der augenspezifischen dPKC53E (Schaeffer *et al.*, 1989). Ein Vergleich der PKC von *H. sapiens* mit der gehirnspezifischen Form dPKC98E (Schaeffer *et al.*, 1989) zeigte eine 37%ige Identität und eine 55%ige Ähnlichkeit.

Diese Sequenzanalysen zeigten, dass eine hohe Ähnlichkeit zwischen der PKC-Sequenz von *H. sapiens* und den PKC-Sequenzen von *D. melanogaster* besteht. Zudem zeigte sich eine hohe Sequenzähnlichkeit in dem 20 Aminosäurereste umfassenden Bereich des C-Terminus (gegen den dieser Antikörper hergestellt wurde) zwischen der PKC-Sequenz von *H. sapiens* und der gehirnspezifischen dPKC53E, der augenspezifischen dPKC53E und der gehirnspezifischen dPKC98E von *D. melanogaster* (jeweils 30% identische Aminosäurereste, 50% ähnliche Aminosäurereste). Durch dieses Ergebnis und den Umstand, dass es sich bei diesem Antikörper um einen polyklonalen Antikörper handelt, besteht die Möglichkeit einer Kreuzreaktivität des Antikörpers gegen den C-Terminus der PKC von *H. sapiens* mit dem C-Terminus einer PKC aus *C. vicina*.

PKC Hs	-----	1
PKC Dm 53E (Gehirn)	-----	1
PKC Dm 53E (Auge)	-----MAAAAVATPGATVLP	15
PKC Dm 98E (Gehirn)	MFTGKLQIKVCEASGLRPTDFQKRHNLTFGKLADEQLIDPVVSDVDESHFDRAATTRPKTFDPVWNEQFVHVDVTVNSVINLTVFHDAAALP	90
PKC Hs	-----MADVFPNDSTAS-----QDVANRFA-----RKGALRCKNVHEV	34
PKC Dm 53E (Gehirn)	-----MSEGSDNNGDPQQ-----QGAEFAVGENKMKSR-----TRKCALKKNVFNV	43
PKC Dm 53E (Auge)	P-----SVPSPAAPGAKAPAGAGKGPGLNLEITCEANIVNYMKNR-----TRKGMKRRKGLDEM	69
PKC Dm 98E (Gehirn)	PDDFVANCIIISFEDLMQSETAVQDLWVN-----LEPOCKIHVILIELKNRTDKAKAAEAVVEHTVAVNKEFKERAGFNRRKGMARRR-VHGV	174
PKC Hs	KDHCFAARFFKQPTFCSSHCTDFIWC-----FGKQGFQCVQCFVVKRCHHEVTFSCPGADKGFDDDPFS-----KHKFK	105
PKC Dm 53E (Gehirn)	KDHCFAARFFKQPTFCSSHCTDFIWCQYQSGYAMMFGKQGFQCVQCFVVKRCHHEVTFSCPGADKGFDDDPFS-----KHKFK	123
PKC Dm 53E (Auge)	NGHMFGRFFKQPTFCSSHCTDFIWC-----FGKQGFQCVQCFVVKRCHHEVTFSCPGADKGFDDDPFS-----KHKFK	140
PKC Dm 98E (Gehirn)	NGHMFGRFFKQPTFCSSHCTDFIWC-----FGKQGFQCVQCFVVKRCHHEVTFSCPGADKGFDDDPFS-----KHKFK	255
PKC Hs	IHTVGSPTFCDHCGSLLYGLIHQGVKQDTCMNVKQCVINVPSTCGMDHTEKGRITLYLKAEMADEKLRVTVRDAKNIIPMDPENGSDPY	195
PKC Dm 53E	PFTYAGPTFCDHCGSLLYGLIYHQGVKQDTCMNVKQCVINVPSTCGMDHTEKGRITLYLKAEMADEKLRVTVRDAKNIIPMDPENGSDPY	213
PKC Dm 53E (Auge)	STTYTPTFCDHCGSLLYGLIYHQGVKQDTCMNVKQCVINVPSTCGMDHTEKGRITLYLKAEMADEKLRVTVRDAKNIIPMDPENGSDPY	230
PKC Dm 98E	VHSYKRFPTFCDHCGSLLYGLIKQGVKQDTCMNVKQCVINVPSTCGMDHTEKGRITLYLKAEMADEKLRVTVRDAKNIIPMDPENGSDPY	312
PKC Hs	VKLLIIPDPKNEKQKTKTIRSTLNPNNESTFKLRKESDADRRLSVEIWDWDRITRNDFMGSLSEFVSEIMKMBASGWKLIINQDEGEY	285
PKC Dm 53E (Gehirn)	VKLLIIPDPKNEKQKTKTIRSTLNPNNESTFKLRKESDADRRLSVEIWDWDRITRNDFMGSLSEFVSEIMKMBASGWKLIINQDEGEY	303
PKC Dm 53E (Auge)	YAVQMHPPDRSGRKKTKTIRSTLNPNNESTFKLRKESDADRRLSVEIWDWDRITRNDFMGSLSEFVSEIMKMBASGWKLIINQDEGEY	320
PKC Dm 98E (Gehirn)	SSLGHSPTKQPRSSK-----YLN-----GGEDNYGASLGADGAGPQSER-CCALSVDLSLATSTT-----HMTSC-V	376
PKC Hs	YNVFIPGDEEGNMBEIKRFEKALGFPAGNKVISPSEDRKQPSNNDRVKLIIDFNFMVLGKGSFGKVMLAERKGTDELYAIKILKDDVI	375
PKC Dm 53E (Gehirn)	YNVFIPGDEEGNMBEIKRFEKALGFPAGNKVISPSEDRKQPSNNDRVKLIIDFNFMVLGKGSFGKVMLAERKGTDELYAIKILKDDVI	386
PKC Dm 53E (Auge)	YNVFIPGDEEGNMBEIKRFEKALGFPAGNKVISPSEDRKQPSNNDRVKLIIDFNFMVLGKGSFGKVMLAERKGTDELYAIKILKDDVI	407
PKC Dm 98E (Gehirn)	NSSSCMS-----IAVTSGGGV-----ATGTRPGKCS-----LIDFNFMVLGKGSFGKVMLAERKGTDELYAIKILKDDVI	444
PKC Hs	IQDDDVCECTMVEKRLALALDHPFLTQLHSCFQTDRLFFVMEYVNGDLMQIQCFKPKFEPVAFYAAETIAGLFFLEKGIYRDLK	465
PKC Dm 53E (Gehirn)	IQDDDVCECTMVEKRLALALDHPFLTQLHSCFQTDRLFFVMEYVNGDLMQIQCFKPKFEPVAFYAAETIAGLFFLEKGIYRDLK	476
PKC Dm 53E (Auge)	IQDDDVCECTMVEKRLALALDHPFLTQLHSCFQTDRLFFVMEYVNGDLMQIQCFKPKFEPVAFYAAETIAGLFFLEKGIYRDLK	497
PKC Dm 98E (Gehirn)	IQDDDVCECTMVEKRLALALDHPFLTQLHSCFQTDRLFFVMEYVNGDLMQIQCFKPKFEPVAFYAAETIAGLFFLEKGIYRDLK	534
PKC Hs	LDNVLLDADGHKADDFGMCKEHNMGVITRTFCGTPDYIAPETIYQPYGRSVDWAWGVLLYEMHAGQPPFGDEDELFOSIMHNV	555
PKC Dm 53E (Gehirn)	LDNVLLDADGHKADDFGMCKEHNMGVITRTFCGTPDYIAPETIYQPYGRSVDWAWGVLLYEMHAGQPPFGDEDELFOSIMHNV	566
PKC Dm 53E (Auge)	LDNVLLDADGHKADDFGMCKEHNMGVITRTFCGTPDYIAPETIYQPYGRSVDWAWGVLLYEMHAGQPPFGDEDELFOSIMHNV	587
PKC Dm 98E (Gehirn)	LDNVLLDADGHKADDFGMCKEHNMGVITRTFCGTPDYIAPETIYQPYGRSVDWAWGVLLYEMHAGQPPFGDEDELFOSIMHNV	624
PKC Hs	SYPRSLSKAEAVSICKGLMTRKHEAMRLGCGEGERDVRHHPFRFDWKELENRETPPPFKPKVCGGAEN-FFKFFRGGQPVLTTPDQLV	644
PKC Dm 53E (Gehirn)	SYPRSLSKAEAKACKGFLTKQFNRLGCGSSSEEDVRHHPFRFDWKELENRETPPPFKPKVCKHRKDVSNFDKQFSEKDTLTPDKVF	656
PKC Dm 53E (Auge)	VFPKHSVEAMDITTSFLTKRPNRLGAGRYARQETITHPFRFDWKELENRETPPPFKPKVCKHRKDVSNFDKQFSEKDTLTPDKVF	677
PKC Dm 98E (Gehirn)	IYFYWLSREAVSILKGFILTRNPPRLGCGTGD-ENEIRKHPFAKLDWKELENRETPPPFKPKVCKHRKDVSNFDKQFSEKDTLTPDKVF	713
PKC Hs	ANLQSTFEGFSYVNPQFVHPILQSAV	672
PKC Dm 53E (Gehirn)	MMNLLQSTFEGFSYVNPQFVHPILQSAV	679
PKC Dm 53E (Auge)	MMNLLQSTFEGFSYVNPQFVHPILQSAV	700
PKC Dm 98E (Gehirn)	MRCINQSTFEGFSYVNPQFVHPILQSAV	739

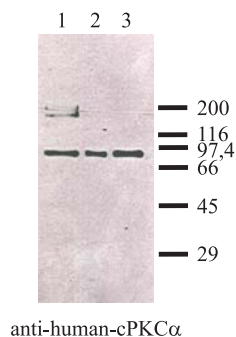
Abbildung 3.33: Dargestellt ist der Aminosäuresequenzvergleich von *H. sapiens* cPKC $\alpha$  (Accession number #P17252) mit *D. melanogaster* gehirnspezifischer dPKC53E (Accession number #P05130), augenspezifischer dPKC53E (Accession number #P13677), gehirnspezifischer dPKC98E (Accession number #P13678). Identische Aminosäuren sind schwarz, ähnliche Aminosäuren grau hinterlegt. Zur Optimierung des Vergleiches wurden Lücken (-) eingefügt. Die Position der letzten Aminosäure jeder Zeile ist rechts neben der Sequenz angegeben. Der 20 Aminosäurereste umfassende Bereich, gegen den der verwendete Antikörper hergestellt wurde, ist umrahmt.

### 3.3.4.1 Western-Blot-Analysen

Die Kreuzreaktivität des Antikörpers gegen des C-Terminus der PKC $\alpha$  von *H. sapiens* wurde auf Western-Blots mit Homogenat von *D. melanogaster*-Köpfen, *C. vicina*-Köpfen

und *C. vicina*-Speicheldrüsen untersucht (Abb. 3.34). Der Antikörper markierte in allen Homogenaten jeweils eine distinkte Bande mit einem Molekulargewicht von ca. 89 kDa. Diese hat ein etwas größeres Molekulargewicht als die angegebenen molekularen Massen der gehirnspezifischen dPKC53E von 77 kDa, der augenspezifischen dPKC53E von 80 kDa und der gehirnspezifischen dPKC98E von 71 kDa.

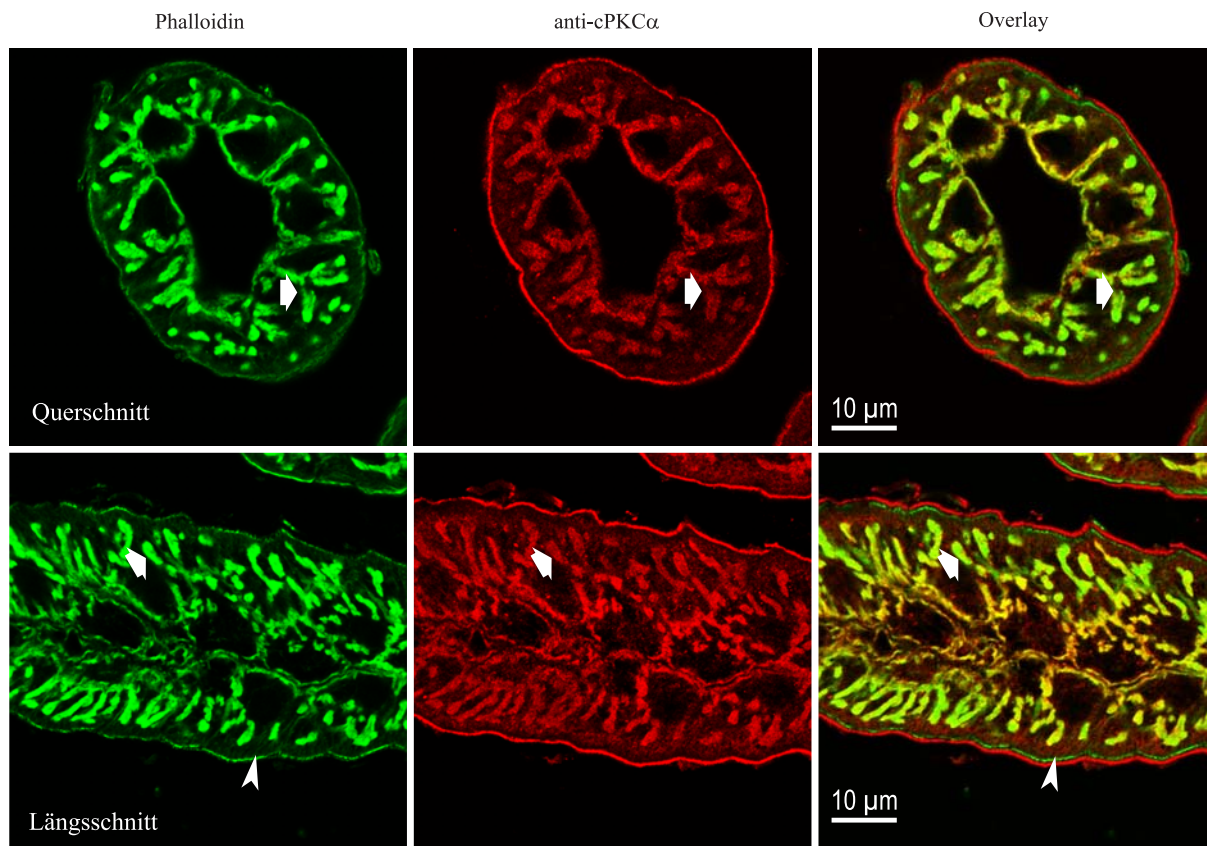
Diese Analysen deuten auf eine Kreuzreaktivität des Antikörpers gegen den C-Terminus der *H. sapiens* cPKC $\alpha$  mit einer PKC von *D. melanogaster* und *C. vicina* hin.



**Abbildung 3.34:** Kreuzreaktivität des Antikörpers gegen cPKC $\alpha$  aus *H. sapiens* mit entsprechenden Proteinen aus (1) *D. melanogaster*-Köpfen, (2) Köpfen von *C. vicina* sowie (3) Speicheldrüsen von *C. vicina*.

### 3.3.4.2 Immunofluoreszenz-Untersuchungen

Immunfluoreszenz-Färbungen wurden an Gefrierschnitten der Speicheldrüse durchgeführt, um die subzelluläre Lokalisation der PKC in den Speicheldrüsen zu untersuchen. Abbildung 3.35 zeigt die Ergebnisse dieser Färbungen. In Übereinstimmung mit den Western-Blot-Untersuchungen war eine PKC in den Gefrierschnitten der Speicheldrüsenzellen nachweisbar. Der Antikörper zeigte eine Lokalisation an den apikalen Einfaltungen der Plasmamembran, den Canaliculi (breite Pfeilspitzen). Zusätzlich markierte der Antikörper die Basallamina. In unserer Arbeitsgruppe wurde jedoch festgestellt, dass Antikörper, welche gegen intrazelluläre Proteine gerichtet waren, manchmal eine Markierung der Basallamina in der Speicheldrüse von *C. vicina* zeigen. Deshalb kann die Markierung der Basallamina auf unspezifische Bindungen des Antikörpers zurückgeführt werden.



**Abbildung 3.35:** Lokalisation der PKC in den Speicheldrüsenzellen. Dargestellt sind konfokale Bilder von Quer- und Längsschnitten der Speicheldrüse. Erste Spalte OregonGreen-Phalloidin-Markierung (F-Aktin), zweite Spalte Anti- $cPKC\alpha$ , dritte Spalte Zweikanalbild. Phalloidin markierte die basolateralen (schmale Pfeilspitzen) und apikalen (breite Pfeilspitzen) Bereiche der Plasmamembran. Der Antikörper zeigte Kolokalisationen mit F-Aktin in den Bereichen der apikalen Plasmamembran (breite Pfeilspitzen).

# Kapitel 4

## Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollten die Kenntnisse über die cAMP und die  $IP_3/Ca^{2+}$ -vermittelte Signalübertragung am Modell der Speicheldrüse von *C. vicina* erweitert werden. Wesentliches Ziel der Arbeit war die Untersuchung der Frage, ob/wie sich die durch das Hormon Serotonin parallel aktivierten cAMP- und  $Ca^{2+}$ -Signalwege wechselseitig beeinflussen. Vertiefend sollte die Frage untersucht werden, welche Bedeutung den Proteinkinasen bei möglichen Wechselwirkungen dieser beiden Signalwege zukommt.

Auch in anderen Systemen, wie den Acinuszellen der Bauchspeicheldrüse und der Ohrspeicheldrüse oder den Hepatozyten, werden seit vielen Jahren die komplexen Wechselwirkungen zwischen dem cAMP- und dem  $Ca^{2+}$ -Signalweg untersucht (Rasmussen, 1981; Cooper *et al.*, 1995; Mons *et al.*, 1998; Garbunova und Spitzer, 2002; Berridge *et al.*, 2000; Bruce *et al.*, 2003; Zaccolo und Pozzan, 2003). Hierbei zeigte sich, dass durch  $Ca^{2+}$  über modulatorische Wirkungen auf die AC und die PDE die  $[cAMP]_i$  beeinflusst werden kann. Ebenso kann cAMP, vermutlich über die PKA,  $Ca^{2+}$ -Kanäle und  $Ca^{2+}$ -ATPasen in der Plasmamembran und der ER-Membran beeinflussen.

Die genauen Mechanismen dieser Wechselwirkungen und ihre physiologischen Auswirkungen sind jedoch unzureichend bekannt. Insbesondere in Invertebraten konnten in diesem Zusammenhang kaum Erkenntnisse gewonnen werden. Einige Ergebnisse in den Arbeiten von Berridge *et al.* an Speicheldrüsen von *C. vicina* ließen aber bereits vermuten, dass sich der  $IP_3/Ca^{2+}$ -Signalweg und der cAMP-Signalweg gegenseitig beeinflussen (Berridge, 1981a, b; Berridge und Prince, 1972a; Prince *et al.*, 1973). So zeigte sich, dass bei einer Stimulierung mit



5-HT die cAMP-Konzentration in den Speicheldrüsenzellen in  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Versuchslösungen stärker ansteigt als in  $\text{Ca}^{2+}$ -haltiger Lösung (Prince *et al.*, 1973). Diese Beobachtung deutet auf eine hemmende Wirkung von  $\text{Ca}^{2+}$  auf den cAMP-Signalweg hin. Weiterhin zeigten Messungen des TEP der isolierten Drüsen, dass cAMP die 5-HT induzierten Oszillationen des TEP verändert. Diese Veränderungen des TEP lassen eine Beeinflussung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalweges durch cAMP vermuten (Berridge, 1981a, b). Ebenso konnte unter  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Bedingungen keine cAMP-induzierte Flüssigkeitsekretion beobachtet werden (Berridge und Prince, 1972a).

#### 4.1 5-F- $\alpha$ -MT und Histamin als selektive Agonisten der cAMP-Signalkaskade?

Die Elektrolyt- und Flüssigkeitssekretion in den Speicheldrüsen von *C. vicina* wird durch das biogene Amin 5-HT stimuliert, welches an zwei verschiedene G-Protein-gekoppelte Rezeptoren bindet. Bindung an einen dieser beiden Rezeptoren führt über die Aktivierung einer AC zu einem Anstieg der  $[\text{cAMP}]_i$  und damit zu einem netto  $\text{K}^+$ -Transport in das Lumen der Drüse, während die Bindung an den zweiten Rezeptor durch die Aktivierung der PLC zu einem Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  und damit zu einer Aktivierung  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger  $\text{Cl}^-$ -Kanäle führt (Berridge, 1970; Prince *et al.*, 1973; Berridge *et al.*, 1976; Fain und Berridge, 1979a; Berridge und Heslop, 1981). Die pharmakologische Charakterisierung dieser Rezeptoren führten zu der Schlussfolgerung, dass 5-HT-Analoga, welche an der 5. Position des Indolringes substituiert wurden (z.B. 5-Cl-Tryptamin), zu einem Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration führen, ohne den cAMP-Signalweg zu beeinflussen. Im Gegensatz dazu induzieren 5-HT-Analoga, welche eine Methylgruppe am  $\alpha$ -C-Atom der Ethylamid-Seitenkette besitzen (z.B. 5-F- $\alpha$ -MT und Histamin), offenbar einen Anstieg der  $[\text{cAMP}]_i$ , ohne einen Einfluss auf die  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  zu besitzen (Berridge, 1981a, b; Berridge und Heslop, 1981). Aus diesen Gründen erschienen 5-F- $\alpha$ -MT und Histamin geeignete Mittel, um die physiologischen Effekte von cAMP unabhängig von einer parallelen Aktivierung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalweges zu untersuchen.

### 4.1.1 5-F- $\alpha$ -MT und Histamin induzieren Änderungen der $[Ca^{2+}]_i$

Die Untersuchungen über die Wirkung von 5-F- $\alpha$ -MT auf das TEP zeigten, dass 5-F- $\alpha$ -MT eine tonische Negativierung des TEP verursachte (Abb. 3.1). Sättigende 5-HT-Konzentrationen induzierten ebenfalls eine tonische Negativierung des TEP, hervorgerufen durch den transepithelialen  $Cl^-$ -Transport, der die Polarität des TEP dominiert (Berridge und Prince, 1972b, c). Die Ursache der durch 5-F- $\alpha$ -MT induzierten Negativierung des TEP ist deshalb mit einer Erhöhung der  $Cl^-$ -Leitfähigkeit zu begründen. Demnach führt 5-F- $\alpha$ -MT nicht nur zu einer Erhöhung der  $[cAMP]_i$  (Berridge, 1981a; Berridge und Heslop, 1981; Berridge, 1981b), sondern vermutlich auch zu einer Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$ . 5-F- $\alpha$ -MT ist somit nicht geeignet, um in den Speicheldrüsen von *C. vicina* den cAMP-Weg selektiv zu aktivieren.

Eine weitere Substanz, welche geeignet erschien nur den cAMP-Signalweg zu aktivieren, war Histamin. Eine Zusammenfassung der im Folgenden diskutierten Ergebnisse findet sich in Tab. 4.1.

**Tabelle 4.1:** Vergleich der 5-HT- und Histamin-induzierten Effekte

Effekt	3 nM 5-HT	30 nM 5-HT	10 mM Histamin
Sekretionsrate	3 nl/min <sup>(2)</sup>	40 nl/min <sup>(2)</sup>	32 nl/min <sup>(2)</sup>
Max. cAMP Produktion	150 fmol/Drüse <sup>(1)</sup>	300 fmol/Drüse <sup>(1)</sup>	200 fmol/Drüse <sup>(2)</sup>
<sup>45</sup> Ca <sup>2+</sup> -Transport	80 ct/Drüse min <sup>-1</sup> <sup>(2)</sup>	100 ct/Drüse min <sup>-1</sup> <sup>(2)</sup>	— <sup>(2)</sup>
[ <sup>3</sup> H]-inositol-Freisetzung	0,6 % Freisetzung	1 % Freisetzung	keine Freisetzung <sup>(2)</sup>
Ca <sup>2+</sup> -Anstieg, Latenz	13,8 ± 9,9 s <sup>(5)</sup>	17,8 ± 11,7 s <sup>(5)</sup>	58,6 ± 19,3 s <sup>(5)</sup>
TEP-Änderung, Latenz	8,9 ± 2,8 s <sup>(5)</sup>	10,5 ± 2,8 s <sup>(5)</sup>	30,6 ± 16,1 s <sup>(5)</sup>
TEP-Oszillationen	3,2 ± 0,2 min <sup>-1</sup> <sup>(5)</sup> unregelmäßig <sup>(1,2)</sup>	—	4,0 ± 0,2 min <sup>-1</sup> <sup>(5)</sup> regelmäßig, <sup>(1,2,5)</sup> annähernd sinusoidal
Ca <sup>2+</sup> -Oszillationen	3,7 ± 0,5 min <sup>-1</sup> <sup>(3)</sup> fortlaufende Wellen <sup>(3,4)</sup>	—	3,1 ± 0,6 min <sup>-1</sup> <sup>(5)</sup> lokal, synchrones <i>beaten</i> <sup>(5)</sup>

<sup>(1)</sup>Berridge und Prince (1972a), <sup>(2)</sup>Berridge und Heslop (1981), <sup>(3)</sup>Zimmermann und Walz (1997),  
<sup>(4)</sup>Zimmermann und Walz (1999), <sup>(5)</sup>diese Arbeit



Stimulierung mit 1-10 mM Histamin induzierte eine Positivierung des TEP (Abb. 3.2). Das positiv verschobene TEP oszillierte, wobei die Frequenz der Oszillationen mit ansteigenden Histamin-Konzentrationen anstieg. Im Gegensatz dazu führte eine Stimulierung mit 5-HT zu einer schnellen Negativierung des TEP. Der 5-HT-induzierte  $K^+$ -Transport und die daraus resultierende Positivierung des TEP wird erst nach dem Absetzen des 5-HT erkennbar. Durch Stimulierung mit 5-HT in  $Cl^-$ -freiem Ringer verschwindet die erste Phase der biphasischen Änderung des TEP und nur die  $K^+$ -Transport-bedingte Positivierung des TEP wird sichtbar (Berridge und Prince, 1972b, c). Die Histamin-induzierte Positivierung des TEP lässt somit auf einen massiven transepithelialen  $K^+$ -Transport schließen. Die Histamin-induzierten Oszillationen lassen sich jedoch nicht so einfach erklären.

Schwellennahe 5-HT-Konzentrationen induzierten ebenfalls Oszillationen des TEP (Abb. 3.3). Diese Oszillationen hatten einen unregelmäßigen Zeitverlauf, während Histamin-induzierte TEP-Oszillationen einen regelmäßigen, annähernd sinusförmigen Zeitverlauf zeigten. 5-HT-induzierte TEP-Oszillationen werden durch Modulation der  $Cl^-$ -Leitfähigkeit hervorgerufen (Berridge *et al.*, 1975). Durch  $Ca^{2+}$ -Messungen an isolierten Drüsen zeigte sich, dass kein Unterschied zwischen der Frequenz der 5-HT-induzierten  $Ca^{2+}$ -Oszillationen und der Frequenz der 5-HT-induzierten TEP-Oszillationen besteht (Zimmermann und Walz, 1997). Das liegt daran, dass die durch 5-HT induzierten TEP-Oszillationen durch Oszillationen der  $Cl^-$ -Leitfähigkeit entstehen, die durch Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  hervorgerufen werden (Rapp und Berridge, 1981; Zimmermann und Walz, 1997).

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten  $Ca^{2+}$ -Messungen zeigten, dass 1-10 mM Histamin ebenfalls  $Ca^{2+}$ -Oszillationen verursachte (Abb. 3.5). Steigende Histamin-Konzentrationen führten zu einem Anstieg der Oszillationsfrequenz. Ein Vergleich der Histamin-induzierten (10 mM)  $Ca^{2+}$ -Oszillationen und der Histamin-induzierten TEP-Oszillationen zeigte, dass sich die Frequenz dieser Oszillationen nicht unterscheidet (Abb. 4.1). Die Histamin-induzierten TEP-Oszillationen könnten demnach das Resultat einer durch  $Ca^{2+}$ -Oszillationen vermittelten Oszillation der  $Cl^-$ -Leitfähigkeit sein, wie nach Stimulierung mit schwelennahen 5-HT-Konzentrationen.

### 4.1.2 Histamin aktiviert die Phosphoinositidkaskade und induziert eine $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem ER

5-HT führt in den Speicheldrüsenzellen zu einem Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  über eine  $\text{IP}_3$ -vermittelte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem ER (Zimmermann und Walz, 1997). Die in dieser Arbeit durchgeführten Messungen zeigten, dass auch die Histamin-vermittelten  $\text{Ca}^{2+}$ -Änderungen zumindest teilweise auf eine  $\text{IP}_3$ -induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem ER zurückzuführen sind. So induzierte Histamin in  $\text{Ca}^{2+}$ -freiem Ringer eine transiente  $\text{Ca}^{2+}$ -Erhöhung (Abb. 3.7). Unter  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Bedingungen konnten nie Histamin-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen beobachtet werden. Auch die nachfolgende Stimulierung bei physiologischen extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen führte nicht zu Histamin-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen. Deshalb scheint der Histamin-induzierte tonische Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  und die Histamin-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  abhängig zu sein.

Auch in anderen Systemen wurde nachgewiesen, dass  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  abhängen (Fewtrell, 1993). In den Acinuszellen der Ohrspeicheldrüse, basophilen Leukämie-Zellen (RBL-Zellen) oder Leberzellen führt eine Stimulation zu einer periodischen  $\text{IP}_3$ -induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem ER und  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase-abhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme in das ER (Foskett und Wong, 1994; Woods *et al.*, 1986; Millard *et al.*, 1989). Zur Aufrechterhaltung dieser  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen wird ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom über die Plasmamembran benötigt, um die  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher zu füllen. Im Gegensatz dazu hängen Oszillationen der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in T-Zellen absolut von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  ab (Dolmetsch und Lewis, 1994). In diesem Zelltyp führt die Bindung eines Antigens an den TCR-Rezeptor zu einer  $\text{IP}_3$ -induzierten Entleerung des ER. Entleerung des ER aktiviert einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom über *Ca<sup>2+</sup>-release-activated Ca<sup>2+</sup>-channels* ( $I_{\text{CRAC}}$ ). Die  $I_{\text{CRAC}}$ -Kanäle öffnen periodisch. Dies führt zu einem periodischen Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  und zur periodischen Wiederbefüllung des ER. Letzteres verursacht die Schließung der  $I_{\text{CRAC}}$ -Kanäle. Durch die Aktivität der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen der Plasmamembran und des ER sinkt die  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ .

Die 5-HT-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen in der Speicheldrüse von *C. vicina* sind das Resultat einer periodischen  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen und  $\text{IP}_3$ -induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem ER (Zimmermann und Walz, 1997). Zur Aufrechterhaltung dieser  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen wird auch

ein Einstrom von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  benötigt. Diese  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen hängen also, wie die  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen der Acinuszellen der Ohrspeicheldrüse, nur zum Teil von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  ab. Sättigende 5-HT-Konzentrationen verursachen unter  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Bedingungen einen transienten  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg (Zimmermann und Walz, 1997). In einigen Fällen kommt es anschließend zu  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen. Diese können durch den  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase-Hemmstoff Thapsigargin blockiert werden. Für die Aufrechterhaltung der durch 30 nM 5-HT induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen unter  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Bedingungen muss also eine Wiederbefüllung des ER stattfinden.

Das Fehlen von Histamin-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen unter  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Bedingungen könnte die Ursache in einer schnellen und anhaltenden massiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem ER haben, ähnlich wie bei einer Stimulierung mit sättigenden 5-HT-Konzentrationen, in denen keine  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen auftraten oder in denen die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase gehemmt wurde.

Eine weitere Bestätigung, dass die Histamin-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Änderung auf eine  $\text{IP}_3$ -induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem ER zurückzuführen sind, lieferten Experimente mit dem PLC-Hemmstoff U73122 (Abb. 3.8). U73122 blockiert in den Speicheldrüsenzellen die 5-HT-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Erhöhung, weil U73122 die PLC hemmt und deshalb kein  $\text{IP}_3$  gebildet wird (Zimmermann und Walz, 1999). Die Histamin-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Änderungen wurden durch U73122 ebenfalls gehemmt.

Messungen mit Yohimbin lieferten weitere Hinweise einer Histamin-induzierten Aktivierung der Phosphoinositid-Kaskade (Abb. 3.9, 3.10). Yohimbin hemmt den 5-HT-Rezeptor, welcher die Phosphoinositid-Kaskade aktiviert (Berridge und Heslop, 1981). In den hier gezeigten Experimenten unterdrückte Yohimbin reversibel die 5-HT-induzierten TEP-Oszillationen und die 5-HT-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Änderungen. Yohimbin ist also ein effektiver Hemmstoff des 5-HT-Rezeptors, welcher an die Phosphoinositid-Kaskade koppelt und zu einer  $\text{Ca}^{2+}$ -vermittelten Änderung der  $\text{Cl}^-$ -Leitfähigkeit führt.

Yohimbin hemmte auch die Histamin-induzierten TEP-Oszillationen und die Histamin-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Änderungen reversibel.

Dies zeigt, dass die Histamin-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Änderungen über eine Stimulierung des Rezeptors vermittelt wurden, welcher an die Phosphoinositid-Kaskade koppelt und so zu einer  $\text{IP}_3$ -vermittelten  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem ER führt.

Interessant ist, dass bereits Galione und Berridge (1988) zeigen konnten, dass die Hemmung der Inositol-1-Phosphatase durch Lithium die Histamin-induzierten TEP-Oszillationen beeinflusst. Die Hemmung der Inositol-1-Phosphatase führt letztendlich zum Versiegen des  $PIP_2$ -pools und der  $IP_3$ -Bildung. Nachfolgende Applikation von *myo*-inositol konnte die durch Lithium gehemmten TEP-Oszillationen wieder induzieren. Dies ist ein weiterer Hinweis für eine  $IP_3$ -vermittelte  $Ca^{2+}$ -Freisetzung durch Histamin.

### 4.1.3 Histamin ist in den Speicheldrüsen von *C. vicina* kein natürlicher Agonist der Flüssigkeitssekretion

Das biogene Amin Histamin ist, wie 5-HT, Dopamin, Tyramin und Oktopamin bei Insekten ein wichtiges neuroaktives Molekül (Monastirioti, 1999; Blenau und Baumann, 2001). Obwohl Histamin im gesamten Nervensystem der Insekten vorkommt, ist die physiologische Bedeutung des Histamins nur unzureichend untersucht (Elias und Evans, 1983). Möglicherweise wirkt Histamin nur über ionotrope Rezeptoren und nicht über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (Roder, 2003). Histamin gesteuerte  $Cl^-$ -Kanäle sind bei Insekten die bisher einzig beschriebenen Histamin-Rezeptoren (Hardie, 1989; Skingsley *et al.*, 1995). In *Drosophila* (Hardie, 1987, 1989; Nässel, 1991, 1999; Gengs *et al.*, 2002) und *Schistocerca gregaria* (Elias und Evans, 1983; Elias *et al.*, 1984) wurde Histamin als der Neurotransmitter der Photorezeptoren nachgewiesen.

In *Calliphora* konnte mit Hilfe von Antiseren gegen Histamin eine anti-Histamin-Immunreaktivität im Gehirn, im Unterschlundganglion sowie in den Thorakalganglien nachgewiesen werden (Nässel *et al.*, 1990; Nässel und Elekes, 1992). Elektronenmikroskopische Aufnahmen von *Calliphora* zeigten eine anti-Histamin-Immunreaktivität in synaptischen Endigungen außerhalb der "Blut-Hirn-Schranke". Diese könnten auf eine Ausschüttung von Histamin in die Hämolymphe hindeuten (Nässel *et al.*, 1990). Es konnte jedoch in peripheren Organen der Insekten keinerlei Histamin-Effekt nachgewiesen werden. Bisher konnten weder Histamin-Rezeptoren noch eine anti-Histamin-Immunreaktivität in den Speicheldrüsen von Insekten gezeigt werden. Diese Tatsache und die hohen Histamin-Konzentrationen (1-10 mM), welche in den hier beschriebenen Experimenten verwendet wurden, lassen vermuten, dass Hi-

stamin kein natürlicher Agonist zur Stimulierung der Flüssigkeitssekretion ist.

#### 4.1.4 Unterschiede zwischen 5-HT- und Histamin-induzierten TEP- und $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen: Phänomenologie und mögliche Ursachen

Wie 5-HT aktiviert Histamin die cAMP-Kaskade (Berridge und Heslop, 1981) und den  $\text{IP}_3/\text{Ca}^{2+}$ -Signalweg.

Drei Ergebnisse waren überraschend: 1) Die Latenz zwischen Histamin-Applikation und den Änderungen des TEP bzw. der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  waren um ca. 40 s länger als die Latenz zwischen 5-HT-Applikation und den Änderungen des TEP bzw. der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , 2) Histamin induzierte keine fortgeleiteten interzellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Wellen, und 3) die Histamin-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ - und TEP-Oszillationen waren regelmäßiger (annähernd sinusförmig) als die 5-HT-induzierten Oszillationen.

Zu 1): In den hier gezeigten Ergebnissen erwies sich Histamin als 5-HT-Rezeptor-Agonist mit geringer Affinität. Hierdurch lässt sich die längere Latenzzeit im Vergleich zu einer Stimulierung mit 5-HT erklären.

Zu 2): Es ist bekannt, dass schwelennahe 5-HT-Konzentrationen in den Speicheldrüsen von *C. vicina* interzellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Wellen verursachen, welche in den Einzelzellen intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen erzeugen bzw. koordinieren (Zimmermann und Walz, 1997, 1999). Elementare Voraussetzung für die interzellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Wellen ist die Kopplung der Drüsenzellen über *gap junctions* (Zimmermann und Walz, 1997).

Interzelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Wellen sind auch aus anderen nicht-erregbaren Zelltypen bekannt, welche über *gap junctions* gekoppelt sind (Sanderson *et al.*, 1994; Thomas *et al.*, 1996). So wird die Sekretion in isolierten Acinus-Zell-Klustern der Bauchspeicheldrüse über die Diffusion von  $\text{Ca}^{2+}$  durch die *gap junctions* koordiniert (Stauffer *et al.*, 1993). In der intakten Leber führt eine Stimulierung mit niedrigen Vasopressin-Konzentrationen zu  $\text{Ca}^{2+}$ -Wellen, welche über *gap junctions* von den peripheren Hepatozyten entlang der Leberzellbalken in die perizentrische Zone der Lebersinusoide laufen (Robb-Gaspers und Thomas, 1995).

In den hier gezeigten Experimenten induzierten niedrige Histamin-Konzentrationen (1 mM und 5 mM) lokale  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen in einzelnen Zellen. Höhere Histamin-Konzentrationen

(10 mM) induzierten entweder einen tonischen Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  oder führten zu annähernd sinusförmigen, synchronen Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  in allen Zellen eines 386  $\mu\text{m}$  langen Drüsenabschnittes. Die Darstellung dieser  $Ca^{2+}$ -Oszillationen im *space-time-plot* (Abb. 3.11) bestätigt, dass diese Oszillationen im Gegensatz zu einer Stimulierung mit niedrigen 5-HT-Konzentrationen nicht durch interzelluläre  $Ca^{2+}$ -Wellen verursacht wurden.

Weder in Acinuszellen der Bauchspeicheldrüse noch in Hepatozyten konnte ein vergleichbares Verhalten, wie das durch Histamin induzierte synchrone „ $Ca^{2+}$ -beating“ in den Speicheldrüsen von *C. vicina* beobachtet werden.

In isolierten Hepatozyten-Triplets konnten annähernd synchrone, intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Oszillationen beobachtet werden, welche nach Blockierung der *gap-junctions* zu asynchronen  $Ca^{2+}$ -Oszillationen übergingen (Tordjmann *et al.*, 1997). Aber auch diese koordinierten  $Ca^{2+}$ -Oszillationen zeigten in den benachbarten Zellen eine geringe zeitliche Verzögerung. Eine so weitgehende Synchronisation der  $Ca^{2+}$ -Oszillationen, wie in den durch Histamin stimulierten Speicheldrüsen-Zellen von *C. vicina*, konnte in den Hepatozyten nicht beobachtet werden.

Die Ausbreitung und Geschwindigkeit interzellulärer  $Ca^{2+}$ -Wellen hängt von der Zahl bzw. Leitfähigkeit der *gap junctions* ab, welche die Zellen miteinander koppeln (Saez *et al.*, 2003; Lampe und Lau, 2004). *Gap junctions* sind kanalbildende Komplexe aus jeweils 12 Connexin-Molekülen, welche die Membranen benachbarter Zellen durchqueren. Jede Zelle bildet einen Halbkanal (Connexon) aus jeweils 6 Connexin-Molekülen. Die Assemblierung/Deassemblierung dieser Connexone ist ein Faktor für die Regulation der interzellulären Kopplung. Durch Phosphorylierung der Connexin-Moleküle kann die interzelluläre Kommunikation über zahlreiche Mechanismen reguliert werden. Hierzu zählen Connexin-Biosynthese, -Transport, -Assemblierung, -Insertion und -Degradation (Saez *et al.*, 2003; Nicholson, 2003; Lampe und Lau, 2004).

Die cAMP-aktivierte PKA ist für die Regulation der interzellulären Kommunikation *via gap junctions* in Vertebraten besonders wichtig (van Veen *et al.*, 2000; Lampe und Lau, 2004; Chanson *et al.*, 1996; Paulson *et al.*, 2000). In Invertebraten werden die *gap junctions* aus den Innexinen (*Invertebrate connexin analogues*) gebildet (Phelan *et al.*, 1998; Phelan und Starich, 2001; Phelan, 2005). Klassische Untersuchungen über die Regulierung der *gap junctions* bei



Zuckmückenlarven (*Chironomus tentans*) zeigten, dass die Permeabilität der *gap junctions* von der  $[Ca^{2+}]_i$  abhängt (Rose und Loewenstein, 1976; Rose, 1980). Ob die Regulation der Permeabilität der *gap junctions* bei Invertebraten durch eine PKA beeinflusst werden kann, ist noch unklar. Insgesamt werden den Innexinen jedoch Connexin-analoge Eigenschaften zugeschrieben (Phelan und Starich, 2001).

Könnte die Ursache für das Histamin-induzierte synchrone „ $Ca^{2+}$ -beating“ eine PKA-abhängige veränderte *gap junction*-vermittelte Kopplung sein?

Untersuchungen von Berridge und Heslop (1981) und Berridge (1981b, a) hatten gezeigt, dass Stimulierung mit Histamin die  $[cAMP]_i$  stärker erhöht als 5-HT. Außerdem induzieren schwelennahe 5-HT-Konzentrationen in Gegenwart des Phosphodiesterase-Hemmstoffes Theophyllin annähernd sinusförmige TEP-Oszillationen, im Zeitverlauf ähnlich wie die Histamin-induzierten TEP-Oszillationen. Dies deutet auf eine cAMP-vermittelte Modifizierung der 5-HT-induzierten TEP-Oszillationen hin. Somit könnte das unterschiedliche Erscheinungsbild der 5-HT- und Histamin-induzierten  $Ca^{2+}$ -Oszillationen durch unterschiedliche  $[cAMP]_i$  verursacht worden sein. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher unter anderem untersucht, ob eine experimentelle Erhöhung der  $[cAMP]_i$  die durch schwelennahe 5-HT-Konzentration induzierten interzellulären  $Ca^{2+}$ -Wellen beeinflussen kann (möglicherweise über die Aktivierung einer PKA). Diese Experimente imitierten das durch Histamin induzierte synchrone „ $Ca^{2+}$ -beating“ nicht.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente liefern somit leider noch keine Erklärung für die unterschiedliche Phänomenologie der  $Ca^{2+}$ -Oszillationen nach 5-HT- und Histamin-Stimulierung.

Funktionelle Wechselwirkungen des cAMP- und  $Ca^{2+}$ -Signalweges haben sich in Vertebraten als hoch komplex erwiesen (Rasmussen, 1981; Berridge, 1982b; Berridge *et al.*, 2000; Bruce *et al.*, 2003). Ähnlich komplexe Mechanismen des cAMP- und  $Ca^{2+}$ -Signalweges können auch in den Speicheldrüsen von *C. vicina* angenommen werden. Eine Stimulierung mit Histamin führt vermutlich zu weitaus komplexeren Vorgängen, welche auf der Grundlage unserer bisherigen Experimente leider noch nicht erklärt werden können.

Zu 3): Ähnliche Überlegungen gelten leider auch bei Erklärungsversuchen der Unterschiede in den Kinetiken der TEP- und  $Ca^{2+}$ -Oszillationen nach 5-HT- und Histamin-Stimulierung.

TEP- und  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen waren nach Stimulation mit Histamin mit ihrem annähernd sinusförmigen Zeitverlauf deutlich regelmäßiger als nach Stimulierung mit 3 nM 5-HT. Auch diese Beobachtung lässt sich aufgrund unseres jetzigen Kenntnisstandes leider nicht oder nur sehr spekulativ interpretieren.

Diese zuletzt besprochenen Experimente konnten zwar das Histamin-induzierte „ $\text{Ca}^{2+}$ -beating“ nicht erklären, sie gaben jedoch Anlass für weitere Experimente, die eine wichtige Entdeckung ermöglichten (siehe Abschnitt 4.2).

## 4.2 Wirkung von cAMP auf den $\text{IP}_3/\text{Ca}^{2+}$ -Signalweg

In früheren Arbeiten an der Speicheldrüse von *C. vicina* konnte gezeigt werden, dass cAMP die Akkumulation von  $\text{Ca}^{2+}$  in den Speicheldrüsenzellen vermindert und den  $\text{Ca}^{2+}$ -Efflux erhöht (Prince *et al.*, 1973). Messungen des TEP der isolierten Drüsen zeigten außerdem, dass cAMP die 5-HT-induzierten TEP-Oszillationen verändert (Berridge, 1981a, b). Detaillierte Untersuchungen über die molekularen Ursachen der Wechselwirkungen zwischen dem cAMP-Signalweg und dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalweg gab es jedoch bisher nicht.

### 4.2.1 Ein Anstieg der $[\text{cAMP}]_i$ potenziert die 5-HT-induzierte Negativierung des TEP

Eine einfache Methode, um die Wechselwirkungen zwischen dem cAMP-Signalweg und dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalweg zu untersuchen, bieten die Messungen des TEP. Durch Verwendung eines  $\text{K}^+$ -freien,  $\text{Ba}^{2+}$ -haltigen Ringers war es möglich, selektiv die durch 5-HT-induzierten Änderungen des TEP zu untersuchen, die durch Änderungen der  $\text{Cl}^-$ -Leitfähigkeit verursacht werden.  $\text{Ba}^{2+}$  ist ein unspezifischer Hemmstoff von  $\text{K}^+$ -Kanälen (Schwartz *et al.*, 1968; Nagel, 1979; Driesche und Zeiske, 1985; Hanrahan *et al.*, 1986).

Messungen des TEP der Speicheldrüsen von *C. vicina* zeigten, dass  $\text{Ba}^{2+}$  bereits in unstimulierten Drüsen eine Negativierung des TEP verursacht (Abb. 3.12). Da  $\text{Ba}^{2+}$  die  $\text{K}^+$ -Leitfähigkeit



im basolateralen Membrananteil blockiert, ist auch der transepitheliale  $K^+$ -Transport unterdrückt, der bereits in der unstimulierten Drüse ein leicht positives TEP verursacht (Prince und Berridge, 1972). Ganz ähnliche Beobachtungen sind auch in den Malpighischen Gefäßen von *D. melanogaster* gemacht worden (O'Donnell und Maddrell, 1995; Scott *et al.*, 2004). Die Malpighischen Gefäße von *D. melanogaster* haben ein positives TEP (O'Donnell und Maddrell, 1995). Bei Applikation von  $Ba^{2+}$  kommt es aufgrund der Blockierung der basolateralen  $K^+$ -Kanäle zu einer Negativierung des TEP (Scott *et al.*, 2004). Durch die Verwendung des  $Ba^{2+}$ -haltigen Ringers konnte untersucht werden, ob eine  $[cAMP]_i$ -Erhöhung den durch 5-HT induzierten  $Ca^{2+}$ -abhängigen  $Cl^-$ -Transport beeinflusst.

In den Arbeiten von Berridge und Prince (1972a, b) verursachte eine Blockierung der PDE durch Theophyllin in der nicht-stimulierten Drüse eine Positivierung des TEP. Da eine Blockierung der PDE die  $[cAMP]_i$  erhöht, wurde in diesem Experiment vermutlich der cAMP-abhängige  $K^+$ -Transport über das Epithel verstärkt. Deshalb wurde in dieser Arbeit die Wirkung des PDE-Hemstoffes IBMX auf die 5-HT-induzierte Negativierung im  $Ba^{2+}$ -haltigen Ringer untersucht. Diese Experimente zeigten, dass der PDE-Hemmstoff IBMX die 5-HT-induzierte Negativierung des TEP verstärkte (Abb. 3.12). Da eine Negativierung des TEP nur durch einen erhöhten  $Ca^{2+}$ -abhängigen transepithelialen  $Cl^-$ -Transport verursacht wird, war zu vermuten, dass dieser  $Ca^{2+}$ -induzierte  $Cl^-$ -Transport durch cAMP verstärkt worden ist.

Interessanterweise verstärkte IBMX die 5-HT-induzierte Negativierung des TEP nur bei schwelennahen 5-HT-Konzentrationen. Bei sättigenden 5-HT-Konzentrationen hatte eine zusätzliche Applikation von IBMX keinen Einfluss auf die 5-HT-induzierten Änderungen des TEP. Sättigende 5-HT-Konzentrationen ( $\geq 30$  nM) führen zu einer maximalen Aktivierung des transepithelialen  $Cl^-$ -Transportes (Berridge und Prince, 1971). Ein weiterer cAMP-vermittelter Anstieg des transepithelialen  $Cl^-$ -Transportes kann vermutlich deshalb nicht stattfinden.

#### 4.2.2 cAMP führt in der stimulierten Drüse zu einem Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$

Die oben dargestellten Ergebnisse zeigen, dass cAMP die 5-HT-induzierte Negativierung des TEP verstärkte. Ursache dieser verstärkten Negativierung könnte eine cAMP-vermittelte Erhöhung des 5-HT-induzierten  $Ca^{2+}$ -Anstieges sein. Diese Hypothese konnte durch  $Ca^{2+}$ -Messungen an Fura-2-beladenen Zellen bestätigt werden.

Durch die Applikation von IBMX oder des AC-Aktivators Forskolin oder cAMP wurde die  $[cAMP]_i$  in den Drüsenzellen experimentell erhöht. In unstimulierten Drüsen hatte eine experimentell erhöhte  $[cAMP]_i$  keinen Effekt auf  $[Ca^{2+}]_i$  (Abb. 3.13). Eine andere Reaktion zeigten die Zellen hingegen bei einer Stimulierung mit niedrigen 5-HT-Konzentrationen ( $\leq 3$  nM), welche intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Oszillationen verursachen. Wird die  $[cAMP]_i$  bei diesen schwach stimulierten Drüsen durch Applikation von cAMP, Forskolin oder IBMX erhöht, verstärken diese Substanzen den 5-HT-induzierten  $Ca^{2+}$ -Anstieg (Abb. 3.14). Eine ähnliche cAMP-vermittelte Verstärkung des  $Ca^{2+}$ -Signals konnte auch bei Vertebraten z.B. in isolierten  $\beta$ -Zellen und Acinuszellen der Bauchspeicheldrüse, in Hepatozyten, in Nierenzellen, Speicheldrüsenzellen und bei Epithelzellen des Oesophagus beobachtet werden (Pittner und Fain, 1989; Grapengiesser *et al.*, 1991; Sanchez-Bueno *et al.*, 1993; Berridge, 1993; Zhang *et al.*, 1997; Braiman *et al.*, 1998; Zhang und Martinez, 1999; Brown *et al.*, 2004).

Der Anstieg der  $[cAMP]_i$  führte in den schwach stimulierten Drüsenzellen von *C. vicina* zu einem tonischen Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$ . Eine cAMP-vermittelte Erhöhung der  $Ca^{2+}$ -Oszillationsfrequenz, wie von Gerbino *et al.* (2005) in embryonalen Nierenzellen des Menschen und von Landa *et al.* (2005) in einer  $\beta$ -Zelllinie der Bauchspeicheldrüse der Maus (MIN6, Maus Insulinome Zelllinie 6) beschrieben wurde, konnte in diesen Experimenten jedoch nicht beobachtet werden.

In den oben beschriebenen Messungen des TEP hatte eine Erhöhung der  $[cAMP]_i$  auf dem Hintergrund einer sättigenden 5-HT-Stimulierung keinen Effekt auf den transepithelialen  $Cl^-$ -Transport. Nach den hier durchgeführten Messungen zeigte sich, dass bei sättigender 5-HT-Stimulierung keine Verstärkung des  $Ca^{2+}$ -Signals durch cAMP möglich ist (Abb. 3.15). Sättigende 5-HT-Konzentrationen verursachen in den Drüsenzellen einen massiven  $Ca^{2+}$ -Anstieg von einer basalen  $[Ca^{2+}]_i$  von  $74 \text{ nM} \pm 5 \text{ nM}$  auf bis zu  $1,1 \mu\text{M}$  (Zimmermann und Walz, 1997). Dieser massive  $Ca^{2+}$ -Anstieg führt zu einer maximalen Aktivierung des transepithelialen  $Cl^-$ -Transportes (Berridge und Prince, 1971). Eine Erhöhung der  $[cAMP]_i$  hat somit keinen Einfluss auf dieses gesättigte System. Ein ganz wesentliches Ergebnis dieser Arbeit ist deshalb, dass eine Modulation des 5-HT-induzierten  $Ca^{2+}$ -Signals nur bei schwelennahen 5-HT-Konzentrationen stattfindet.

Die Verstärkung des 5-HT-induzierten  $Ca^{2+}$ -Signals kann unterschiedliche Ursachen haben.

cAMP kann die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase des ER (SERCA) oder die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem ER beeinflussen (Ferris *et al.*, 1991; Joseph und Ryan, 1993; Nakade *et al.*, 1994; Magnier *et al.*, 1994; den Dekker *et al.*, 2002). Auch die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase und  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle in der Plasmamembran können durch cAMP beeinflusst werden (Neyses *et al.*, 1985; Dean *et al.*, 1997; Bruce *et al.*, 2002a).

Die Untersuchungen der cAMP-vermittelten Verstärkung des 5-HT-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals unter  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Bedingungen zeigte in dieser Arbeit, dass der cAMP-potenzierte Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  über eine Verstärkung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem ER hervorgerufen wurde (Abb. 3.16). Unter  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Bedingungen zeigte eine Stimulierung mit schwelennahen 5-HT-Konzentrationen einen leichten Anstieg der intrazellulären  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , welcher auf eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem ER zurückzuführen ist. Erhöhung der  $[\text{cAMP}]_i$  durch Forskolin führte zu einer Verstärkung dieses Anstiegs der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Deshalb muss cAMP die 5-HT-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem ER potenziert haben. Ob cAMP zudem die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen und  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle der Plasmamembran beeinflusst, konnte durch diese Experimente nicht geklärt werden.

### 4.2.3 cAMP sensitiviert die $\text{IP}_3$ -induzierte $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem ER

Alle oben diskutierten Beobachtungen führten zu der Schlussfolgerung, dass cAMP die 5-HT-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Flüsse über die ER-Membran verstärkt. Eine Verstärkung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem ER kann die Folge einer Blockierung der SERCA oder einer verstärkten  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung über den  $\text{IP}_3$ -Rezeptor/ $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal sein. Diese Möglichkeiten wurden durch Messungen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Flüsse über der ER-Membran direkt untersucht. Hierzu wurden Zellen mit Mag-Fura-2 beladen. Mag-Fura-2 akkumuliert auch in intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speichern wie z.B. im Lumen des ER. Aufgrund einer geringen  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität ( $\text{EC}_{50}$  bei  $25 \mu\text{M}$ ) kann dieser  $\text{Ca}^{2+}$ -empfindliche Fluoreszenzfarbstoff für  $\text{Ca}^{2+}$ -Messungen in intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speichern verwendet werden (Hofer und Machen, 1993, 1994; Chatton *et al.*, 1995; Zimmermann, 2000a). Nach der Beladung mit Mag-Fura-2 wurden die Zellen mit  $\beta$ -Escin permeabilisiert, um das zyttoplasmatische Mag-Fura-2 auszuwaschen. Die verbleibende Mag-Fura-2-Fluoreszenz stammt dann ausschließlich von Farbstoffmolekülen, die sich in intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speichern befinden (Hofer und Machen, 1994; Zimmermann, 2000a). Im Gegensatz zu den Belegzellen des Magens des Kaninchens (Hofer und Machen, 1994) detektiert Mag-Fura-2 in den Speichel-

drüsenzellen von *C. vicina* ausschließlich  $\text{Ca}^{2+}$ -Änderungen im Lumen des ER (Zimmermann, 2000a).

In diesen Messungen zeigte sich, dass Applikation von cAMP die  $[\text{Ca}^{2+}]_{ER}$  nicht beeinflusste (Abb. 3.17A). Die Ursache der cAMP-vermittelten Verstärkung der 5-HT-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung lag demnach nicht in einer cAMP-abhängigen Blockierung der SERCA.

Der 5-HT-induzierte Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in den Drüsenzellen von *C. vicina* wird über eine  $\text{IP}_3$ -vermittelte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem ER verursacht (Zimmermann, 2000a). In dieser Arbeit durchgeführte Messungen zeigten, dass eine Applikation von cAMP in Anwesenheit von  $5 \mu\text{M}$   $\text{IP}_3$  die  $\text{IP}_3$ -induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem ER verstärkte (Abb. 3.18). Kontrollexperimente zeigten, dass diese Beobachtung nicht durch einen Medienwechsel verursacht wurde (Abb. 3.20 und Abb. A.2 im Anhang). Die Zugabe des cAMP-Analogons 8-Br-Rp-cAMPS, eines Antagonisten von cAMP-Zielproteinen zeigte ebenfalls keine signifikante Wirkung auf die  $\text{IP}_3$ -induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung.

Die cAMP-Wirkung war dosisabhängig. Die Ermittlung der Dosis-Wirkungskurve durch die Berechnung der prozentualen  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem ER ergab einen  $\text{EC}_{50,cAMP}$ -Wert von  $2,6 \times 10^{-6}$  M. Um den Einfluss des im Ruhezustand auftretenden  $\text{Ca}^{2+}$ -leaks auf die Ermittlung der Dosis-Wirkungskurve zu bestimmen, wurde eine zweite Dosis-Wirkungskurve durch die Berechnung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungsrates erstellt (siehe Abb. A.1 im Anhang). Der so ermittelte  $\text{EC}_{50,cAMP}$ -Wert lag bei  $2,7 \times 10^{-6}$  M. Der Einfluss des  $\text{Ca}^{2+}$ -leaks aus dem ER kann also bei der Ermittlung der Dosis-Wirkungskurve vernachlässigt werden.

Eine wichtige Frage war, ob cAMP die Affinität des  $\text{IP}_3$ -Rezeptor/ $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals für  $\text{IP}_3$  erhöhte. Um diese Möglichkeit zu testen, wurde in Gegenwart von  $100 \mu\text{M}$  cAMP die Dosisabhängigkeit der  $\text{IP}_3$ -induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung gemessen und mit der normalen Dosis-Wirkungskurve für  $\text{IP}_3$  verglichen (Abb. 3.21). Der in diesen Messungen ermittelte  $\text{EC}_{50,IP_3}$ -Wert von  $2,5 \times 10^{-6}$  M liegt ein wenig höher als der von Zimmermann (2000a) publizierte  $\text{EC}_{50,IP_3}$ -Wert von  $1,7 \times 10^{-6}$  M. Genauere Betrachtung der Abbildung bei Zimmermann (2000a) zeigte, dass die Sättigung nicht erreicht wurde, da nur bis zu einer maximalen  $\text{IP}_3$ -Konzentration von  $10 \mu\text{M}$  getestet wurde. In der hier vorliegenden Arbeit wurde hingegen bis zu einer maximalen  $\text{IP}_3$ -Konzentration von  $30 \mu\text{M}$  getestet.

In Gegenwart von  $100 \mu\text{M}$  cAMP wurde der  $\text{EC}_{50}$ -Wert für die  $\text{IP}_3$ -induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung

auf  $7,1 \times 10^{-7}$  M reduziert (Abb. 3.21B). Die Affinität des  $\text{IP}_3$ -Rezeptor/ $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals für  $\text{IP}_3$  wurde also durch cAMP erhöht.

#### 4.2.3.1 cAMP sensitiviert die $\text{IP}_3$ -induzierte $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem ER über die Aktivierung einer PKA

cAMP kann seine physiologische Wirkung über die Aktivierung einer Proteinkinase A (PKA), welche Serin- und Threoninreste an Zielproteinen phosphoryliert (Taylor *et al.*, 2004; Seino und Shibasaki, 2005), oder über ein *exchange protein activated by cAMP* (Epac) entfalten (de Rooij *et al.*, 1998; Bos, 2003). Epac gehört zu der Familie der GEF-Proteine (*guanine-nucleotide-exchange factors*), welche kleine diffusionsfähige Rap-Proteine aktiviert. Die von Epac aktivierten Rap-Proteine gehören zu der Familie der Ras-Proteine, einer Form von kleinen G-Proteinen. Epac katalysiert die Bildung der aktiven GTP-bindenden Form des Rap-Proteins, welches verschiedene zelluläre Wirkungen besitzen kann (Kawasaki *et al.*, 1998; de Rooij *et al.*, 2000; Ozaki *et al.*, 2000; Eliasson *et al.*, 2003; Springett *et al.*, 2004; Tasken und Aandahl, 2004; Zhong und Zucker, 2005; Seino und Shibasaki, 2005).

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob cAMP seine Wirkung auf die  $\text{IP}_3$ -induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem ER durch die Aktivierung einer PKA oder über den Epac-Weg entfaltet. Hierzu wurden sieben verschiedene cAMP-Analoga verwendet, welche mehr oder weniger selektiv entweder den PKA oder den Epac-Weg aktivieren. Substanzen wie 6-BNZ-cAMP, 6-MBC-cAMP und 6-Phe-cAMP aktivieren die PKA, jedoch nicht Epac. An der 2'-OH-Gruppe modifizierte cAMP-Analoga wie 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP, 8-pHPT-2'-O-Me-cAMP und 8-pMeOPT-2'-O-Me-cAMP aktivieren Epac, jedoch nicht oder nur bei sehr hohen Konzentrationen die PKA (Enserink *et al.*, 2002; Rehmann *et al.*, 2003). 8-CPT-cAMP ist eine Substanz, die mit hoher Affinität sowohl die PKA als auch Epac aktiviert (Christensen *et al.*, 2003). Alle Substanzen wurden in einer Konzentration von jeweils  $10 \mu\text{M}$  und  $100 \mu\text{M}$  getestet.

cAMP-Analoga, welche den Epac-Weg aktivieren, in einer Konzentration von  $10 \mu\text{M}$ , beeinflussten die  $\text{IP}_3$ -induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung nicht (Abb. 3.23). In einer Konzentration von  $100 \mu\text{M}$  verursachte 8-pHPT-2'-O-Me-cAMP ( $100 \mu\text{M}$ ) eine Verstärkung der  $\text{IP}_3$ -induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung. Bei hohen Konzentrationen können die Epac-Aktivatoren jedoch auch eine PKA aktivieren (Enserink *et al.*, 2002; Rehmann *et al.*, 2003). Eine Aktivierung der

PKA durch 100  $\mu\text{M}$  8-pHPT-2'-O-Me-cAMP kann deshalb nicht ausgeschlossen werden. Kontrollexperimente belegten, dass dieses Ergebnis nicht darauf zurückzuführen ist, dass die Medien kein GTP als Substrat für G-Proteine enthielten.

Im Gegensatz dazu konnte festgestellt werden, dass alle getesteten PKA-Aktivatoren schon bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  die  $\text{IP}_3$ -induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem ER signifikant verstärkten (Abb.3.24).

In den Experimenten wurde die Wirkung des cAMP-Antagonisten 8-Br-Rp-cAMPS auf die 8-CPT-cAMP-vermittelte Verstärkung der  $\text{IP}_3$ -induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung getestet (Abb. 3.25). 8-Br-Rp-cAMPS ist ein kompetitiver Hemmstoff, welcher mit cAMP um die cAMP-Bindungsstelle an der regulatorischen Untereinheit der PKA konkurriert (Botelho *et al.*, 1988; Haastert *et al.*, 1984). Ebenso kann aber auch 8-Br-Rp-cAMPS die cAMP-induzierte Aktivierung von Epac hemmen (Rehmann *et al.*, 2003). Durch die Zugabe von 8-Br-Rp-cAMPS konnte die 8-CPT-cAMP-vermittelte Verstärkung gehemmt werden. Dieses deutet noch nicht auf eine PKA-vermittelte Verstärkung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung hin. Den Nachweis, dass es sich um einen PKA-vermittelten Prozess handelt, lieferten Messungen mit H-89. H-89 blockiert die ATP-Bindungsstelle der PKA und unterbindet somit deren physiologische Wirkung (Hidaka und Kobayashi, 1992). Die Applikation von H-89 hemmte die 8-CPT-cAMP-induzierte Verstärkung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem ER vollständig. Dieses Ergebnis zeigt, dass die durch 8-CPT-cAMP induzierte Verstärkung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung über die Wirkung der PKA und nicht über den Epac-Weg vermittelt wurde.

Diese Messungen zeigen eindeutig, dass in der Speicheldrüse von *C. vicina* der cAMP-Signalweg den  $\text{IP}_3/\text{Ca}^{2+}$ -Signalweg beeinflusste, und dass hierfür eine Aktivierung der PKA verantwortlich war. Diese Messungen zeigen auch, dass die PKA direkt oder indirekt die  $\text{IP}_3$ -induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem ER verstärkte, indem sie die Affinität des  $\text{IP}_3$ -Rezeptor/ $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals für  $\text{IP}_3$  erhöhte. Der Epac-Weg hatte in den Speicheldrüsen von *C. vicina* bei der cAMP-vermittelten Verstärkung der  $\text{IP}_3$ -induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung keinerlei Bedeutung.

Ähnliche Ergebnisse konnten in den Acinuszellen der Ohrspeicheldrüsen (Bruce *et al.*, 2002b; Brown *et al.*, 2004) sowie in den  $\beta$ -Zellen der Bauchspeicheldrüsen (Dyachok und Gylfe,



2004) erzielt werden. In diesen Systemen führt die Phosphorylierung des IP<sub>3</sub>-Rezeptor/Ca<sup>2+</sup>-Kanals durch die PKA zu einer verstärkten Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus dem ER. In Neuronen des Cerebellums der Maus (Nakade *et al.*, 1994) und im Neostriatum der Ratte (Tang *et al.*, 2003) konnte der gleiche Mechanismus nachgewiesen werden. Durch die Phosphorylierung des isolierten IP<sub>3</sub>-Rezeptor/Ca<sup>2+</sup>-Kanals aus dem Cerebellum der Ratte kommt es hingegen zu einer verminderten Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung (Supattapone *et al.*, 1988). Eine PKA-abhängige Verminderung der Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung konnte auch in Acinuszellen der Unterkieferspeicheldrüsen, in Megakaryozyten und in Acinuszellen der Bauchspeicheldrüse beobachtet werden (Martinez und Zhang, 1998; Tertyshnikova und Fein, 1998; Giovannucci *et al.*, 2000). In β-Zellen der Bauchspeicheldrüsen konnte eine synergistische Interaktion von cAMP und Ca<sup>2+</sup> auf den IP<sub>3</sub>-Rezeptor/Ca<sup>2+</sup>-Kanal gezeigt werden. In diesen Zellen wirkt der IP<sub>3</sub>-Rezeptor/Ca<sup>2+</sup>-Kanal als „Koinzidenzdetektor“ für Ca<sup>2+</sup> und cAMP. Anders als in *C. vicina*-Speicheldrüsen wird hier aber die cAMP-vermittelte Sensitivierung des IP<sub>3</sub>-Rezeptor/Ca<sup>2+</sup>-Kanals sowohl über eine PKA als auch über den Epac-Signalweg vermittelt (Kang *et al.*, 2005).

Die molekulare Ursache der PKA-vermittelten Sensitivierung des IP<sub>3</sub>-Rezeptor/Ca<sup>2+</sup>-Kanals in der Speicheldrüse von *C. vicina* ist noch unklar. Der IP<sub>3</sub>-Rezeptor/Ca<sup>2+</sup>-Kanal der Vertebraten kann direkt durch die PKA phosphoryliert werden (Straub *et al.*, 2004; Wojcikiewicz und Luo, 1998; Ferris *et al.*, 1991; Haug *et al.*, 1999). Kann die PKA-vermittelte Sensitivierung des IP<sub>3</sub>-Rezeptor/Ca<sup>2+</sup>-Kanals in der Speicheldrüse von *C. vicina* durch eine Phosphorylierung des Kanals verursacht worden sein?

Im Gegensatz zu den drei IP<sub>3</sub>-Rezeptortypen bei Säugetieren (Furuichi *et al.*, 1989, 1994; Mikoshiba, 1997) existiert bei *D. melanogaster* lediglich ein IP<sub>3</sub>-Rezeptortyp (Yoshikawa *et al.*, 1992). In den Larven von *D. melanogaster* konnten zwei Isoformen dieses Rezeptors nachgewiesen werden, welche auf *Splicevarianten* des *itpr*-Gens zurückzuführen sind (Sinha und Hasan, 1999). Allerdings besitzen die zwei bisher bekannten IP<sub>3</sub>-Rezeptor-Isoformen keine Konsensusstelle für die Phosphorylierung durch die PKA (Yoshikawa *et al.*, 1992; Venkatesh *et al.*, 2001). Aufgrund ihrer phylogenetischen Nähe (Diptera) könnte vermuten werden, dass auch der IP<sub>3</sub>-Rezeptor von *C. vicina* keine PKA-Phosphorylierungsstelle besitzt. Es ist jedoch unbekannt, ob der IP<sub>3</sub>-Rezeptor/Ca<sup>2+</sup>-Kanal von *C. vicina* PKA-Phosphorylierungsstellen besitzt, da keine Sequenzinformation vorhanden ist.

Welche alternative Möglichkeit gibt es für die PKA ihre Wirkung auf die IP<sub>3</sub>-induzierte Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung zu entfalten?

Die PKA kann über eine direkte Phosphorylierung oder durch Modifikation von so genannten *accessory proteins* auf Ca<sup>2+</sup>-Kanäle wie z.B. den IP<sub>3</sub>-Rezeptor und den Ryanodin-Rezeptor (RyR) des ER oder des Sarcoplasmatischen Retikulums (SR) wirken (MacKrell, 1999). So wird in der Muskelzelle über eine PKA-vermittelte Phosphorylierung des Dihydropyridin-Rezeptors dessen Assoziation mit dem RyR gehemmt (Lu *et al.*, 1995). Auch der hemmende Effekt des Ca<sup>2+</sup>-bindenden Proteins Sorcin auf den RyR kann über eine PKA-vermittelte Phosphorylierung reduziert werden (Lokuta *et al.*, 1997). Die PKA kann auch die Aktivitäten der PKC und der CaM-Kinase beeinflussen (Daaka *et al.*, 1997; Bruce *et al.*, 2002a; Wayman *et al.*, 1997; Valverde *et al.*, 2005). Da der IP<sub>3</sub>-Rezeptor von *D. melanogaster* Konsensusstellen für die Phosphorylierung durch die PKC und für die CaM-Kinase II besitzt<sup>1</sup>, könnte die PKA indirekt über diese Kinasen auf den IP<sub>3</sub>-Rezeptor einwirken. Möglicherweise sind in den Speicheldrüsenzellen von *C. vicina* derartige Wirkungen der PKA realisiert.

### 4.3 Lokalisation der PKA in den Speicheldrüsen

Die PKA ist in ihrer inaktiven Form ein Heterotetramer aus zwei identischen katalytischen Untereinheiten und zwei identischen regulatorischen Untereinheiten. Die PKA existiert in zwei Isoformen, PKAI und PKAII, bezeichnet nach dem Typ der regulatorischen Untereinheiten (RI und RII) im Holoenzym. In *D. melanogaster* existieren die beiden Untereinheiten PKA-RI und PKA-II sowie drei Isoformen der katalytischen Untereinheit der PKA (PKA-C1, PKA-C2 und PKA-C3) (Foster *et al.*, 1988; Kalderon und Rubin, 1988; Park *et al.*, 2000). Die katalytische Untereinheit PKA-C1 stellt die Hauptisoform der katalytischen Untereinheit der PKA in *D. melanogaster* dar (Lane und Kalderon, 1993). Bei cAMP-Bindung dissoziiert das Tetramer in zwei einzelne regulatorische Untereinheiten sowie ein Homodimer der beiden katalytischen Untereinheiten, welche somit aktiv werden (Coffino *et al.*, 1976; Toda *et al.*, 1987).

---

<sup>1</sup>Analyse der putativen Phosphorylierungssequenzen des IP<sub>3</sub>-Rezeptors von *D. melanogaster* (Yoshikawa *et al.*, 1992) durch 'Prosite' (<http://www.expasy.org/prosite/> Falquet *et al.* (2002)).



Auf Western-Blots konnte die Kreuzreaktivität der verwendeten Antiseren gegen die katalytische Untereinheit PKA-C1 und gegen die regulatorische Untereinheit PKA-RII von *D. melanogaster* mit den entsprechenden PKA-Untereinheiten in den Speicheldrüsen von *C. vicina* gezeigt werden (Abb. 3.28). Interessanterweise markierte das Antiserum gegen die PKA-C1 im *D. melanogaster*-Kopf-Homogenat sowie in dem Speicheldrüsen- und Kopf-Homogenat von *C. vicina* drei Banden bei 41 kDa, 47 kDa und 67 kDa (Abb. 3.28A). Die Bande mit der niedrigen molekularen Masse repräsentiert die katalytische Untereinheit PKA-C1 (von ca. 40 kDa) (Foster *et al.*, 1984; Kalderon und Rubin, 1988; Foster *et al.*, 1988). Das verwendete Antiserum ist gegen das gesamte PKA-C1-Protein gemacht. Deshalb erkennt das Antiserum wahrscheinlich homologe katalytische Untereinheiten. Aufgrund der molekularen Masse und der Sequenzähnlichkeit von 63% ist zu vermuten, dass die Bande bei 47 kDa die katalytische Untereinheit PKA-C2 repräsentiert (ca. 46 kDa) (Kalderon und Rubin, 1988). Die Bande bei 67 kDa repräsentiert aufgrund der molekularen Masse und der Sequenzähnlichkeit von 49% mit der PKA-C1 vermutlich die katalytische Untereinheit PKA-C3 (ca. 67 kDa) (Kalderon und Rubin, 1988; Melendez *et al.*, 1995).

Das Antiserum gegen RII markierte in Kopf-Homogenaten aus *D. melanogaster* eine Bande bei 38 kDa und eine Doppelbande bei 47 kDa und 53 kDa (Abb. 3.28B). Die 47 kDa- und 53 kDa-Banden entsprechen der dephosphorylierten und phosphorylierten Form der RII (Foster *et al.*, 1984; Müller und Spatz, 1989; Altfelder und Müller, 1991). Die niedrigere Bande bei 38 kDa repräsentiert vermutlich die regulatorische Untereinheit RII einer dimeren Typ-II-PKA bestehend aus einer katalytischen und einer regulatorischen Untereinheit II ( $R_p$ II).  $R_p$ II entsteht über eine proteolytische Spaltung der klassischen RII durch eine  $Ca^{2+}$ -abhängige Protease und wird vorwiegend in neuronalem Gewebe exprimiert (Müller und Spatz, 1989; Altfelder und Müller, 1991; Müller, 1997b). Im Kopf-Homogenat sowie im Speicheldrüsen-Homogenat aus *C. vicina* wurde jeweils eine prominente Bande mit einer molekularen Masse von 47 kDa markiert. Dies deutet auf eine dephosphorylierte Form der RII in *C. vicina* hin. Über die Existenz einer phosphorylierten Form der PKA-RII kann in diesem Präparat keine Aussage getroffen werden, da sie möglicherweise in zu geringer Konzentration vorliegt. Zusätzlich wurde eine sehr schwache Bande bei 38 kDa im Kopf-Homogenat von *C. vicina* markiert, was auf eine dimere Form der PKA-RII ähnlich der *D. melanogaster*  $R_p$ II in *C. vicina* hindeutet.

Weitere Hinweise, dass es sich bei dem Protein mit einem molekularen Gewicht von 47 kDa in den Speicheldrüsen von *C. vicina* um die PKA-RII handelt, lieferten Bindungsstudien an cAMP-gekoppelter Agarose. In diesen Studien konnte nachgewiesen werden, dass das von diesem Antiserum markierte Protein reversibel an cAMP bindet (O. Baumann, persönliche Mitteilung).

Das Antiserum gegen RI zeigte weder in Köpfen von *D. melanogaster* noch in Kopf- oder Speicheldrüsen-Homogenat von *C. vicina* eine eindeutige Markierung. Über die Existenz dieser Untereinheit in den Speicheldrüsen von *C. vicina* kann anhand dieser Analysen keine Aussage getroffen werden. Nach diesen Analysen zeigte sich, dass 1) das Antiserum gegen *D. melanogaster* PKA-C1 eine Kreuzreaktion mit der PKA-C1 aus *C. vicina* aufweist, 2) dieser Antikörper weiterhin mit PKA-C1 und PKA-C2 aus *D. melanogaster* und *C. vicina* kreuzreagiert und 3) das Antiserum gegen *D. melanogaster* PKA-RII eine Kreuzreaktion mit PKA-RII aus *C. vicina* zeigt. Deshalb konnten diese Antiseren in Gefrierschnitten der Speicheldrüse von *C. vicina* verwendet werden, um Informationen über die Lokalisation der katalytischen und der regulatorischen Untereinheit (RII) der PKA in den Drüsenzellen zu erhalten.

Die immunzytochemischen Untersuchungen an Gefrierschnitten der Speicheldrüse von *C. vicina* zeigten eine ähnliche Verteilung der beiden Antiseren gegen die katalytische Untereinheit und gegen die RII der PKA (Abb. 3.29). Dies spricht für eine Kolokalisation der beiden Untereinheiten. Beide Antiseren markieren die basolateralen und apikalen Plasmamembranen. Ebenso zeigten sich 1-3  $\mu\text{m}$  große, punkt- bis ellipsoidförmige Markierungen beider Antikörper im gesamten Zytoplasma. Aufgrund ihrer Form und Größe können diese Strukturen Mitochondrien darstellen. Diese Interpretation konnte durch immunelektronenmikroskopische Verfahren bestätigt werden (O. Baumann, persönliche Mitteilung). Weiterhin zeigte sich eine diffuse Verteilung der beiden Antikörper im gesamten Zytoplasma. Die oben diskutierten Beobachtungen legten eine PKA-vermittelte Sensitivierung der  $\text{IP}_3$ -induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem ER für  $\text{IP}_3$  dar. Die immunzytochemischen Untersuchungen lassen vermuten, dass die PKA räumlich eng mit ihrem zuvor gezeigten Zielprotein, dem  $\text{IP}_3$ -Rezeptor/ $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal (PKA im Zytoplasma) assoziiert ist. Eine Überprüfung dieser Interpretation durch immunelektronenmikroskopische Verfahren ließ eine Lokalisation der PKA-RII unter anderem auch am

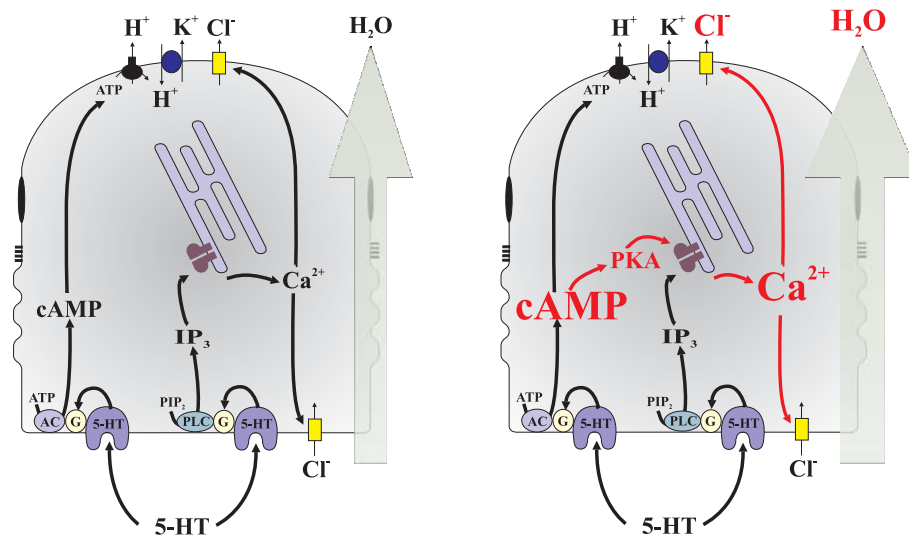
ER erkennen (O. Baumann, persönliche Mitteilung).

Die subzelluläre Orientierung der PKA wird durch sogenannte *A-kinase anchor proteins* (AKAPs) kontrolliert (Houslay und Milligan, 1997; Colledge und Scott, 1999; Edwards und Scott, 2000; Feliciello *et al.*, 2001; Tu *et al.*, 2004; Tasken und Aandahl, 2004). Jedes AKAP-Protein verfügt über wenigstens zwei funktionelle Bindungsstellen. Zusätzlich zu einer bei allen AKAP-Proteinen konservierten Bindungsstelle für die RII der PKA besitzt jedes AKAP-Protein eine spezifischen Lokalisations-Sequenz, welches den PKA-AKAP-Komplex an bestimmte Organellen bindet. Ebenso können durch die AKAPs andere Effektorproteine wie PKC, CaM-Kinase II und/oder Protein-Phosphatasen gebunden werden und so einen multifunktionalen Komplex bilden (deSouza N *et al.*, 2002). Durch die Bindung an AKAP-Proteine kann die PKA am Aktin-Zytoskelett, an der Plasmamembran, an den Mitochondrien, an Vesikeln, an der Kernhülle und am ER lokalisiert werden. In *D. melanogaster* konnten bisher zwei dieser AKAPs (DAKAP) isoliert und charakterisiert werden (Li *et al.*, 1999; Han *et al.*, 1997; Jackson und Berg, 2002).

Die Lokalisation der PKA u.a. am ER gibt die Möglichkeit, dass der IP<sub>3</sub>-Rezeptor/Ca<sup>2+</sup>-Kanal doch direkt durch die PKA phosphoryliert wird, oder dass der IP<sub>3</sub>-Rezeptor/Ca<sup>2+</sup>-Kanal indirekt über die PKA durch am IP<sub>3</sub>-Rezeptor/Ca<sup>2+</sup>-Kanal assoziierte Proteine reguliert wird. Dieses Ergebnis passt konzeptionell zur oben diskutierten PKA-abhängigen Verstärkung der IP<sub>3</sub>-induzierten Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus dem ER. Die vorliegende Arbeit liefert pharmakologische und immunzytochemische Hinweise, dass die cAMP-vermittelte Verstärkung der IP<sub>3</sub>-induzierten Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung über eine PKA-verursachte Sensitivierung des IP<sub>3</sub>-Rezeptor/Ca<sup>2+</sup>-Kanals für IP<sub>3</sub> realisiert wird.

Dieses Ergebnis ermöglicht jetzt auch eine Erklärung für ältere Beobachtungen (Berridge, 1970; Berridge und Prince, 1972b), dass eine pharmakologische Erhöhung der cAMP-Konzentration in den Speicheldrüsen von *C. vicina* die 5-HT-induzierte Speichelsekretion verstärkt, indem die 5-HT-Empfindlichkeit erhöht wird. Durch die PKA-vermittelte Sensitivierung des IP<sub>3</sub>-Rezeptor/Ca<sup>2+</sup>-Kanals für IP<sub>3</sub> kann eine Potenzierung der 5-HT-induzierten Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung erreicht werden. Dieser Anstieg der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> verursacht einen verstärkten transepithelialen Cl<sup>-</sup>-Transport (siehe Abb. 3.12), was zu einer stärkeren Flüssigkeitsekretion führt. Abbildung 4.1 fasst die oben diskutierten Zusammenhänge schematisch zusammen.

Die Bedeutung dieser Ergebnisse geht weit über die spezielle Insektenphysiologie hinaus. Sie zeigen erstmals, dass auch bei Invertebraten der Botenstoff cAMP, PKA-vermittelt, den  $\text{IP}_3$ -Rezeptor/ $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal des ER für  $\text{IP}_3$  sensitiviert und weisen dieses erstmals direkt durch intraluminale  $\text{Ca}^{2+}$ -Messungen nach.



**Abbildung 4.1:** Schematische Darstellung der bekannten (links) und postulierten (rechts) Signalwege in den sekretorischen Zellen der Speicheldrüse von *C. vicina*. Linke Darstellung: Eine Stimulierung mit 5-HT induziert einen Anstieg der  $[\text{cAMP}]_i$  und  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Der Anstieg der Konzentration dieser Botenstoffe führt zu einem transepithelialen Transport von  $\text{K}^+$  und  $\text{Cl}^-$  in das Lumen der Drüse.  $\text{H}_2\text{O}$  folgt passiv nach. Rechte Darstellung: In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein Anstieg der  $[\text{cAMP}]_i$  den  $\text{IP}_3$ -Rezeptor/ $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal für  $\text{IP}_3$  sensitiviert. Diese Sensitivierung führt zu einer verstärkten  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem ER, einem verstärkten transepithelialen  $\text{Cl}^-$ -Transport und damit zu einer stärkeren Flüssigkeitssekretion.

## 4.4 5-HT-induzierte Änderungen in den Proteinkinase-Aktivitäten

In dem folgenden Abschnitt werden Ergebnisse besprochen, die zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch nicht abgeschlossen sind. Diese Pilot-Versuche enthalten jedoch wichtige Ergebnisse, die Grundlage weiterführender Untersuchungen sein sollten.

#### 4.4.1 5-HT induziert eine Änderung der PKA-Aktivität

In den oben diskutierten Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass cAMP, über die Aktivierung einer PKA, den IP<sub>3</sub>-Rezeptor/Ca<sup>2+</sup>-Kanal des ER für IP<sub>3</sub> sensitiviert. Deshalb wurden PKA-Aktivitätstests durchgeführt, um eine mögliche 5-HT-induzierte Änderung der PKA-Aktivität zu untersuchen. In früheren Arbeiten von Prince *et al.* (1973) konnte in den Speicheldrüsen von *C. vicina* ein 5-HT-induzierter Anstieg der [cAMP]<sub>i</sub> gemessen werden. Deshalb wurde ein 5-HT-induzierter Anstieg der PKA-Aktivität erwartet. Erstaunlicherweise zeigte sich jedoch, dass die Aktivität der PKA bei Stimulierung mit 100 nM 5-HT nach 1 min, 5 min und 30 min reduziert war (Abb. 3.30A). Diese Änderungen waren zwar gering, erwiesen sich jedoch als statistisch signifikant. Dieses Ergebniss entspricht nicht den Erwartungen. Zudem zeigten in unserer Arbeitsgruppe durchgeführte Messungen, dass die durch 5-HT-induzierte Aktivierung der V-ATPase durch PKA-Hemmstoffe unterbunden wird (J. Rein, persönliche Mitteilung). Dies spricht für eine 5-HT-induzierte Änderung der PKA-Aktivität.

Eine Stimulation der Drüsen führt in den Zellen zu einer parallelen Aktivierung des cAMP-Signalweges und des Ca<sup>2+</sup>-Signalweges. Ca<sup>2+</sup> kann in vielfältiger Weise auf den cAMP-Haushalt einwirken, und deshalb auch die PKA-Aktivität beeinflussen (Cooper *et al.*, 1995; Mons *et al.*, 1998; Berridge *et al.*, 2000; Bruce *et al.*, 2003). Ca<sup>2+</sup> beeinflusst direkt oder indirekt (z.B. über die Wirkung einer PKC) die Aktivität der AC (Cooper *et al.*, 1995; Mons *et al.*, 1998). Prince *et al.* (1973) zeigten, dass eine Stimulierung mit 5-HT zu einem 4-fachen Anstieg der [cAMP]<sub>i</sub> führt. Dieser 5-HT-induzierte Anstieg wird nach 1-2 min auf das 2-fache der Grund-[cAMP]<sub>i</sub> reduziert, wenn sich Ca<sup>2+</sup> im Medium befindet. Deshalb wurden in dieser Arbeit auch Experimente durchgeführt, in denen die PKA-Aktivität unter Ca<sup>2+</sup>-freien Bedingungen gemessen wurde (Abb. 3.30B). In diesen Experimenten zeigte sich, dass unter Ca<sup>2+</sup>-freien Bedingungen keine Hemmung der PKA-Aktivität stattfand. Ca<sup>2+</sup> scheint deshalb einen hemmenden Einfluss auf die PKA-Aktivität zu besitzen. Der erwartete Anstieg der PKA-Aktivität nach 5-HT-Stimulierung blieb jedoch weiterhin aus. Die Ursache dieser Beobachtung könnte in dem Versuchsablauf des Aktivitätstests liegen. Nach der Homogenisation durch einen gefrorenen Metallstift in einer Glaskapillare wurde das Homogenat durch die Zugabe des Phosphorylierungs-Puffers für 60 s auf Raumtemperatur erwärmt. Dames *et al.* (2006) konnten zeigen, dass die Zellen der Speicheldrüse von *C. vicina* eine hohe PDE-Aktivität

besitzen. Es ist deshalb zu vermuten, dass der durch 5-HT-induzierte Anstieg der  $[cAMP]_i$  in der Inkubationszeit des Phosphorylierungspuffers sehr schnell durch die PDE reduziert wurde. Möglicherweise war deshalb kein Anstieg der PKA-Aktivität nach 60 s Inkubation messbar.

#### 4.4.2 5-HT induziert eine Änderung der CaM-Kinase II-Aktivität

Die  $Ca^{2+}$ -Calmodulin-abhängige Proteinkinase (CaM-Kinase-II) ist eine der Hauptkinasen, welche die zelluläre Antwort auf die Stimulation durch Hormone und Neurotransmitter koordiniert. Die CaM-Kinase II ist an der Regulation der Neurotransmission, der neuronalen Plastizität, an der Erregbarkeit der Zellen, der Genexpression und an Sekretionsprozessen beteiligt (Soderling, 1999). Koninck und Schulman (1998) konnten zeigen, dass die CaM-Kinase II hochsensitiv auf zeitliche Änderungen der  $[Ca^{2+}]_i$  reagiert. Die CaM-Kinase II repräsentiert demnach ein multifunktionales Enzym, welches die Frequenz der  $Ca^{2+}$ -Oszillationen entschlüsselt und in eine Kinase-Aktivität umwandelt. In Vertebraten existieren vier Klassen von CaM-Kinase II, welche jeweils von einem Gen kodiert werden und in zahlreichen *Splice*-Varianten auftreten (Schulman und Lou, 1989). In *D. melanogaster* existiert dagegen nur ein CaM-Kinase II-Gen dessen Transkript durch alternatives *splicing* vier Isoformen des Enzyms bildet (Griffith und Greenspan, 1993).

Aktiviert wird die CaM-Kinase II durch den  $Ca^{2+}$ /Calmodulinkomplex (Hook und Means, 2001; Colbran, 2004; Schulman *et al.*, 2004). Die Bindung dieses Komplexes führt zu einer Konformationsänderung, in dessen Verlauf die Bindung von ATP und dem Substrat ermöglicht wird. Reguliert wird die CaM-Kinase II über eine Phosphorylierung durch weitere Kinasen, wie die PKA (Valverde *et al.*, 2005; Wayman *et al.*, 1997). Über die Modulation dieses Proteins könnten also mögliche Wechselwirkungen zwischen dem cAMP-Signalweg und dem  $IP_3/Ca^{2+}$ -Signalweg realisiert werden.

In der Speicheldrüse von *C. vicina* führt eine Stimulierung mit 5-HT zu einem Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  (Berridge, 1980b, 1982a; Berridge und Heslop, 1981; Zimmermann und Walz, 1997). Dieser Anstieg könnte eine CaM-Kinase II in der Speicheldrüse aktivieren. Deshalb wurden CaM-Kinase II-Aktivitätstests in Speicheldrüsenhomogenaten durchgeführt (Abb. 3.31). Diese Untersuchungen zeigten, dass eine Stimulierung mit 100 nM 5-HT für 1 min und 5 min zu ei-



nem Anstieg der CaM-Kinase II führten. Erstaunlicherweise sank die Aktivität der CaM-Kinase II nach 30 min Stimulation mit 5-HT auf ihren Ruhewert zurück. Bei einer längeren Stimulation durch 5-HT scheint dieses System also zu desensitivieren. Eine Desensitivierung kann durch Phosphorylierung des Rezeptors, durch Internalisierung des Rezeptors und durch Regulation der PLC nachgeschalteten Prozesse verursacht werden (Wojcikiewicz *et al.*, 1993). Möglicherweise besitzt die CaM-Kinase II eine Funktion bei der 5-HT-induzierten Signalwirkung. Ob die CaM-Kinase II einen Einfluss auf die 5-HT-induzierten Signalkaskaden besitzt, bedarf weiterführender Untersuchungen.

#### 4.4.3 5-HT induziert eine Änderung der PKC-Aktivität

Die klassische PKC wird durch  $\text{Ca}^{2+}$  und Diacylglycerol (DAG) aktiviert. In den Speicheldrüsen von *C. vicina* wird durch 5-HT über einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor eine PLC aktiviert, welche  $\text{PIP}_2$  zu  $\text{IP}_3$  und DAG hydrolysiert (Fain und Berridge, 1979b; Berridge, 1980b; Berridge und Heslop, 1981; Berridge, 1982a; Litosch *et al.*, 1982; Berridge, 1993; Zimmermann und Walz, 1997). Es ist deshalb zu vermuten, dass eine PKC bei der Wirkung von 5-HT eine Funktion besitzt.

Durch die Aktivität der PKC können zahlreiche Mechanismen des Sekretionsprozesses beeinflusst werden. So wird durch die PKC die  $\text{Ca}^{2+}$ -Empfindlichkeit fusionsfähiger sekretorischer Vesikel in der Hypophyse (Zhu *et al.*, 2002) und in den  $\beta$ -Zellen der Bauchspeicheldrüse erhöht (Wan *et al.*, 2004). Ebenso steigt die Vesikelzahl an in den  $\beta$ -Zellen der Bauchspeicheldrüse (Wan *et al.*, 2004) sowie in den chromaffinen Zellen der Nebenniere (Gillis *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 2002) durch die Aktivität der PKC. Insbesondere konnte eine verstärkte Ecdysteroid-Sekretion durch PKC in der prothorakalen Drüse der Hummel (*Bombyx mori*) beobachtet werden (Dedos und Fugo, 2001). In den Speicheldrüsen von *C. vicina* ist eine Beteiligung der PKC an ähnlichen Prozessen ebenfalls zu erwarten.

Zur Untersuchung der Funktion der PKC bei der 5-HT-induzierten Speichelsekretion wurden PKC-Aktivitätstests in Speicheldrüsen-Homogenaten von *C. vicina* durchgeführt (Abb. 3.32). Nach einer Stimulation mit 100 nM 5-HT für 1 min und 5 min stieg die PKC-Aktivität an (Abb. 3.32). Wie in den oben diskutierten Ergebnissen zur CaM-Kinase II-Aktivität sank die Aktivität der PKC nach 30 min Stimulation mit 5-HT auf ihren Ruhewert zurück. Bei einer längeren

Stimulation durch 5-HT scheint die PKC-Signalkaskade ebenfalls zu desensitivieren.

#### 4.4.4 Lokalisation der PKC in den Speicheldrüsen

Die Protein-Kinase C -Familie der Säugetiere besteht aus bisher zehn bekannten Isoformen, welche in drei Klassen unterteilt werden können (Newton, 2001; Parker und Murray-Rust, 2004). Die klassische PKC (cPKC), welche durch  $\text{Ca}^{2+}$ , DAG und PS aktiviert wird. Die neue PKC (nPKC), welche durch DAG und PS aktiviert wird, und die atypische PKC (aPKC), welche weder  $\text{Ca}^{2+}$  noch DAG benötigt aber Phospholipid abhängig ist. *D. melanogaster* besitzt drei PKC-Enzyme, eine augenspezifische PKC (dPKC53E (Auge) (Rosenthal *et al.*, 1987)) und zwei weitere PKC-Formen, welche hauptsächlich im Gehirn exprimiert werden (dPKC53E (Gehirn) (Rosenthal *et al.*, 1987), dPKC89F (Gehirn) (Schaeffer *et al.*, 1989)). Sequenzanalysen zeigten, dass die dPKC53E (Gehirn) eine hohe Ähnlichkeit mit der humanen cPKC aufweist (Rosenthal *et al.*, 1987), während die dPKC98E eine hohe Sequenzähnlichkeit mit der humanen nPKC aufweist (Schaeffer *et al.*, 1989). Zur Analyse der Lokalisation einer PKC in den Speicheldrüsen von *C. vicina* stand ein polyklonaler Antikörper zur Verfügung, welcher gegen einen 20 Aminosäuren umfassenden Bereich der klassischen aPKC $\alpha$  des Menschen hergestellt wurde. Ein Sequenzvergleich der humanen cPKC $\alpha$  (Finkenzeller *et al.*, 1990) mit den drei bekannten PKC-Isoformen von *D. melanogaster* zeigte eine hohe Sequenzähnlichkeit zwischen der humanen cPKC $\alpha$  und den PKC-Isoformen von *D. melanogaster*. Insbesondere der 20 Aminosäuren umfassende Bereich des C-Terminus zeigte eine 50%ige Ähnlichkeit zwischen der humanen cPKC $\alpha$  und den PKC-Isoformen von *D. melanogaster*.

Durch Western-Blot-Analysen kann eine Kreuzreaktivität dieses verwendeten Antikörpers gegen die humane cPKC $\alpha$  mit einer PKC in Kopf-Homogenaten *D. melanogaster* und in Speicheldrüsen- und Kopf-Homogenaten von *C. vicina* angenommen werden (Abb. 3.34). Der Antikörper markierte in allen drei Homogenaten jeweils eine distinkte Bande mit einer molekularen Masse von ca. 89 kDa. Aufgrund ihres molekularen Gewichtes ist zu vermuten, dass es sich hierbei um eine Isoform der dPKC53E handelt (ca. 77-80 kDa). Deshalb konnten dieser Antikörper in Gefrierschnitten der Speicheldrüse von *C. vicina* verwendet werden, um Informationen über die Lokalisation einer PKC in den Drüsenzellen zu erhalten.

Die Untersuchungen zur Lokalisation der PKC in den Speicheldrüsen von *C. vicina* zeigten,



dass die PKC mit F-Aktin-haltigen Strukturen des Zytoskeletts in der Nähe der apikalen Membran und deren Einfaltungen kolokalisiert (Abb. 3.35). Diese Untersuchungen zeigen, dass die PKC in den Speicheldrüsen von *C. vicina* lokalisiert ist und durch 5-HT aktiviert werden kann. Ob die PKC eine Funktion bei der 5-HT-induzierten Speichelsekretion besitzt, bedarf weiterer Untersuchungen.

## 4.5 Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Stimulierung der Epithelzellen der Speicheldrüse von *C. vicina* mit Histamin zu einer Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  führt. Niedrige Histamin-Konzentrationen (1 mM, 5 mM) induzierten lokale  $Ca^{2+}$ -Oszillationen in einzelnen Zellen oder Zellgruppen, während höhere Histamin-Konzentrationen (10 mM) einen tonischen  $Ca^{2+}$ -Anstieg oder ein synchrones „ $Ca^{2+}$ beating“ in größeren Drüsenbereichen hervorriefen. Die wahrscheinlich sehr komplexen Ursachen dieses „ $Ca^{2+}$ beating“ konnte im Rahmen dieser Arbeit leider noch nicht aufgeklärt werden. Möglicherweise beeinflusst eine Histamin-induzierte Erhöhung der  $[cAMP]_i$  die *gap junction*-vermittelte Kopplung der Drüsenzellen. Elektrophysiologische Messungen der elektrischen Kopplung oder optische Messungen der Farbstoff-Kopplung könnten zeigen, ob Unterschiede in der Leitfähigkeit der *gap junctions* nach Stimulierung mit schwelennahen 5-HT-Konzentrationen und nach Histamin-Stimulierung zu beobachten sind.

cAMP sensitivierte über die Aktivierung einer PKA den  $IP_3$ -Rezeptor/ $Ca^{2+}$ -Kanals für  $IP_3$  und führte so zu einer Verstärkung der  $IP_3$ -induzierten  $Ca^{2+}$ -Freisetzung aus dem ER. Die molekularen Mechanismen dieser PKA-vermittelten Verstärkung in den Speicheldrüsenzellen von *C. vicina* sind jedoch unklar. Immunzytochemische Untersuchungen lieferten Hinweise, dass die PKA räumlich eng mit dem  $IP_3$ -Rezeptor/ $Ca^{2+}$ -Kanal assoziiert ist. Bindungsstudien mit cAMP-gekoppelter Agarose zeigten außerdem, dass das Antiserum gegen die RII aus *D. melanogaster* tatsächlich die RII der PKA in *C. vicina* erkennt (O. Baumann, persönliche Mitteilung). Mit Hilfe dieses Antiserums könnte durch Immunpräzipitation und anschließender MALDI-TOF-Massenspektrometrie der isolierten Proteinbanden untersucht werden, ob die

PKA-RII auch an den  $IP_3$ -Rezeptor/ $Ca^{2+}$ -Kanal bindet. Durch weiterführende Analysen z.B. mit Hilfe eines phospho-PKA-Substrat-Antikörpers (Cell Signal Technology, erkennt Serin- oder Threonin-phosphorylierte Proteine), könnte eine PKA-vermittelte Phosphorylierung des  $IP_3$ -Rezeptor/ $Ca^{2+}$ -Kanals oder weiterer Proteine untersucht werden. Auch die Frage, ob cAMP  $Ca^{2+}$ -Transport-ATPasen der Plasmamembran oder  $Ca^{2+}$ -Kanäle beeinflusst, möglicherweise ebenfalls über die Aktivierung einer PKA, bedarf weiterer Untersuchungen.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die cAMP-vermittelte Potenzierung der  $IP_3$ -induzierten  $Ca^{2+}$ -Antwort zu einer Verstärkung des  $Ca^{2+}$ -abhängigen transepithelialen  $Cl^-$ -Transportes führt. Es wäre interessant zu untersuchen, ob diese Veränderung des  $Cl^-$ -Transportes zu einer Veränderung der Speichelsekretion und möglicherweise zu einer veränderten Qualität des Speichels führt.

Pilotexperimente zeigten, dass 5-HT offenbar die Aktivität der PKA  $Ca^{2+}$ -abhängig reduziert. Interessanterweise zeigte sich keine Steigerung der PKA-Aktivität nach Stimulierung mit 5-HT unter  $Ca^{2+}$ -freien Bedingungen. Es wurde vermutet, dass die Ursache dieser Beobachtung eine hohe PDE-Aktivität in den Epithelzellen ist. Es wäre zu überprüfen, ob eine Blockierung der PDE durch Applikation von PDE-Hemmstoffen (z.B. IBMX) zu einer 5-HT-induzierten Steigerung der PKA-Aktivität in den Epithelzellen der Speicheldrüse führt, wie das aus physiologischen Messungen vermutet werden muss.

Weitere Pilotexperimente lieferten erste Hinweise auf eine 5-HT-induzierte Erhöhung der Aktivität der PKC und der CaM-Kinase II. Durch Sekretionsmessungen mit Hilfe von spezifischen Kinase-Hemmstoffen und/oder Aktivatoren könnte die Beteiligung dieser Kinasen an der 5-HT-induzierten Speichel-Sekretion untersucht werden. Die Immunofluoreszenz-Untersuchungen zeigten eine Lokalisation einer PKC in der Nähe der apikalen Membran. Eine genaue Analyse der subzellulären Lokalisation durch immunelektronenmikroskopische Verfahren wäre ebenfalls interessant, insbesondere die Frage, ob es bei Stimulierung mit 5-HT zu einer Umverteilung der PKC in der Zelle kommt.

# Kapitel 5

## Zusammenfassung

Die Flüssigkeitssekretion sowie die Proteinsekretion werden in den Speicheldrüsen der Insekten über Hormone und Neurotransmitter gesteuert, welche in den sekretorischen Drüsenzellen hauptsächlich zwei Signalwege aktivieren. Einer dieser Signalwege führt zu der Bildung von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP), während der andere Signalweg zu einer Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration führt. Mögliche Wechselwirkungen dieser beiden Signalwege werden seit vielen Jahren intensiv untersucht. Die genauen Mechanismen dieser Wechselwirkungen und ihre physiologischen Auswirkungen sind jedoch unzureichend bekannt.

In der vorliegenden Arbeit sollten die Kenntnisse der cAMP- und  $\text{Ca}^{2+}$ -vermittelten Signalübertragung am Modell der Fliegenspeicheldrüse vertieft werden. Ein wesentliches Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Frage, ob und wie sich diese beiden Signalwege wechselseitig beeinflussen. Hierzu wurden transepitheliale Potentialmessungen (TEP), mikrofluorometrische  $\text{Ca}^{2+}$ -Messungen und immunzytochemische Analysen an isolierten Speicheldrüsen der Diptere *Calliphora vicina* durchgeführt.

Substanzen wie 5-Fluoro- $\alpha$ -Methyltryptamin (5-F- $\alpha$ -MT) und Histamin wurden als Agonisten genutzt, um in den Speicheldrüsen von *C. vicina* selektiv den cAMP-Signalweg (getrennt vom  $\text{IP}_3/\text{Ca}^{2+}$ -Signalweg) zu aktivieren. Es zeigte sich jedoch, dass 5-F- $\alpha$ -MT und Histamin nicht nur eine Erhöhung der  $[\text{cAMP}]_i$ , sondern in den Epithelzellen der Fliegenspeicheldrüse auch eine Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  induzierten. Beide Substanzen sind deshalb nicht geeignet, um in den Speicheldrüsen von *C. vicina* den cAMP-Weg selektiv zu aktivieren.

Weiterführende Untersuchungen zeigten, dass Histamin konzentrationsabhängig, positiv-

gehende Änderungen des TEP verursachte, die auf eine cAMP-abhängige Stimulierung des transepithelialen  $K^+$ -Transportes zurückzuführen waren. Das positiv verschobene TEP oszillierte, wobei die Frequenz der Oszillationen in Abhängigkeit von der Histamin-Konzentration anstieg. Im Gegensatz zu Serotonin (5-HT)-induzierten TEP-Oszillationen hatten die Histamin-induzierten TEP-Oszillationen einen regelmäßigen, fasst sinusförmigen Verlauf. Mikrofluorometrische  $Ca^{2+}$ -Messungen mit dem  $Ca^{2+}$ -empfindlichen Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 zeigten, dass Histamin Oszillationen der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) hervorrief. Steigende Histamin-Konzentrationen führten zu einem Anstieg der  $Ca^{2+}$ -Oszillationsfrequenz. Unter  $Ca^{2+}$ -freien Bedingungen verursachte Histamin einen Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$ . Deshalb wurde eine Histamin-induzierte  $Ca^{2+}$ -Freisetzung aus intrazellulären Speichern, z.B. dem ER, vermutet. Diese Vermutung konnte einerseits mit Hilfe des Phospholipase C-Hemmstoffes U73122 bestätigt werden. Andererseits konnte durch die Experimente mit dem Hemmstoff Yohimbin, welcher selektiv den Rezeptor blockt, der die Phosphoinositidkaskade aktiviert, gezeigt werden, dass die Histamin-induzierte  $Ca^{2+}$ -Erhöhung über den  $IP_3$ -Signalweg vermittelt wird. Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass Histamin wie 5-HT den cAMP-Weg und die Phosphoinositidkaskade aktivierte. Im Gegensatz zu den 5-HT-induzierten  $Ca^{2+}$ -Oszillationen, welche durch interzelluläre  $Ca^{2+}$ -Wellen synchronisiert wurden, verursachte Histamin bei niedrigen Konzentrationen lokale  $Ca^{2+}$ -Oszillationen in einzelnen Zellen (keine Wellen). Bei höheren Histamin-Konzentrationen war eine anhaltende  $Ca^{2+}$ -Erhöhung oder ein synchrones „ $Ca^{2+}$ -beating“ in der gesamten Drüse zu beobachten. Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente liefern leider noch keine Erklärung für die unterschiedliche Phänomenologie der  $Ca^{2+}$ -Oszillationen nach 5-HT- und Histamin-Stimulierung.

Ein weiteres Ergebnis dieser Arbeit ist, dass cAMP die 5-HT-induzierte  $Ca^{2+}$ -Antwort verstärkt. 5-HT induziert in den Zellen einen Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$ , welcher einen transepithelialen  $Cl^-$ -Transport über das Epithel verursacht. Eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration ( $[cAMP]_i$ ) durch die Applikation des Phosphodiesterase-Hemmstoffes IBMX verursachte eine Verstärkung des 5-HT-induzierten transepithelialen  $Cl^-$ -Transportes. Durch mikrofluorometrische  $Ca^{2+}$ -Messungen sollte die Hypothese überprüft werden, ob die Ursache dieser cAMP-vermittelten Verstärkung des  $Cl^-$ -Transportes eine cAMP-vermittelte Erhöhung des 5-HT-induzierten  $Ca^{2+}$ -Signals war. Diese Messungen zeigten, dass die Erhöhung der

[cAMP]<sub>i</sub> durch die Applikation von IBMX, Forskolin (Adenlyatzyklase-Aktivator) oder cAMP keinen Einfluss auf die [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in der unstimulierten Drüse hatte. Eine andere Reaktion zeigten Drüsen, welche mit niedrigen 5-HT-Konzentrationen stimuliert wurden. In diesen Experimenten führte eine Erhöhung der [cAMP]<sub>i</sub> zu einer Potenzierung des 5-HT-induzierten Ca<sup>2+</sup>-Anstieges, auch unter Ca<sup>2+</sup>-freien Bedingungen. Diese Ergebnisse legten die Vermutung nahe, dass cAMP die 5-HT-induzierte Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus dem ER potenzierte. Um diese Möglichkeit direkt zu testen, wurden mit Hilfe des Ca<sup>2+</sup>-empfindlichen Fluoreszenzfarbstoffes Mag-Fura-2 Ca<sup>2+</sup>-Änderungen im ER-Lumen von permeabilisierten Drüsen analysiert. Das Ergebnis dieser Experimente ist, dass cAMP die IP<sub>3</sub>-induzierte Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus dem ER dosisabhängig verstärkt, indem es den IP<sub>3</sub>-Rezeptor/Ca<sup>2+</sup>-Kanal für IP<sub>3</sub> sensitiviert.

cAMP entfaltet seine physiologische Wirkung nicht nur über die Stimulierung einer Proteinkinase A (PKA), sondern auch über den EPAC-Signalweg (*exchange protein activated by cAMP*). Deshalb wurden insgesamt 8 cAMP-Analoga getestet, welche mehr oder weniger selektiv entweder PKA oder den EPAC-Weg aktivieren. Diese Experimente zeigten eindeutig, dass cAMP ausschließlich über die Aktivierung einer PKA die Affinität des IP<sub>3</sub>-Rezeptor/Ca-Kanals für IP<sub>3</sub> erhöhte. Durch die Verwendung des spezifischen PKA-Hemmstoffes H-89 konnten diese Ergebnisse bestätigt werden.

Durch immunzytochemische Untersuchungen sollte überprüft werden, ob die PKA in der Nähe des IP<sub>3</sub>-Rezeptor/Ca<sup>2+</sup>-Kanals lokalisiert ist. Hierzu standen Antiseren gegen die regulatorische Untereinheit (PKA-RII) und gegen die katalytische Untereinheit (PKA-C) von *D. melanogaster* PKA zur Verfügung. Das Ergebnis der Western-Blot-Untersuchungen war, dass die Antiseren bei *C. vicina* Proteine erkannten, welche im Molekulargewichtsbereich von *D. melanogaster* PKA-RII bzw. PKA-C lagen. Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zeigten eine Lokalisation der PKA-RII und der PKA-C an der basolateralen und apikalen Plasmamembran, an punkt- bis ellipsoidförmigen intrazellulären Strukturen, möglicherweise Mitochondrien sowie eine diffuse Verteilung der PKA-Untereinheiten im gesamten Zytoplasma. Die Lokalisation der PKA-Untereinheiten im Zytoplasma legen die Vermutung nahe, dass die PKA unter anderem räumlich eng mit dem IP<sub>3</sub>-Rezeptor/Ca<sup>2+</sup>-Kanal assoziiert sein könnte. Die Lokalisation der PKA am ER passt konzeptionell zur oben beschriebenen PKA-abhängigen Verstärkung der IP<sub>3</sub>-induzierten Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus dem ER.

Die Bedeutung dieser Ergebnisse geht weit über die spezielle Insektenphysiologie hinaus. In

dieser Arbeit wird erstmals direkt durch intraluminale  $\text{Ca}^{2+}$ -Messungen nachgewiesen, dass auch bei Invertebraten der Botenstoff cAMP, PKA-vermittelt, den  $\text{IP}_3$ -Rezeptor/ $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal des ER für  $\text{IP}_3$  sensitiviert.

# Literaturverzeichnis

- Altfelder, K. and Müller, U. (1991). Cyclic nucleotide-dependent protein kinases in the neural tissue of the honeybee *Apis mellifera*. *Insect Biochem Mol Biol*, **21**(5), 487–495. [4.3](#)
- Altfelder, K., Muller, U., and Menzel, R. (1991).  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin and  $\text{Ca}^{2+}$ /phospholipid-dependent protein kinases in the neural tissue of the honeybee *Apis mellifera*. *Insect Biochem*, **21**, 479–486. [2.4.5](#), [3.3.2](#)
- Baker, A. J., Brandes, R., Schreur, J. H., Camacho, S. A., and Weiner, M. W. (1994). Protein and acidosis alter calcium-binding and fluorescence spectra of the calcium indicator indo-1. *Biophys J*, **67**(4), 1646–1654. [2.5.5.1](#)
- Bangham, A. D., Horne, R. W., Glauert, A. M., Dingle, J. T., and Lucy, J. A. (1962). Action of saponin on biological cell membranes. *Nature*, **196**, 952–955. [2.5.6](#)
- Baumann, O. and Walz, B. (1989). Calcium-and inositol polyphosphate-sensitivity of the calcium-sequestering endoplasmatic reticulum in the photoreceptor cells of the honey bee drone. *J Comp Physiol [A]*, **165**, 627–636. [1.2.3](#)
- Baylor, S. M. and Hollingworth, S. (2000). Measurement and interpretation of cytoplasmic  $[\text{Ca}^{2+}]$  signals from calcium indicator dyes. *News Physiol Sci.*, **15**, 19–26. [2.5.5.1](#)
- Bergling, S., Dolmetsch, R., Lewis, R. S., and Keizer, J. (1998). A fluorometric method for estimating the calcium content of internal stores. *Cell Calcium*, **23**(4), 251–259. [3.2.3.1](#)
- Berridge, M. (2005). Unlocking the secrets of cell signaling. *Annu. Rev Physiol*, **67**, 1–21. [1.3](#)
- 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. [1.2.2](#), [2.5.7.1](#), [3.1.1](#), [3.1.3](#), [4.1](#), [4.3](#)
- Berridge, M. J. (1980a). Phosphatidylinositol metabolism and calcium gating in a 5-HT receptor system. In *Drug Receptors and their Effectors*, pages 75–85. [1.2.2](#), [1.3](#)
- Berridge, M. J. (1980b). Preliminary measurements of intracellular calcium in an insect salivary gland using a calcium-sensitive microelectrode. *Cell Calcium*, **1**(217), 227. [4.4.2](#), [4.4.3](#)

- Berridge, M. J. (1981a). Electrophysiological evidence for the existence of separate receptor mechanisms mediating the action of 5-hydroxytryptamine. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **23**, 91–104. 1.3, 3.1, 3.1.1, 3.1.1, 3.1.2, 3.1.4, 4, 4.1, 4.1.1, 4.1.4, 4.2
- Berridge, M. J. (1981b). Phosphatidylinositol hydrolysis and calcium signalling. *Adv. Cyclic Nucleotide Res.*, **14**, 289–299. 1.3, 3.1, 3.1.1, 3.1.2, 3.1.4, 4, 4.1, 4.1.1, 4.1.4, 4.2
- Berridge, M. J. (1982a). 5-hydroxytryptamine stimulation of phosphoinositol hydrolysis and calcium signalling in the blowfly salivary gland. *Cell Calcium*, **3**, 385–397. 4.4.2, 4.4.3
- Berridge, M. J. (1982b). Regulation of cell secretion: The integrated action of cyclic AMP and calcium. *Handbook of Exp. Pharmacol. Cyclic Nucleotides II*, pages 227–270. 1.3, 4.1.4
- Berridge, M. J. (1993). Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature*, **361**(6410), 315–325. 1.1.2, 4.2.2, 4.4.3
- Berridge, M. J. and Galione, A. (1988). Cytosolic calcium oscillators. *FASEB J.*, **2**, 3074–3082. 3.1.1
- Berridge, M. J. and Heslop, J. P. (1981). Separate 5-hydroxytryptamine receptors on the salivary gland of the blowfly are linked to the generation of either cyclic adenosine 3′-5′-monophosphate or calcium signals. *Br. J. Pharmacol.*, **73**, 729–738. 1.2.2, 1.3, 3.1, 3.1.1, 3.1.2, 3.1.2, 3.1.3, 3.1.4, 4.1, 4.1.1, 4.1.1, 4.1.2, 4.1.4, 4.4.2, 4.4.3
- Berridge, M. J. and Patel, N. G. (1968). Insect salivary glands: Stimulation of fluid secretion by 5-hydroxytryptamine and adenosine-3′,5′-monophosphate. *Science*, **162**, 462–463. 1.2.1, 1.2.2, 1.3, 2.5.7.1, 3.1.1
- Berridge, M. J. and Prince, W. T. (1971). The electrical response of isolated salivary glands during stimulation with 5-hydroxytryptamine and cyclic AMP. *Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. B.*, **262**, 111–120. 2.5.7.1, 3.1.1, 4.2.1, 4.2.2
- Berridge, M. J. and Prince, W. T. (1972a). The role of cyclic AMP in the control of fluid secretion. *Adv. Cyclic Nucleotide Res.*, **1**, 137–147. 1.3, 3.2.1, 4, 4.1.1, 4.2.1
- Berridge, M. J. and Prince, W. T. (1972b). The role of cyclic cAMP and calcium in hormone action. *Adv. Insect Physiol.*, **9**, 1–49. 3.2.1, 4.1.1, 4.1.1, 4.2.1, 4.3
- Berridge, M. J. and Prince, W. T. (1972c). Transepithelial potential changes during stimulation of isolated salivary glands with 5-hydroxytryptamine and cyclic AMP. *J Exp. Biol*, **56**, 139–153. 2.5.7, 2.5.7.1, 3.1.1, 3.1.1, 4.1.1, 4.1.1
- Berridge, M. J., Lindley, B. D., and Prince, W. T. (1975). Membrane permeability changes during stimulation of isolated salivary glands of *Calliphora* by 5-hydroxytryptamine. *J Physiol*, **244**, 549–567. 2.5.7.1, 3.1.1, 4.1.1



- Berridge, M. J., Lindley, B. D., and Prince, W. T. (1976). Studies on the mechanism of fluid secretion by isolated salivary glands of *Calliphora*. *J Exp. Biol*, **64**, 311–322. [1.2.2](#), [1.3](#), [3.1.3](#), [4.1](#)
- Berridge, M. J., Lipp, P., and Bootman, M. D. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nature Rev.*, **1**, 1561–1570. [1.1.2](#), [3.3.1](#), [4](#), [4.1.4](#), [4.4.1](#)
- Bezprozvanny, I., Watras, J., and Ehrlich, B. E. (1991). Bell-shaped-calcium-response curves of Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>- and calcium-gated channels from endoplasmatic reticulum of cerebellum. *Nature*, **351**, 751–754. [1.2.3](#)
- Blenau, W. and Baumann, A. (2001). Molecular and pharmacological properties of insect biogenic amine receptors: lessons from *Drosophila melanogaster* and *Apis mellifera*. *Arch Insect Biochem Physiol*, **48**(1), 13–38. [4.1.3](#)
- Bos, J. L. (2003). Epac: a new cAMP target and new avenues in cAMP research. *Nat. Rev Mol Cell Biol*, **4**(9), 733–738. [4.2.3.1](#)
- Botelho, L. H., Rothermel, J. D., Coombs, R. V., and Jastorff, B. (1988). cAMP analog antagonists of cAMP action. *Methods Enzymol.*, **159**, 159–172. [4.2.3.1](#)
- Brady, J. and Maddrell, S. H. (1967). Neurohaemal organs in the medial nervous system of insects. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.*, **76**(3), 389–404. [1.2.1](#)
- Braiman, A., Zagoory, O., and Priel, Z. (1998). PKA induces Ca<sup>2+</sup> release and enhances ciliary beat frequency in a Ca<sup>2+</sup>-dependent and -independent manner. *Am. J Physiol*, **275**(3 Pt 1), C790–C797. [4.2.2](#)
- Brown, D. A., Bruce, J. I., Straub, S. V., and Yule, D. I. (2004). cAMP potentiates ATP-evoked calcium signaling in human parotid acinar cells. *J Biol Chem*, **279**(38), 39485–39494. [1.2](#), [4.2.2](#), [4.2.3.1](#)
- Bruce, J. I. E., Yule, D. I., and Shuttleworth, T. J. (2002a). Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinase A modulation of the plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase in parotid acinar cells. *J Biol Chem*, **277**(50), 48127–48181. [4.2.2](#), [4.2.3.1](#)
- Bruce, J. I. E., Shuttleworth, T. J., Giovannucci, D. R., and Yule, D. I. (2002b). Phosphorylation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in parotid acinar cells. *J Biol Chem*, **277**(2), 1340–1348. [4.2.3.1](#)
- Bruce, J. I. E., Straub, S. V., and Yule, D. I. (2003). Crosstalk between cAMP and Ca<sup>2+</sup> signaling in non-excitabile cells. *Cell Calcium*, **34**(6), 431–444. [1.2](#), [3.3.1](#), [4](#), [4.1.4](#), [4.4.1](#)
- Chanson, M., White, M. M., and Garber, S. S. (1996). cAMP promotes gap junctional coupling in T84 cells. *Am. J Physiol*, **271**(2 Pt 1), C533–C539. [4.1.4](#)

- Chatton, J. Y., Liu, H., and Stucki, J. W. (1995). Simultaneous measurements of  $\text{Ca}^{2+}$  in the intracellular stores and the cytosol of hepatocytes during hormone-induced  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations. *FEBS Lett*, **368**(1), 165–168. [2.5.6](#), [4.2.3](#)
- Chatton, J. Y., Cao, Y., Liu, H., and Stucki, J. W. (1998). Permissive role of cAMP in the oscillatory  $\text{Ca}^{2+}$  response to inositol 1,4,5-trisphosphate in rat hepatocytes. *Biochem J*, **330** (Pt 3), 1411–1416. [1.2](#)
- Christensen, A. E., Selheim, F., de Rooij, J., Dremier, S., Schwede, F., Dao, K. K., Martinez, A., Maenhaut, C., Bos, J. L., Genieser, H. G., and Doskeland, S. O. (2003). cAMP analog mapping of Epac1 and cAMP kinase. discriminating analogs demonstrate that Epac and cAMP kinase act synergistically to promote PC-12 cell neurite extension. *J Biol Chem*, **278**(37), 35394–35402. [3.2.3.1](#), [4.2.3.1](#)
- Coffino, P., Bourne, H. R., Friedrich, U., Hochman, J., Insel, P. A., Lemaire, I., Melmon, K. L., and Tomkins, G. M. (1976). Molecular mechanisms of cyclic amp action: a genetic approach. *Recent Prog. Horm. Res.*, **32**, 669–684. [4.3](#)
- Colbran, R. J. (2004). Targeting of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *Biochem J*, **378**, 1–16. [4.4.2](#)
- Colledge, M. and Scott, J. D. (1999). AKAPs: from structure to function. *Trends Cell Biol.*, **9**, 216–221. [4.3](#)
- Cook, D. I., Lennep, E. W. V., Roberts, M. L., and Young, J. A. (1994). Secretion by the major salivary glands. In R. L. Johnson, editor, *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, book chapter 26, pages 1061–1117. Raven Press, third edition edition. [1](#)
- Cooper, D. M. F., Mons, N., and Karpen, J. W. (1995). Adenyl cyclases and the interaction between calcium and cAMP signalling. *Nature*, **374**, 421–424. [1.2](#), [3.3.1](#), [4](#), [4.4.1](#)
- Daaka, Y., Luttrell, L. M., and Lefkowitz, R. J. (1997). Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G-proteins by protein kinase A. *Nature*, **390**(6655), 88–91. [4.2.3.1](#)
- Dames, P., Zimmermann, B., Schmidt, R., Rein, J., Schewe, B., Walz, B., and Baumann, O. (2006). Cyclic AMP regulates plasma membrane V-ATPase assembly and activity in blowfly salivary glands. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, in Press. [1.2.2](#), [4.4.1](#)
- de Rooij, J., Zwartkruis, F. J., Verheijen, M. H., Cool, R. H., Nijman, S. M., Wittinghofer, A., and Bos, J. L. (1998). Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature*, **396**, 474–477. [4.2.3.1](#)
- de Rooij, J., Rehmann, H., van Triest, M., Cool, R. H., Wittinghofer, A., and Bos, J. L. (2000). Mechanism of regulation of the Epac family of cAMP-dependent RapGEFs. *J Biol Chem*, **275**(27), 20829–20836. [4.2.3.1](#)

- Dean, W. L., Chen, D., Brandt, P. C., and Vanaman, T. C. (1997). Regulation of platelet plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase by cAMP-dependent and tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem*, **272**(24), 15113–15119. [4.2.2](#)
- Dedos, S. G. and Fugo, H. (2001). Involvement of calcium, inositol-1,4,5 trisphosphate and diacylglycerol in the prothoracicotropic hormone-stimulated ecdysteroid synthesis and secretion in the prothoracic glands of *bombyx mori*. *Zoolog. Sci.*, **18**(9), 1245–1251. [4.4.3](#)
- den Dekker, E., Heemskerk, J. W., Gorter, G., der van, V., Donath, J., Kroner, C., Mikoshiba, K., and Akkerman, J. W. (2002). Cyclic amp raises intracellular  $\text{ca}(2+)$  in human megakaryocytes independent of protein kinaseA. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*, **22**(1), 179–186. [4.2.2](#)
- deSouza N, S, R., K, O., YM, Y., S, M., and AR, M. (2002). Protein kinase A and two phosphatases are components of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor macromolecular signaling complex. *J Biol Chem*, **277**(42), 39397–39400. [4.3](#)
- Dolmetsch, R. E. and Lewis, R. S. (1994). Signaling between intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores and depletion-activated  $\text{Ca}^{2+}$  channels generates  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  oscillations in T lymphocytes. *J Gen. Physiol*, **103**(3), 365–388. [4.1.2](#)
- Driessche, W. V. and Zeiske, W. (1985). Ionic channels in epithelial cell membranes. *Physiol Rev*, **65**(4), 833–903. [3.2.1](#), [4.2.1](#)
- Duve, H., Thorpe, A., and Nässel, D. R. (1988). Light and electron-microscopic immunocytochemistry of peptidergic neurons innervating thoracico-abdominal neurohaemal areas in the blowfly. *Cell Tissue Res.*, **253**, 583–595. [1.2.1](#)
- Duve, H., Johnsen, A. H., Sewell, J. C., Scott, A. G., Orchard, I., Regfeld, J. F., and Thorpe, A. (1992). Isolation, structure, and activity of -Phe-Met-Arg-Phe-Nh<sub>2</sub> neuropeptides (designated calliFMRF amides) from the blowfly *Calliphora vomitoria*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 2326–2330. [1.2.1](#)
- Dyachok, O. and Gylfe, E. (2004).  $\text{Ca}(2+)$ -induced  $\text{Ca}(2+)$  release via inositol 1,4,5-trisphosphate receptors is amplified by protein kinase A and triggers exocytosis in pancreatic beta-cells. *J Biol Chem*, **279**(44), 45455–45461. [4.2.3.1](#)
- Edwards, A. S. and Scott, J. D. (2000). A-kinase anchoring proteins: protein kinase A and beyond. *Curr. Opin. Cell Biol*, **12**(2), 217–221. [4.3](#)
- Eisenhardt, D., Fiala, A., Braun, P., Rosenboom, H., Kress, H., Ebert, P. R., and Menzel, R. (2001). Cloning of a catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase from the honeybee (*Apis mellifera*) and its localization in the brain. *Insect Mol Biol*, **10**(2), 173–181. [3.2.4](#)
- Elias, M. S. and Evans, P. D. (1983). Histamine in the insect nervous system: distribution, synthesis and metabolism. *J Neurochem.*, **41**(2), 562–568. [4.1.3](#)

- Elias, M. S., Lummis, S. C., and Evans, P. D. (1984). [3H]mepyramine binding sites in the optic lobe of the locust: autoradiographic and pharmacological studies. *Brain Res*, **294**(2), 359–362. [4.1.3](#)
- Eliasson, L., Ma, X., Renstrom, E., Barg, S., Berggren, P. O., Galvanovskis, J., Gromada, J., Jing, X., Lundquist, I., Salehi, A., Sewing, S., and Rorsman, P. (2003). SUR1 regulates PKA-independent cAMP-induced granule priming in mouse pancreatic B-cells. *J Gen. Physiol*, **121**(3), 181–197. [4.2.3.1](#)
- Enserink, J. M., Christensen, A. E., de Rooij, J., van Triest, M., Schwede, F., Genieser, H. G., Doskeland, S. O., Blank, J. L., and Bos, J. L. (2002). A novel Epac-specific cAMP analogue demonstrates independent regulation of Rap1 and ERK. *Nat. Cell Biol*, **4**(11), 901–906. [3.2.3.1](#), [4.2.3.1](#)
- Fain, J. N. and Berridge, M. J. (1979a). Relationship between hormonal activation of phosphatidylinositol hydrolysis, fluid secretion and calcium flux in the blowfly salivary gland. *Biochem. J.*, **178**, 45–58. [1.2.2](#), [3.1.3](#), [4.1](#)
- Fain, J. N. and Berridge, M. J. (1979b). Relationship between phosphatidylinositol synthesis and recovery of 5-hydroxytryptamine-responsive  $Ca^{2+}$ -flux in blowfly salivary gland. *Biochem. J.*, **180**, 655–661. [4.4.3](#)
- Falquet, L., Pagni, M., Bucher, P., Hulo, N., Sigrist, C. J., Hofmann, K., and Bairoch, A. (2002). The prosite database, its status in 2002. *Nucleic Acids Res*, **30**(1), 235–238. [1](#)
- Farfel, Z., Bourne, H. R., and Iiri, T. (1999). The expanding spectrum of G protein diseases. *N. Engl. J Med.*, **340**(13), 1012–1020. [1.1](#)
- Feliciello, A., Gottesman, M. E., and Avvedimento, A. V. (2001). The biological functions of A-kinase anchor proteins. *J Mol. Biol*, **308**, 99–114. [4.3](#)
- Ferris, C. D., Cameron, A. M., Brecht, D. S., Haganir, R. L., and Snyder, S. H. (1991). Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is phosphorylated by cyclic AMP-dependent protein kinase at serines 1755 and 1589. *Biochem Biophys Res Commun.*, **175**(1), 192–198. [4.2.2](#), [4.2.3.1](#)
- Fewtrell, C. (1993).  $Ca^{2+}$  oscillations in non-excitable cells. *Annu. Rev Physiol*, **55**, 427–454. [4.1.2](#)
- Fimia, G. M. and Sassone-Corsi, P. (2001). Cyclic AMP signalling. *J Cell Sci.*, **114**(Pt 11), 1971–1972. [1.1.1](#)
- Finch, E. A., Turner, T. J., and Goldin, S. M. (1991). Calcium as a coagonist of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced calcium release. *Science*, **252**, 443–446. [1.2.3](#)
- Finkenzeller, G., Marme, D., and Hug, H. (1990). Sequence of human protein kinase C alpha. *Nucleic Acids Res*, **18**(8), 2183. [3.3.4](#), [4.4.4](#)

- Foskett, J. K. and Wong, D. C. (1994).  $[Ca^{2+}]_i$  inhibition of  $Ca^{2+}$  release-activated  $Ca^{2+}$  influx underlies agonist- and thapsigargin-induced  $[Ca^{2+}]_i$  oscillations in salivary acinar cells. *J Biol Chem*, **269**(50), 31525–31532. [4.1.2](#)
- Foster, J. L., Guttman, J. J., Hall, L. M., and Rosen, O. M. (1984). *Drosophila* cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem*, **259**(21), 13049–13055. [4.3](#)
- Foster, J. L., Higgins, G. C., and Jackson, F. R. (1988). Cloning, sequence, and expression of the *Drosophila* cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit gene. *J Biol Chem*, **263**(4), 1676–1681. [3.2.4](#), [4.3](#)
- Furuichi, T., Yoshikawa, S., Miyawaki, A., Wada, K., Maeda, N., and Mikoshiba, K. (1989). Primary structure and functional expression of the inositol 1,4,5-trisphosphate-binding protein P400. *Nature*, **342**(6245), 32–38. [4.2.3.1](#)
- Furuichi, T., Kohda, K., Miyamaki, A., and Mikoshiba, K. (1994). Intracellular channels. *Cur Opin. Cell Biol.*, **4**, 294–303. [4.2.3.1](#)
- Galione, A. and Berridge, M. J. (1988). Pharmacological modulation of oscillations in the blowfly salivary gland. *Biochem. Soci. Trans.*, pages 988–990. [4.1.2](#)
- Garbunova, Y. V. and Spitzer, N. C. (2002). Dynamic interactions of cyclic AMP transients and spontaneous  $Ca^{2+}$  spikes. *Nature*, **418**, 93–96. [1.2](#), [4](#)
- Gengs, C., Leung, H. T., Skingsley, D. R., Iovchev, M. I., Yin, Z., Semenov, E. P., Burg, M. G., Hardie, R. C., and Pak, W. L. (2002). The target of *Drosophila* photoreceptor synaptic transmission is a histamine-gated chloride channel encoded by ort (hclA). *J Biol Chem*, **277**(44), 42113–42120. [4.1.3](#)
- Gerbino, A., Ruder, W. C., Curci, S., Pozzan, T., Zaccolo, M., and Hofer, A. M. (2005). Termination of cAMP signals by  $Ca^{2+}$  and  $G(\alpha)_i$  via extracellular  $Ca^{2+}$  sensors: a link to intracellular  $Ca^{2+}$  oscillations. *J Cell Biol*, **171**(2), 303–312. [4.2.2](#)
- Gillis, K. D., Mossner, R., and Neher, E. (1996). Protein kinase C enhances exocytosis from chromaffin cells by increasing the size of the readily releasable pool of secretory granules. *Neuron*, **16**(6), 1209–1220. [4.4.3](#)
- Giovannucci, D. R., Groblewski, G. E., Sneyd, J., and Yule, D. I. (2000). Target phosphorylation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors selectively inhibits localized  $Ca^{2+}$  release and shapes oscillatory  $Ca^{2+}$  signals. *J Biol Chem*, **275**(43), 33704–33711. [4.2.3.1](#)
- Gorg, A., Obermaier, C., Boguth, G., Csordas, A., Diaz, J. J., and Madjar, J. J. (1997). Very alkaline immobilized pH gradients for two-dimensional electrophoresis of ribosomal and nuclear proteins. *Electrophoresis*, **18**(3-4), 328–337. [2.4.1](#)

- Grapengiesser, E., Gylfe, E., and Hellman, B. (1991). Cyclic AMP as a determinant for glucose induction of fast  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations in isolated pancreatic beta-cells. *J Biol Chem*, **266**(19), 12207–12210. [4.2.2](#)
- Griffith, L. C. and Greenspan, R. J. (1993). The diversity of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II isoforms in *Drosophila* is generated by alternative splicing of a single gene. *J Neurochem.*, **61**(4), 1534–1537. [4.4.2](#)
- Grynkiewicz, G., Poenie, M., and Tsien, R. Y. (1985). A new generation of  $\text{Ca}^{2+}$  indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*, **260**, 3440–3450. [2.5.5.1](#)
- Haastert, P. J. V., Driel, R. V., Jastorff, B., Baraniak, J., Stec, W. J., and Wit, R. J. D. (1984). Competitive cAMP antagonists for cAMP-receptor proteins. *J Biol Chem*, **259**(16), 10020–10024. [4.2.3.1](#)
- Hamm, H. E. (1998). The many faces of G-protein signaling. *J Biol Chem*, **273**(2), 669–672. [1.1](#)
- Han, J. D., Baker, N. E., and Rubin, C. S. (1997). Molecular characterization of a novel A kinase anchor protein from *Drosophila melanogaster*. *J Biol Chem*, **272**(42), 26611–26619. [4.3](#)
- Hanrahan, J. W., Wills, N. K., Phillips, J. E., and Lewis, S. A. (1986). Basolateral K channels in an insect epithelium. Channel density, conductance, and block by barium. *J Gen. Physiol*, **87**(3), 443–466. [3.2.1](#), [4.2.1](#)
- Hansen-Bay, C. M. (1978a). The control of enzyme secretion from fly salivary glands. *J. Physiol.*, **274**, 421–435. [1.2.1](#)
- Hansen-Bay, C. M. (1978b). Control of salivation in the blowfly *Calliphora*. *J Exp. Biol*, **75**, 189–201. [1.2.1](#)
- Hansen-Bay, C. M. (1978c). The secretion and action of the digestive enzymes of the salivary glands of the blowfly, *Calliphora*. *J Insect Physiol*, **24**, 141–149. [1.2.1](#)
- Hardie, R. C. (1987). Is histamine a neurotransmitter in insect photoreceptors? *J Comp Physiol [A]*, **161**(2), 201–213. [4.1.3](#)
- Hardie, R. C. (1989). A histamine-activated chloride channel involved in neurotransmission at a photoreceptor synapse. *Nature*, **339**(6227), 704–706. [4.1.3](#)
- Haug, L. S., Jensen, V., Hvalby, O., Walaas, S. I., and Ostvold, A. C. (1999). Phosphorylation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor by cyclic nucleotide-dependent kinases *in vitro* and in rat cerebellar slices *in situ*. *J Biol Chem*, **274**(11), 7467–7473. [4.2.3.1](#)
- Hidaka, H. and Kobayashi, R. (1992). Pharmacology of protein kinase inhibitors. *Annu. Rev Pharmacol Toxicol*, **32**, 377–397. [4.2.3.1](#)



- Hildebrandt, H. and Müller, U. (1995). PKA activity in the antannal lobe of honeybees is regulated by chemosensory stimulation *in vivo*. *Brain Res.*, **679**, 281–288. [2.4.5](#), [3.3.1](#)
- Hofer, A. M. and Machen, T. E. (1993). Technique for in situ measurement of calcium in intracellular inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive stores using the fluorescent indicator mag-fura-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **90**(7), 2598–2602. [2.5.6](#), [4.2.3](#)
- Hofer, A. M. and Machen, T. E. (1994). Direct measurement of free  $\text{Ca}^{2+}$  in organelles of gastric epithelial cells. *Am. J Physiol.*, **267**(3 Pt 1), G442–G451. [4.2.3](#)
- Hofer, A. M., Curci, S., Machen, T. E., and Schulz, I. (1996). ATP regulates calcium leak from agonist-sensitive internal calcium stores. *FASEB J.*, **10**(2), 302–308. [3.2.3.1](#)
- Hook, S. and Means, A. (2001).  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM-dependent kinases: From activation to function. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **41**, 471–505. [1.1.2](#), [4.4.2](#)
- House, C. R. (1980). Physiology of invertebrate salivary glands. *Biol. Rev.*, **55**, 417–473. [1](#), [1.2.1](#)
- House, C. R. and Ginsborg, B. L. (1985). Salivary gland. In G. A. Kerkut and L. I. Gilbert, editors, *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology Vol.4: Regulation Digestion, Nutrition and Excretion*, book chapter 6, pages 195–223. Pergamon Press. [1](#), [1.2.1](#)
- Houslay, M. D. and Milligan, G. (1997). Tailoring cAMP-signalling responses through isoform multiplicity. *Trends Biochem Sci.*, **22**(6), 217–224. [4.3](#)
- Hove-Madsen, L. and Bers, D. M. (1992). Indo-1 binding to protein in permeabilized ventricular myocytes alters its spectral and  $\text{Ca}^{2+}$  binding properties. *Biophys J.*, **63**(1), 89–97. [2.5.5.1](#)
- Iino, M. (1990). Biphasic  $\text{Ca}^{2+}$  dependence of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced  $\text{Ca}^{2+}$  release in smooth muscle cells of the guinea pig *taenia caeci*. *J Gen. Physiol.*, **95**(6), 1103–1122. [1.2.3](#)
- Jackson, S. M. and Berg, C. A. (2002). An A-kinase anchoring protein is required for protein kinase A regulatory subunit localization and morphology of actin structures during oogenesis in *Drosophila*. *Development*, **129**(19), 4423–4433. [4.3](#)
- Joseph, S. K. and Ryan, S. V. (1993). Phosphorylation of the inositol trisphosphate receptor in isolated rat hepatocytes. *J Biol Chem.*, **268**(31), 23059–23065. [4.2.2](#)
- Kalderon, D. and Rubin, G. M. (1988). Isolation and characterization of *Drosophila* cAMP-dependent protein kinase genes. *Genes Dev.*, **2**, 1539–1556. [2.4](#), [3.2.4](#), [4.3](#)
- Kang, G., Chepurny, O. G., Rindler, M. J., Collis, L., Chepurny, Z., Li, W., Harbeck, M., Roe, M. W., and Holz, G. G. (2005). A cAMP and  $\text{Ca}^{2+}$  coincidence detector in support of  $\text{Ca}^{2+}$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$  release (CICR) in pancreatic  $\beta$  cells. *J Physiol.* [4.2.3.1](#)

- Kawasaki, H., Springett, G. M., Mochizuki, N., Toki, S., Nakaya, M., Matsuda, M., Housman, D. E., and Graybiel, A. M. (1998). A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1. *Science*, **282**(5397), 2275–2279. [4.2.3.1](#)
- Koninck, P. and Schulman, H. (1998). Sensitivity of CaM Kinase II to the frequency of Ca<sup>2+</sup>-oscillations. *Science*, **279**, 227–230. [4.4.2](#)
- Kroeze, W. K., Sheffler, D. J., and Roth, B. L. (2003). G-protein-coupled receptors at a glance. *J Cell Sci.*, **116**, 4867–4869. [1.1](#)
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**(5259), 680–685. [2.4.2](#)
- Lampe, P. D. and Lau, A. F. (2004). The effects of connexin phosphorylation on gap junctional communication. *Int. J Biochem Cell Biol*, **36**(7), 1171–1186. [4.1.4](#)
- Landa, L. R., Harbeck, M., Kaihara, K., Chepurny, O., Kitiphongspattana, K., Graf, O., Nikolaev, V. O., Lohse, M. J., Holz, G. G., and Roe, M. W. (2005). Interplay of Ca<sup>2+</sup> and cAMP signaling in the insulin-secreting MIN6 beta-cell line. *J Biol Chem*. [4.2.2](#)
- Lane, M. E. and Kalderon, D. (1993). Genetic investigation of cAMP dependent protein kinase function in *Drosophila* development. *Genes Dev*, **7**, 1229–1243. [4.3](#)
- Li, Z., Rossi, E. A., Hoheisel, J. D., Kalderon, D., and Rubin, C. S. (1999). Generation of a novel A kinase anchor protein and a myristoylated alanine-rich C kinase substrate-like analog from a single gene. *J Biol Chem*, **274**(38), 27191–27200. [4.3](#)
- Litosch, I., Saito, Y., and Fain, J. N. (1982). 5-HT-stimulated arachidonic acid release from labeled phosphatidylinositol in blowfly salivary glands. *Am. J Physiol*, **243**(5), C222–C226. [4.4.3](#)
- Lokuta, A. J., Meyers, M. B., Sander, P. R., Fishman, G. I., and Valdivia, H. H. (1997). Modulation of cardiac ryanodine receptors by sorcin. *J Biol Chem*, **272**(40), 25333–25338. [4.2.3.1](#)
- Lu, X., Xu, L., and Meissner, G. (1995). Phosphorylation of dihydropyridine receptor II-III loop peptide regulates skeletal muscle calcium release channel function. evidence for an essential role of the beta-OH group of Ser687. *J Biol Chem*, **270**(31), 18459–18464. [4.2.3.1](#)
- MacKrell, J. J. (1999). Protein-protein interactions in intracellular Ca<sup>2+</sup>-release channel function. *Biochem J*, **337** ( Pt 3), 345–361. [4.2.3.1](#)
- Magnier, C., Bredoux, R., Kovacs, T., Quarck, R., Papp, B., Corvazier, E., de Gunzburg, J., and Enouf, J. (1994). Correlated expression of the 97 kDa sarcoendoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase and Rap1B in platelets and various cell lines. *Biochem J*, **297** ( Pt 2), 343–350. [4.2.2](#)



- Martinez, J. R. and Zhang, G. H. (1998). Cross-talk in signal transduction pathways of rat submandibular acinar cells. *Eur. J Morphol.*, **36 Suppl**, 190–193. [4.2.3.1](#)
- Melendez, A., Li, W., and Kalderon, D. (1995). Activity, expression and function of a second *Drosophila* protein kinase A catalytic subunit gene. *Genetics*, **141**(4), 1507–1520. [4.3](#)
- Mikoshiba, K. (1997). The InsP<sub>3</sub> receptor and intracellular Ca<sup>2+</sup> signalling. *Cur. Opin. Cell Biol.*, **7**, 339–345. [4.2.3.1](#)
- Millard, P. J., Ryan, T. A., Webb, W. W., and Fewtrell, C. (1989). Immunoglobulin E receptor cross-linking induces oscillations in intracellular free ionized calcium in individual tumor mast cells. *J Biol Chem*, **264**(33), 19730–19739. [4.1.2](#)
- Müller, U. (1997a). Insect 86 kDa protein kinase C substrate is a filament interacting protein regulated by Ca<sup>2+</sup> / calmodulin and phosphorylation. *Brain Res.*, **757**, 24–30. [2.4.5](#)
- Müller, U. (1997b). Neuronal cAMP-dependent protein kinase type II is concentrated in mushroom bodies of *Drosophila melanogaster* and the honeybee *Apis mellifera*. *J Neurobiol.*, **33**, 33–44. [4.3](#)
- Müller, U. and Spatz, H. C. (1989). Ca(2+)-dependent proteolytic modification of the cAMP-dependent protein kinase in *Drosophila* wild-type and dunce memory mutants. *J Neurogenet.*, **6**(2), 95–114. [4.3](#)
- Monastirioti, M. (1999). Biogenic amine systems in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Microsc. Res. Tech.*, **45**(2), 106–121. [4.1.3](#)
- Mons, N., Decorte, L., Jaffard, R., and Cooper, D. M. (1998). Ca<sup>2+</sup>-sensitive adenylyl cyclases, key integrators of cellular signalling. *Life Sci.*, **62**(17-18), 1647–1652. [4](#), [4.4.1](#)
- Nagel, W. (1979). Inhibition of potassium conductance by barium in frog skin epithelium. *Biochim Biophys Acta*, **552**(2), 346–357. [3.2.1](#), [4.2.1](#)
- Nakade, S., Rhee, S. K., Hamanaka, H., and Mikoshiba, K. (1994). Cyclic AMP-dependent phosphorylation of an immunoaffinity-purified homotetrameric inositol 1,4,5-trisphosphate receptor (type I) increases Ca<sup>2+</sup> flux in reconstituted lipid vesicles. *J Biol Chem*, **269**(9), 6735–6742. [4.2.2](#), [4.2.3.1](#)
- Neer, E. J. (1994). G proteins: critical control points for transmembrane signals. *Protein Sci.*, **3**(1), 3–14. [1.1](#)
- Newton, A. C. (2001). Protein kinase C: structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions. *Chem Rev*, **101**(8), 2353–2364. [4.4.4](#)
- Neyses, L., Reinlib, L., and Carafoli, E. (1985). Phosphorylation of the Ca<sup>2+</sup>-pumping ATPase of heart sarcolemma and erythrocyte plasma membrane by the cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem*, **260**(18), 10283–10287. [4.2.2](#)

- Nicholson, B. J. (2003). Gap junctions - from cell to molecule. *J Cell Sci.*, **116**(Pt 22), 4479–4481. [4.1.4](#)
- Nässel, D. R. (1991). Neurotransmitters and neuromodulators in the insect visual system. *Prog. Neurobiol.*, **37**(3), 179–254. [4.1.3](#)
- Nässel, D. R. (1999). Histamine in the brain of insects: a review. *Microsc. Res. Tech.*, **44**(2-3), 121–136. [4.1.3](#)
- Nässel, D. R. and Elekes, K. (1992). Aminergic neurons in the brain of blowflies and *Drosophila*: dopamine- and tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons and their relationship with putative histaminergic neurons. *Cell Tissue Res.*, **267**(1), 147–167. [4.1.3](#)
- Nässel, D. R., Pirvola, U., and Panula, P. (1990). Histaminelike immunoreactive neurons innervating putative neurohaemal areas and central neuropil in the thoraco-abdominal ganglia of the flies *Drosophila* and *Calliphora*. *J Comp Neurol.*, **297**(4), 525–536. [4.1.3](#)
- O'Donnell, M. J. and Maddrell, S. H. P. (1995). Fluid reabsorption and ion transport by the lower malpighian tubules of adult female *Drosophila*. *J Exp. Biol.*, **198**, 1647–1653. [4.2.1](#)
- Oschman, J. L. and Berridge, M. J. (1970). Structural and functional aspects of salivary fluid secretion in *Calliphora*. *Tissue and Cell*, **2**(2), 281–310. [1.2.1](#), [1.2.1](#)
- Ozaki, N., Shibasaki, T., Kashima, Y., Miki, T., Takahashi, K., Ueno, H., Sunaga, Y., Yano, H., Matsuura, Y., Iwanaga, T., Takai, Y., and Seino, S. (2000). cAMP-GEFII is a direct target of cAMP in regulated exocytosis. *Nat. Cell Biol.*, **2**(11), 805–811. [4.2.3.1](#)
- Parekh, A. B. and J. W. Putney, J. (2005). Store-operated calcium channels. *Physiol Rev*, **85**(2), 757–810. [3.1.2](#)
- Park, S. K., Sedore, S. A., Cronmiller, C., and Hirsh, J. (2000). Type II cAMP-dependent protein kinase-deficient *Drosophila* are viable but show developmental, circadian, and drug response phenotypes. *J Biol Chem*, **275**(27), 20588–20596. [3.2.4](#), [4.3](#)
- Parker, P. J. and Murray-Rust, J. (2004). PKC at a glance. *J Cell Sci.*, **117**(Pt 2), 131–132. [1.1.2](#), [4.4.4](#)
- Paulson, A. F., Lampe, P. D., Meyer, R. A., TenBroek, E., Atkinson, M. M., Walseth, T. F., and Johnson, R. G. (2000). Cyclic AMP and LDL trigger a rapid enhancement in gap junction assembly through a stimulation of connexin trafficking. *J Cell Sci.*, **113** ( Pt 17), 3037–3049. [4.1.4](#)
- Phelan, P. (2005). Innexins: members of an evolutionarily conserved family of gap-junction proteins. *Biochim Biophys Acta*, **1711**(2), 225–245. [4.1.4](#)
- Phelan, P. and Starich, T. A. (2001). Innexins get into the gap. *Bioessays*, **23**(5), 388–396. [4.1.4](#)

- Phelan, P., Bacon, J. P., Davies, J. A., Stebbings, L. A., Todman, M. G., Avery, L., Baines, R. A., Barnes, T. M., Ford, C., Hekimi, S., Lee, R., Shaw, J. E., Starich, T. A., Curtin, K. D., Sun, Y. A., and Wyman, R. J. (1998). Innexins: a family of invertebrate gap-junction proteins. *Trends Genet.*, **14**(9), 348–349. [4.1.4](#)
- Pittner, R. A. and Fain, J. N. (1989). Exposure of cultured hepatocytes to cyclic AMP enhances the vasopressin-mediated stimulation of inositol phosphate production. *Biochem J*, **257**(2), 455–460. [4.2.2](#)
- Prince, W. T. and Berridge, M. J. (1972). The effect of 5-hydroxytryptamine and cyclic AMP on the potential profile across isolated salivary glands. *J Exp. Biol*, **56**, 323–333. [3.2.1](#), [4.2.1](#)
- Prince, W. T., Berridge, M. J., and Rasmussen, H. (1973). Role of calcium and adenosine-3':5'-cyclic monophosphate in controlling fly salivary gland secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **69**(3), 553–557. [1.2.2](#), [1.3](#), [3.1.3](#), [4](#), [4.1](#), [4.2](#), [4.4.1](#)
- Putney, J. W. (1986). A model for receptor regulated calcium entry. *Cell Calcium*, **7**, 1–12. [1.2.3](#), [3.1.2](#)
- Putney, J. W. (1990). Capacitative calcium entry revisited. *Cell Calcium*, **11**, 611–624. [1.2.3](#), [3.1.2](#)
- Rapp, P. E. and Berridge, M. J. (1981). The control of transepithelial potential oscillations in the salivary gland of *Calliphora erythrocephala*. *J Exp. Biol*, **93**, 119–132. [2.5.7.1](#), [3.1.1](#), [4.1.1](#)
- Rasmussen, H. (1981). *Calcium and cAMP as synarchic messengers*. John Wiley and Sons, Inc., New York. [4](#), [4.1.4](#)
- Rehmann, H., Schwede, F., Doskeland, S. O., Wittinghofer, A., and Bos, J. L. (2003). Ligand-mediated activation of the cAMP-responsive guanine nucleotide exchange factor Epac. *J Biol Chem*, **278**(40), 38548–38556. [3.2.3.1](#), [4.2.3.1](#)
- Ribeiro, J. M. C. (1995). Insect saliva: Function, biochemistry, and physiology. In R. F. Chapman and G. D. Boer, editors, *Regulatory mechanisms in insect feeding*, pages 74–97. Chapman and Hall. [1](#)
- Robb-Gaspers, L. D. and Thomas, A. P. (1995). Coordination of Ca<sup>2+</sup> signaling by intercellular propagation of Ca<sup>2+</sup> waves in the intact liver. *J Biol Chem*, **270**(14), 8102–8107. [4.1.4](#)
- Roeder, T. (2003). Metabotropic histamine receptors—nothing for invertebrates? *Eur. J Pharmacol.*, **466**, 85–90. [4.1.3](#)
- Rose, B. (1980). Permeability of the cell-to-cell membrane channel and its regulation in an insect cell junction. *In Vitro*, **16**(12), 1029–1042. [4.1.4](#)

- Rose, B. and Loewenstein, W. R. (1976). Permeability of a cell junction and the local cytoplasmic free ionized calcium concentration: a study with aequorin. *J Membr. Biol*, **28**(1), 87–119. 4.1.4
- Rosenthal, A., Rhee, L., Yadegari, R., Paro, R., Ullrich, A., and Goeddel, D. V. (1987). Structure and nucleotide sequence of a *Drosophila melanogaster* protein kinase C gene. *EMBO J*, **6**(2), 433–441. 3.3.4, 4.4.4
- Rotte, C. (2005). Morphologische und funktionelle Charakterisierung der Speicheldrüsen in *Calliphora vicina*. *Diplomarbeit*. 1.2
- Saez, J. C., Berthoud, V. M., Branes, M. C., Martinez, A. D., and Beyer, E. C. (2003). Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. *Physiol Rev*, **83**(4), 1359–1400. 4.1.4
- Sanchez-Bueno, A., Marrero, I., and Cobbold, P. H. (1993). Different modulatory effects of elevated cyclic AMP on cytosolic  $Ca^{2+}$  spikes induced by phenylephrine or vasopressin in single rat hepatocytes. *Biochem J*, **291** ( Pt 1), 163–168. 4.2.2
- Sanderson, M. J., Charles, A. C., Boitano, S., and Dirksen, E. R. (1994). Mechanisms and function of intercellular calcium signaling. *Mol Cell Endocrinol.*, **98**(2), 173–187. 4.1.4
- Schaeffer, E., Smith, D., Mardon, G., Quinn, W., and Zuker, C. (1989). Isolation and characterization of two new *Drosophila* protein kinase C genes, including one specifically expressed in photoreceptor cells. *Cell*, **57**(3), 403–412. 3.3.4, 4.4.4
- Schulman, H. and Lou, L. L. (1989). Multifunctional  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase: domain structure and regulation. *Trends Biochem Sci.*, **14**(2), 62–66. 4.4.2
- Schulman, H., Hanson, P. I., and Meyer, T. (2004). Decoding calcium signals by multifunctional CaM-kinase. *Cell Calcium*, **13**, 401–411. 4.4.2
- Schwartz, M., Pacifico, A. D., MacKrell, T. N., Jacobson, A., and Rehm, W. (1968). Effects of barium on the vitro frog gastric mucosa. *Proc. Soc. Exp. Biol Med.*, **127**(1), 223–225. 3.2.1, 4.2.1
- Scott, B. N., Yu, M. J., Lee, L. W., and Beyenbach, K. W. (2004). Mechanisms of  $K^+$  transport across basolateral membranes of principal cells in Malpighian tubules of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *J Exp. Biol*, **207**(Pt 10), 1655–1663. 4.2.1
- Seino, S. and Shibasaki, T. (2005). PKA-dependent and PKA-independent pathways for cAMP-regulated exocytosis. *Physiol Rev*, **85**(4), 1303–1342. 3.2.3.1, 4.2.3.1
- Sinha, M. and Hasan, G. (1999). Sequencing and exon mapping of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor cDNA from *Drosophila* embryos suggests the presence of differentially regulated forms of RNA and protein. *Gene*, **233**(1-2), 271–276. 4.2.3.1

- Skingsley, D. R., Laughlin, S. B., and Hardie, R. C. (1995). Properties of histamine-activated chloride channels in the large monopolar cells of the dipteran compound eye: A comparative study. *Journal of Comparative. Physiology A - Sensory. Neural and Behavioral. Physiology*, **176**, 611–623. [4.1.3](#)
- Soderling, T. R. (1999). The  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulin-dependent protein kinase cascade. *TIBS*, **24**, 232–236. [4.4.2](#)
- Soderling, T. R. and Stull, J. T. (2001). Structure and regulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase. *Chem. Rev*, **101**, 2341–2351. [1.1.2](#)
- Springett, G. M., Kawasaki, H., and Spriggs, D. R. (2004). Non-kinase second-messenger signaling: new pathways with new promise. *Bioessays*, **26**(7), 730–738. [4.2.3.1](#)
- Stauffer, P. L., Zhao, H., Luby-Phelps, K., Moss, R. L., Star, R. A., and Muallem, S. (1993). Gap junction communication modulates  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  oscillations and enzyme secretion in pancreatic acini. *J Biol Chem*, **268**(26), 19769–19775. [4.1.4](#)
- Straub, S. V., Wagner, L. E., Bruce, J. I., and Yule, D. I. (2004). Modulation of cytosolic calcium signaling by protein kinase A-mediated phosphorylation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *Biol Res*, **37**(4), 593–602. [4.2.3.1](#)
- Supattapone, S., Danoff, S. K., Theibert, A., Joseph, S. K., Steiner, J., and Snyder, S. H. (1988). Cyclic AMP-dependent phosphorylation of a brain inositol trisphosphate receptor decreases its release of calcium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **85**(22), 8747–8750. [4.2.3.1](#)
- Tang, T., Tu, H., Wang, Z., and Bezprozvanny, I. (2003). Modulation of type 1 inositol (1,4,5)-trisphosphate receptor function by protein kinase A and protein phosphatase 1a. *J Neurosci.*, **23**(2), 403–415. [4.2.3.1](#)
- Tasken, K. and Aandahl, E. M. (2004). Localized effects of cAMP mediated by distinct routes of protein kinase A. *Physiol Rev*, **84**(1), 137–167. [4.2.3.1](#), [4.3](#)
- Taylor, S. S., Yang, J., Wu, J., Haste, N. M., Radzio-Andzelm, E., and Anand, G. (2004). PKA: a portrait of protein kinase dynamics. *Biochim Biophys Acta*, **1697**(1-2), 259–269. [3.2.3.1](#), [4.2.3.1](#)
- Tertyshnikova, S. and Fein, A. (1998). Inhibition of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced  $\text{Ca}^{2+}$  release by cAMP-dependent protein kinase in a living cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **95**(4), 1613–1617. [4.2.3.1](#)
- Thastrup, O., Cullen, P. J., Drobak, B. J., Hanley, M. R., and Dawson, A. P. (1990). Thapsigargin, a tumor promotor, discharges intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores by specific inhibition of the endoplasmatic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 2466–2470. [3.2.3.1](#)

- Thomas, A. P., Bird, G. S., Hajnoczky, G., Robb-Gaspers, L. D., and J. W. Putney, J. (1996). Spatial and temporal aspects of cellular calcium signaling. *FASEB J*, **10**(13), 1505–1517. [4.1.4](#)
- Toda, T., Cameron, S., Sass, P., Zoller, M., and Wigler, M. (1987). Three different genes in *S. cerevisiae* encode the catalytic subunits of the cAMP-dependent protein kinase. *Cell*, **50**(2), 277–287. [4.3](#)
- Tordjmann, T., Berthon, B., Claret, M., and Combettes, L. (1997). Coordinated intercellular calcium waves induced by noradrenaline in rat hepatocytes: dual control by gap junction permeability and agonist. *EMBO J*, **16**(17), 5398–5407. [4.1.4](#)
- Tu, H., Tang, T. S., Wang, Z., and Bezprozvanny, I. (2004). Association of type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor with AKAP9 (Yotiao) and protein kinase A. *J Biol Chem*, **279**(18), 19375–19382. [4.3](#)
- Valverde, R. H., Tortelote, G. G., Lemos, T., Mintz, E., and Vieyra, A. (2005). Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II is an essential mediator in the coordinated regulation of electrocyte Ca<sup>2+</sup>-ATPase by calmodulin and protein kinase A. *J Biol Chem*, **280**(34), 30611–30618. [4.2.3.1](#), [4.4.2](#)
- van Veen, T. A., van Rijen, H. V., and Jongsma, H. J. (2000). Electrical conductance of mouse connexin45 gap junction channels is modulated by phosphorylation. *Cardiovasc. Res*, **46**(3), 496–510. [4.1.4](#)
- Venkatesh, K., Siddhartha, G., Joshi, R., Patel, S., and Hasan, G. (2001). Interactions between the inositol 1,4,5-trisphosphate and cyclic AMP signaling pathways regulate larval molting in *Drosophila*. *Genetics*, **158**(1), 309–318. [4.2.3.1](#)
- Walker, G. P. (2003). Salivary glands. In V. H. Resh and R. T. Cardé, editors, *Encyclopedia of Insects*, pages 1011–1017. Academic Press. [1](#), [1.2.1](#)
- Wan, Q. F., Dong, Y., Yang, H., Lou, X., Ding, J., and Xu, T. (2004). Protein kinase activation increases insulin secretion by sensitizing the secretory machinery to Ca<sup>2+</sup>. *J Gen. Physiol*, **124**(6), 653–662. [4.4.3](#)
- Wayman, G. A., Tokumitsu, H., and Soderling, T. R. (1997). Inhibitory cross-talk by cAMP kinase on the calmodulin-dependent protein kinase cascade. *J Biol Chem*, **272**(26), 16073–16076. [4.2.3.1](#), [4.4.2](#)
- Wojcikiewicz, R. J. and Luo, S. G. (1998). Phosphorylation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors by cAMP-dependent protein kinase. Type I, II, and III receptors are differentially susceptible to phosphorylation and are phosphorylated in intact cells. *J Biol Chem*, **273**(10), 5670–5677. [4.2.3.1](#)
- Wojcikiewicz, R. J., Tobin, A. B., and Nahorski, S. R. (1993). Desensitization of cell signalling mediated by phosphoinositidase C. *Trends Pharmacol Sci.*, **14**(7), 279–285. [4.4.2](#)



- Woods, N. M., Cuthbertson, K. S., and Cobbold, P. H. (1986). Repetitive transient rises in cytoplasmic free calcium in hormone-stimulated hepatocytes. *Nature*, **319**(6054), 600–602. [4.1.2](#)
- Yang, Y., Udayasankar, S., Dunning, J., Chen, P., and Gillis, K. D. (2002). A highly  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive pool of vesicles is regulated by protein kinase C in adrenal chromaffin cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **99**(26), 17060–17065. [4.4.3](#)
- Yoshikawa, S., Tanimura, T., Miyawaki, A., Nakamura, M., Yuzaki, M., Furuichi, T., and Mikoshiba, K. (1992). Molecular cloning and characterization of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in *Drosophila melanogaster*. *J Biol Chem*, **267**(23), 16613–16619. [4.2.3.1](#), [1](#)
- Zaccolo, M. and Pozzan, T. (2003). cAMP and  $\text{Ca}^{2+}$  interplay: a matter of oscillation patterns. *Trends Neurosci.*, **26**(2), 53–55. [4](#)
- Zhang, G. H. and Martinez, J. R. (1999). Effects of forskolin, dibutyryl cAMP and H89 on  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization in submandibular salivary cells of newborn rats. *Arch Oral Biol*, **44**(9), 735–744. [4.2.2](#)
- Zhang, G. H., Helmke, R. J., and Martinez, J. R. (1997). Characterization of  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization in the human submandibular duct cell line A253. *Proc. Soc. Exp. Biol Med.*, **216**(1), 117–124. [4.2.2](#)
- Zhong, N. and Zucker, R. (2005). cAMP acts on exchange protein activated by cAMP/cAMP regulated guanine nucleotide exchange protein to regulate transmitter release at the crayfish neuromuscular junction. *J Neurosci.*, **25**(1), 208–214. [4.2.3.1](#)
- Zhu, H., Hille, B., and Xu, T. (2002). Sensitization of regulated exocytosis by protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **99**(26), 17055–17059. [4.4.3](#)
- Zimmermann, B. (1998). Calcium store depletion activates two distinct calcium entry pathways in secretory cells of the bowfly salivary gland. *Cell Calcium*, **23**(1), 53–63. [1.2.3](#)
- Zimmermann, B. (2000a). Control of  $\text{InsP}_3$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations in permeabilized bowfly salivary gland cells: contribution of mitochondria. *J Physiol*, **525**(3), 707–719. [2.5.6](#), [3.2.3](#), [3.2.3](#), [4.2.3](#)
- Zimmermann, B. (2000b). Subcellular organization of agonist-evoked  $\text{Ca}^{2+}$  waves in the bowfly salivary gland. *Cell Calcium*, **27**(5), 297–307. [1.2](#), [1.2.3](#)
- Zimmermann, B. and Walz, B. (1997). Serotonin-induced intercellular calcium waves in salivary glands of the bowfly *Calliphora erythrocephala*. *J Physiol*, **500**(1), 17–28. [1.2.3](#), [3.1.2](#), [3.1.2](#), [3.1.4](#), [3.2.2](#), [3.2.2](#), [4.1.1](#), [4.1.2](#), [4.1.4](#), [4.2.2](#), [4.4.2](#), [4.4.3](#)
- Zimmermann, B. and Walz, B. (1999). The mechanism mediating regenerative intercellular  $\text{Ca}^{2+}$  waves in the bowfly salivary gland. *EMBO Journal*, **18**(12), 3222–3231. [1.2.3](#), [3.1.2](#), [3.1.4](#), [4.1.1](#), [4.1.2](#), [4.1.4](#)

---

Zimmermann, B., Dames, P., Walz, B., and 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. [1.2.2](#)



# Anhang A

## Abkürzungsverzeichnis

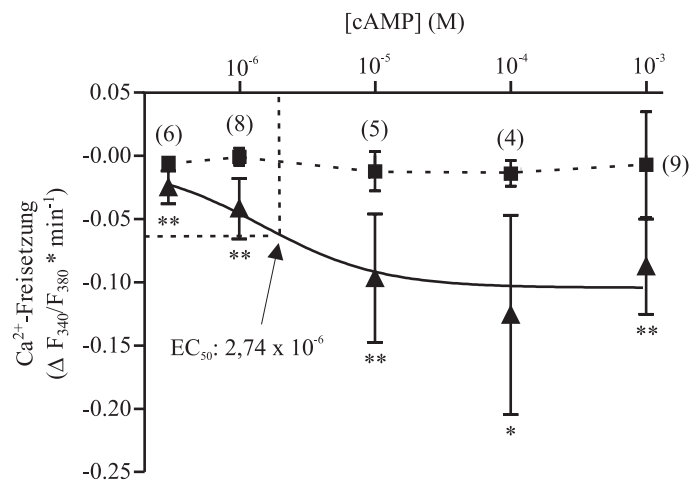
5-HT	Serotonin, 5-Hydroxytryptamin
6-Bnz-cAMP	N <sup>6</sup> -Benzoyladenosen-cyclisches Adenosinmonophosphat
6-MBC-cAMP	N <sup>6</sup> - Mono-tert.-butylcarbomyladenosen-cyclisches Adenosinmonophosphat
6-Phe-cAMP	N <sup>6</sup> -Phenyladenosen-cyclisches Adenosinmonophosphat
8-Br-Rp-cAMPS	8-Bromoadenosine-cyclisches Adenosinmonophosphat, Rp-isomer
8-CPT-cAMP	8-(4-Chlorophenylthio) cyclisches Adenosinmonophosphat
8-pCPT-2'-O-Me-cAMP	8-(4-Chlorophenylthio)-2'-O-Methyladenosen-cyclisches Adenosinmonophosphat
8-pHPT-2'-O-Me-cAMP	8-(4-Hydroxyphenylthio)-2'-O-Methyladenosen-cyclisches Adenosinmonophosphat
8-pMeOPT-2'-O-Me-cAMP	8-(4-Methoxyphenylthio)-2'-O-Methyladenosen-cyclisches Adenosinmonophosphat
AC	Adenylatzyclase
ADP	Adenosindiphosphat
AM	Acetoxymethyl
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
DAG	Diacylglycerol
MQ H <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECL	enhanced chemiluminescence (engl.)
EGTA	Ethylenglycol-bis-(2-aminoethy-ether)-N,N,N',N'- Tetraessigsäure
Epac	Exchange Protein activated by cAMP (engl.)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
GTP	Guanosintriphosphat
H-89	N-[2-((p-Bromocinnamyl)amino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide
IBMX	3-Isobutyl-1-Methylxanthin
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-triphosphat
kD	Kilodalton
n.A.	numerische Apertur
NGS	normales Ziegenserum

---

PBS	phosphate buffered saline (engl.)
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKA	Protein Kinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	Tetramethyldiamin
U73122	1-[6-((17 $\beta$ -3-Methoxyestra-1,3,5(10)-trien-17-yl)amino)hexyl]-1H-pyrrole-2,5-dione

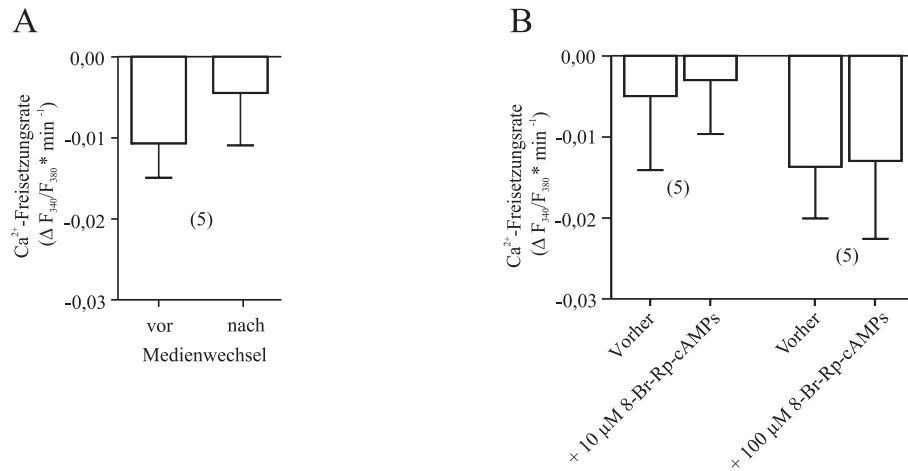
# Anhang

Abbildung A.1 zeigt die Dosis-Wirkungskurve für den Effekt von cAMP auf die IP<sub>3</sub>-induzierte Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung basierend auf der alternativen Auswertmethode durch die Ermittlung der Ca<sup>2+</sup>-Freisetzungsrates aus dem ER (Vgl. Abb. 3.19).



**Abbildung A.1:** Dosis-Wirkungskurve der cAMP-vermittelten Verstärkung der IP<sub>3</sub>-induzierten Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus dem ER. Dargestellt ist die Rate der Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus dem ER. Zur Berechnung der Rate der Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus dem ER wurde eine lineare Regression über den Zeitraum von 1 min vor der cAMP-Applikation (Abb. 3.18B;1) und über den Zeitraum von 1 min nach Applikation von cAMP ermittelt. Angegeben sind MW  $\pm$  SD der Rate der Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus dem ER ( $\Delta F_{340}/F_{380} \cdot \text{min}^{-1}$ ). Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der getesteten Drüsen bei der entsprechenden cAMP-bzw IP<sub>3</sub>-Konzentration an. Statistische Auswertung: Gepaarter t-Test; \* p < 0,05, \*\* p < 0,01.

Abbildung A.2 zeigt den Einfluss des Medienwechsels sowie die Wirkung von 8-Br-Rp-cAMPS, eines Antagonisten cAMP-bindender Proteine, basierend auf der alternativen Auswertmethode durch die Ermittlung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungsrates aus dem ER (Vgl. 3.20).



**Abbildung A.2:** Einfluss eines Medienwechsels (A) und Wirkung des cAMP-Antagonisten 8-Br-Rp-cAMPS (C) auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungsrates aus dem ER. Zur Berechnung der Rate der  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem ER wurde eine lineare Regression über den Zeitraum von 1 min vor dem Medienwechsel bzw. vor der Applikation von 8-Br-Rp-cAMPS und über den Zeitraum von 1 min nach einem Medienwechsel bzw. nach der Applikation von 8-Br-Rp-cAMPS ermittelt. Dargestellt sind die MW  $\pm$  SD der  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungsrates aus dem ER. Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der getesteten Drüsen bei einem Medienwechsel bzw. bei der entsprechenden Konzentration von 8-Br-Rp-cAMPS an. Statistische Auswertung: Gepaarter t-Test,  $p > 0,05$ .

# Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Bernd Walz für die freundliche und kreative Arbeitsatmosphäre und für seine stete Diskussionsbereitschaft bei der Bearbeitung dieses interessanten Themas. Insbesondere für seine enorme Geduld bei der Erstellung dieser Arbeit möchte ich mich sehr bedanken.

Bei Herrn PD Dr. Otto Baumann möchte ich mich für die zahlreichen fruchtbaren Diskussionen bedanken. Ich bin ihm für seine zahlreichen kreativen Einwürfe und seine anregende Kritik sehr dankbar.

Bei Prof. Dr. Uli Müller möchte ich mich für die Hilfe bei den Messungen der Proteinkinase-Aktivitäten bedanken.

Mein Dank gilt auch Frau Angela Hubig, Frau Bärbel Wundke und Frau Helga Liebherr für die Einführung in die verschiedenen Techniken des Laborbetriebes und für die Unterstützung bei Fragen und Problemen des Alltags.

Bei den Doktoranden Carsten Hille, Piotr Kos, Christian Krach, Julia Rein und Jana Schlentdt und bei den Diplomanden Kathleen Rotte, Bettina Schewe und Britta Troppman möchte ich mich für den Beistand und Hilfe und den erzeugten Spass bedanken.

Bedanken möchte ich mich auch bei den Mitgliedern des Graduiertenkollegs 837 „Functional Insect Science“ für die fröhliche Gemeinschaft und die stete Bereitschaft mir die Koordination zu erleichtern.

In diesem Zusammenhang gilt mein besonderer Dank Frau Birgit Herold und Frau Kathrin Kania mir bei der Wegfindung durch den bürokratischen „Dschungel“ der Verwaltung behilflich gewesen zu sein.

Mein herzlichster Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden, für ihre unablässige Anteilnahme und Fürsorge.

# Lebenslauf

<b>Name</b>	Ruth Maria Schmidt
Geburtsdatum	10.02.1975
Geburtsort	Soltau
<b>berufliche Tätigkeit</b>	
seit 10/2001	Wissenschaftliche Mitarbeiterin/Doktorandin an der Universität Potsdam im Institut für Biochemie und Biologie in der Arbeitsgruppe Zoophysiologie (Prof. Walz)
2003-2005	Koordinatorin des Graduiertenkollegs 837 „Functional Insect Science“
<b>Studium</b>	
1995 – 2001	Studium an der Universität Potsdam in der Fachrichtung Biologie
08/2001	Abschluss als Diplom-Biologin
1994 – 1995	Studium an der Universität Potsdam in der Fachrichtung Lehramt Sekundarstufe I/II, Biologie und Mathematik
<b>Schulausbildung</b>	
1981 – 1985	Grundschule Insel
1985 – 1987	Orientierungsstufe Schneverdingen
1987 – 1991	Kooperative Gesamtschule Schneverdingen
1991 – 1994	Gymnasium Soltau  Abschluss Abitur

Potsdam, den 04.03.2006

Ruth Maria Schmidt

# Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich diese vorliegende Arbeit weder bei der Universität Potsdam noch bei einer anderen wissenschaftlichen Einrichtung eingereicht habe, um zu promovieren.

Witerhin erkläre ich, die vorliegende Arbeit sebständig ohne fremde Hilfe verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Potsdam, den 04.03.2006

Ruth Maria Schmidt