

Wirkungen biogener Amine  
auf die Erregungs-Sekretions-Kopplung  
in der Speicheldrüse von  
*Periplaneta americana* (L.)

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades  
eines Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)  
in der Wissenschaftsdisziplin Zoophysiologie

eingereicht an der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität Potsdam

von Katja Rietdorf

Potsdam, Mai 2003



# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Speicheldrüsen bei Insekten: ein kurzer Überblick.....	1
1.2 Fragestellungen dieser Arbeit .....	2
1.3 Speicheldrüse von <i>Periplaneta americana</i> .....	3
1.4 Nähere Beschreibung der untersuchten Themengebiete .....	5
1.4.1 Elektrolyt- und Flüssigkeitssekretion.....	5
1.4.2 Änderung intrazellulärer Ionenkonzentrationen in den Acinuszellen .....	6
1.4.3 Proteinsekretion.....	6
2. Material & Methoden.....	7
2.1 Verwendete Substanzen und Lösungen.....	7
2.2 Präparation der Speicheldrüsen.....	8
2.3 Sammlung von Speichelproben und Messungen der Sekretionsrate.....	9
2.3.1 Präparation des Gewebes, Versuchsaufbau und Volumenbestimmung.....	9
2.3.2 Versuchsablauf und Auswertung.....	9
2.4 Messungen des Elektrolytgehalts im Speichel .....	10
2.4.1 Präparation des Gewebes, Versuchsaufbau und Meßprinzip.....	10
2.4.1.1 Probenaufbereitung für die kapillarelektrophoretische Analyse.....	11
2.4.1.2 Bestimmungen des Elektrolytgehalts.....	12
2.4.2 Versuchsablauf und Auswertung.....	13
2.5 Mikrofluorometrische Ca <sup>2+</sup> -Messungen in den Acinuszellen .....	13
2.5.1 Präparation des Gewebes, Versuchsaufbau und Meßprinzip.....	13
2.5.2 Versuchsablauf und Auswertung.....	14
2.6 Messungen der Proteinsekretion.....	16
2.6.1 Vitalmikroskopische Analysen der Proteinsekretion .....	16
2.6.1.1 Präparation der Drüsen, Versuchsaufbau und Meßprinzip.....	16
2.6.1.2 Versuchsablauf und Auswertung.....	17
2.6.2 Biochemische Bestimmungen des Proteingehalts im Speichel .....	17
2.6.2.1 Präparation der Drüsen, Versuchsaufbau und Meßprinzip.....	17
2.6.2.2 Versuchsablauf: Beeinflußt DA die 5-HT-stimulierte Proteinsekretion?.....	18
2.6.2.3 Versuchsablauf zur Erstellung der Dosis-Wirkungskurve der Proteinsekretion.....	19
2.6.2.4 Versuchsablauf zum Test, ob die Erhöhung der intrazellulären Ca <sup>2+</sup> -, cAMP- und / oder cGMP-Konzentration eine Proteinsekretion aktiviert.....	19
2.6.2.5 Versuchsablauf zur Untersuchung, ob die Protein Kinase C und die Adenylatcyclase an der Protein- und Flüssigkeitssekretion beteiligt sind .....	20
2.7 Datenanalyse und Statistik.....	21
3. Ergebnisse.....	23
3.1 Elektrolyt- und Flüssigkeitssekretion.....	23
3.1.1 Flüssigkeitssekretion.....	23
3.1.2 Elektrolytgehalt im Speichel .....	25
3.2 Mikrofluorometrische Messungen der Ca <sup>2+</sup> -Konzentration und der Autofluoreszenz.....	31
3.2.1 Änderungen der Ca <sup>2+</sup> -Konzentration in den Acinuszellen .....	31
3.2.2 Änderungen der Autofluoreszenz unter Bedingungen einer Fura-2-Messung.....	32
3.2.3 Änderungen der Autofluoreszenz unter Meßbedingungen, welche spezifisch die Fluoreszenz von NAD(P)H und Flavoproteinen anregen.....	34

3.3 Messungen der Proteinsekretion.....	36
3.3.1 Vitalmikroskopische Analysen der Proteinsekretion.....	36
3.3.2 Biochemische Proteinbestimmungen.....	40
3.3.2.1 Beeinflußt DA die 5-HT-stimulierte Proteinsekretion? .....	40
3.3.2.2 Dosis-Wirkungskurve .....	41
3.3.2.3 Welche Signalwege aktivieren die Proteinsekretion?.....	42
3.3.2.3.1 Kinetik der Proteinsekretion.....	42
3.3.2.3.1.1 5-HT stimulierte Proteinsekretion.....	43
3.3.2.3.1.2 Proteinsekretion nach Erhöhung der intrazellulären Ca <sup>2+</sup> -Konzentration .....	43
3.3.2.3.1.3 Proteinsekretion nach Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration .....	44
3.3.2.3.1.4 Proteinsekretion nach gleichzeitiger Erhöhung der intrazellulären Ca <sup>2+</sup> - und cAMP-Konzentrationen .....	45
3.3.2.3.1.5 Proteinsekretion nach Erhöhung der intrazellulären cGMP-Konzentration allein oder gleichzeitig mit der intrazellulären Ca <sup>2+</sup> - oder cAMP-Konzentration ...	46
3.3.2.3.2 Kinetik der Proteinsekretion (quantitative Aspekte) .....	47
3.3.2.4 Beeinflussen eine Protein Kinase C und die Adenylatcyclase die Protein- und Flüssigkeitssekretion?.....	49
3.3.2.4.1 Proteinsekretion.....	50
3.2.2.4.2 Flüssigkeitssekretion.....	50
4. Diskussion.....	53
4.1 Elektrolytgehalt im Speichel und Flüssigkeitssekretion.....	53
4.1.1 DA- und 5-HT-stimulierte Raten der Flüssigkeitssekretion sowie Elektrolyt- und Flüssigkeitstransport in den Acini.....	53
4.1.2 Mögliche Funktionen des Ausführungsgangs.....	56
4.2 Mikrofluorometrische Messungen der Ca <sup>2+</sup> -Konzentration und der Autofluoreszenz.....	58
4.2.1 Änderungen der Ca <sup>2+</sup> -Konzentration in den Acinuszellen.....	58
4.2.2 Änderungen der Autofluoreszenz unter Meßbedingungen, welche spezifisch die Fluoreszenz von NAD(P)H und Flavoproteinen anregen.....	61
4.3 Messungen der Proteinsekretion.....	63
4.3.1 Vitalmikroskopische Analysen der Proteinsekretion.....	64
4.3.2 Biochemische Proteinbestimmungen.....	66
4.3.2.1 Methodische Aspekte.....	66
4.3.2.2 Wird die 5-HT stimulierte Proteinsekretion durch DA beeinflusst? .....	66
4.3.2.3 der 5-HT-stimulierte Proteinsekretion: Dosis-Wirkungskurve .....	67
4.3.2.4 Aktivieren die Botenstoffe Ca <sup>2+</sup> , cAMP und / oder cGMP die Proteinsekretion? .....	68
4.3.2.4.1 Proteinsekretion nach Erhöhung der intrazellulären Ca <sup>2+</sup> -Konzentration.....	68
4.3.2.4.2 Proteinsekretion nach Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration.....	70
4.3.2.4.3 Proteinsekretion nach gleichzeitiger Erhöhung der intrazellulären Ca <sup>2+</sup> - und cAMP-Konzentrationen.....	71
4.3.2.4.4 Proteinsekretion nach Erhöhung der intrazellulären cGMP-Konzentration, allein oder simultan mit der intrazellulären Ca <sup>2+</sup> - oder der cAMP-Konzentration .....	73
4.3.2.5 Wirkungen einer Erhöhung der Botenstoffe Ca <sup>2+</sup> , cAMP und / oder cGMP auf die 5-HT-stimulierte Proteinsekretion während der Kontrollstimulierung.....	75
4.3.3 Welche Signalwege vermitteln die Effekte von Ca <sup>2+</sup> und cAMP auf die Proteinsekretion? .....	76
4.4 Gesamtbild: An der Flüssigkeits- und Proteinsekretion beteiligte Signalwege .....	79
4.4.1 Dopaminerge Innervierung .....	79
4.4.2 DA-stimulierte Flüssigkeitssekretion: Prozesse in den P-Zellen.....	79
4.4.3 DA-stimulierte Flüssigkeitssekretion: Prozesse in den Ausführungszellen.....	81
4.4.4. Serotonerge Innervierung der Speicheldrüse von <i>P. americana</i> .....	82
4.4.5. 5-HT-stimulierte Flüssigkeits- und Proteinsekretion.....	82
4.4.6. Können noch weitere Botenstoffe an der Erregungs-Sekretions-Kopplung in der Schabenspeicheldrüse beteiligt sein? .....	83

5. Zusammenfassung.....	85
5.1 Elektrolytgehalt im Speichel und Flüssigkeitssekretion.....	85
5.2 Änderung intrazellulärer Ionenkonzentrationen in den Acinuszellen .....	86
5.3 Proteinsekretion.....	86
6. Literatur.....	89
7. Danksagung.....	103
8. Anhang.....	105
8.1 Liste der verwendeten Abkürzungen.....	105
8.2 Liste der Händler, bei denen Chemikalien und Laborwaren bezogen wurden.....	106
8.3 Weitergehende theoretische Hintergründe zu den Inhalten dieser Arbeit.....	108
8.3.1 Wesentlichen Mechanismen der Exocytose: ein kurzer Überblick.....	108
8.3.2 Methoden, mit denen die Exocytose untersucht werden kann: ein kurzer Überblick.....	110
8.3.2.1 Biochemische Methoden.....	110
8.3.2.2 Mikroskopische Methoden .....	110
8.3.2.3 Elektrophysiologische Methoden.....	112
8.3.2.3 Weitere Methoden.....	112
8.3.3 Absorptions- und Emissionsspektren von NAD(P)H und Flavoproteinen.....	113
8.4 Weitere Ergebnisse.....	114
8.4.1 Mikrofluorometrische Messungen der Ca <sup>2+</sup> -Konzentration und Autofluoreszenz.....	114
8.4.2 Proteinsekretion.....	115
8.4.3 Flüssigkeitssekretion.....	117
8.4.3.1 Flüssigkeitssekretion nach Erhöhung der intrazellulären Ca <sup>2+</sup> , cAMP und / oder cGMP-Konzentration.....	117
8.4.3.2 DA- und 5-HT-stimulierte Flüssigkeits- und Proteinsekretion bei Applikation des NO-Donors SNP .....	120



## I. Einleitung

### I.1 Speicheldrüsen bei Insekten: ein kurzer Überblick

Speicheldrüsen sind bei Insekten weit verbreitete sekretorisch aktive Organe. Der Speichel ist eine wäßrige Elektrolytlösung, die verschiedenste Proteine enthalten kann. Dabei handelt es sich vorwiegend um Verdauungsenzyme. Im Schabenspeichel wurden z. B. Amylase, Invertase, Lactase, Maltase, Lipase und Protease nachgewiesen (Raychaudhuri & Gosh, 1964; Agrawal & Bahadur, 1978 & 1981). Die Speicheldrüse ist wahrscheinlich der einzige Ort, an dem Amylase in den Verdauungstrakt abgegeben wird (Agrawal & Bahadur, 1978). Als weiteres Protein enthält der Schabenspeichel ein Dispersionspheromon, das von Weibchen und Nymphen abgegeben wird (Faulde et al., 1990 a,b). Der Speichel blutsaugender Insekten enthält zahlreiche Substanzen, welche die Blutgerinnung und Verengung der Blutgefäße verhindern, sowie antibakteriell wirkendes Lysozym (Ribeiro, 1995). Er kann auch Krankheitserreger wie z.B. den Malariaerreger *Plasmodium* übertragen (Golenda, 1992). Bestandteile des Speichels vieler phytophager Insekten induzieren Abwehrreaktionen in der Wirtspflanze (Turlings et al., 1995; Musser et al., 2002).

Neben den Speicheldrüsen verfügen Insekten über zahlreiche andere exokrine und endokrine Drüsen bzw. sekretorisch aktive Einzelzellen oder Gewebe (eine Auswahl zeigt Tab. 1). Für einige der genannten sekretorisch aktiven Strukturen sind Art und chemische Natur wichtiger Sekretbestandteile bekannt. Unzureichend charakterisiert oder völlig unbekannt ist dagegen, auf welche Weise das Nervensystem und / oder hormonelle Einflüsse die sekretorische Aktivität beeinflussen bzw. welche intrazellulären Signalkaskaden an der Erregungs-Sekretions-Kopplung beteiligt sind.

Von den beispielhaft genannten sekretorischen Strukturen wird die Erregungs-Sekretions-Kopplung bei Insekten zur Zeit hauptsächlich an neurosekretorischen Zellen des endokrinen Systems (z.B. Gilbert et al., 2002), Malpighischen Gefäßen (z. B. Pannabecker, 1995; Beyenbach, 2001) und chemischen Synapsen (z. B. Kuromi & Kidokoro, 2002; Richmond & Broadie, 2002) untersucht.

Die Erregungs-Sekretions-Kopplung in Speicheldrüsen einiger Insekten hat man bereits in den 70er und 80er Jahren intensiv untersucht. Wichtige Forschungsobjekte waren die Schmeißfliegen *Calliphora erythrocephala* (Meig.) und *C. vicina* (Robineau-Desvoidy), die Schaben *Periplaneta americana* (L.) und *Nauphoeta cinerea* (Olivier) sowie Heuschrecken (Review in House, 1980). Obwohl diese Arbeiten wichtige Details der Erregungs-Sekretions-Kopplung aufklärten, blieben trotz der intensiven Bearbeitung dieses Themas aus methodischen Gründen wichtige Aspekte unbekannt.

In Speicheldrüsen verbergen sich hinter der Umschreibung "Erregungs-Sekretions-Kopplung" zwei grundlegend verschiedene Teilmechanismen: Die Kopplung zwischen hormoneller und / oder nervöser Stimulierung und (1) dem Elektrolyt- und Wassertransport über das Drüsenepithel sowie (2) der Proteinsekretion. An dieser Stelle muß auch erwähnt werden, daß in keiner Speicheldrüse von Insekten alle an der Elektrolyt- und Flüssigkeitssekretion beteiligten Transportmechanismen identifiziert und charakterisiert sind.

**Tabelle 1: Auswahl prominenter Drüsen und sekretorisch aktiver Zellen bzw. Geweben bei Insekten.**

<b>Sekretorisch aktive Zellen / Drüsen</b>	<b>Art des Sekrets</b>	<b>Beschreibung</b>
<b>Exokrine Drüsen (ektodermal; Hautdrüsen)</b>		
Wehrdrüsen	Abwehrsekrete von larvalen und adulten Blattkäfern, von Heuschrecken, Ameisen u.a. Insekten	Dettner, 1999 Gross et al., 2002
Spezialfall: "Reaktordrüse"	Beim Bombardierkäfer werden die Einzelkomponenten des Wehrsekrets in einer speziellen Reaktionskammer der Drüse "gezündet". Das dabei gebildete H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> und Hydrochinonderivate werden explosionsartig abgegeben.	Schildknecht et al., 1968, Schnepf et al., 1969 Eisner et al., 2000
Giftdrüsen	Komplex zusammengesetzte Stachelgifte von Bienen und Wespen; Ameisensäure bei Ameisen	Peters, 1999
Pheromondrüsen	Spur-, Alarm-, Sexualpheromone z.B. bei Ameisen; Dispersions- und Sexualpheromone bei Schaben	Hölldobler & Wilson, 1990 Faulde et al., 1990a,b; Gu et al., 2000
Speicheldrüsen	Verdauungsenzyme und Speichelflüssigkeit sowie andere, meist für die Nahrungsaufnahme wichtige Substanzen	House, 1980, Ribeiro, 1995
Spezialfall: Spinndrüsen	z.B. bei den Larven des Seidenspinners <i>Bombyx mori</i> Sekretion von Faserproteinen ⇒ Seide. Adult funktionieren die Drüsen als Speicheldrüsen.	Lehane, 1998
<b>Endokrine / Neurosekretorische Zellen (NSZ)</b>		
NSZ der Pars intercerebralis, Freisetzung: Corpora cardiaca	Diuretische und antidiuretische Hormone, welche den Wasserhaushalt regulieren	Coast, 1995 Eisenbeis & Wichard, 1999
Prothoraxdrüse	Häutungshormone: Ecdyson, Eclosionshormon	Gilbert et al., 2002
NSZ des Gehirns, Freisetzung: Corpora allata	Juvenilhormon (JH), Prothoracotropes Hormon (PTTH)	Gilbert et al., 2002
<b>Exkretionsorgane</b>		
Malpighische Gefäße	Harn	Coast, 1995; Beyenbach, 2001

## I.2 Fragestellungen dieser Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wurden die Speicheldrüsen der Schabe *Periplaneta americana* als Modellobjekt ausgewählt, um wichtige Teilmechanismen der Speichelsekretion aufzuklären. Chemische Analysen des Elektrolytgehalts im Endspeichel in Kombination mit pharmakologischen Experimenten, sollten die folgenden Fragen beantworten:

- (1) Welche Transporter sind an der Sekretion des Primärspeichels und an dessen Modifikation beteiligt?
- (2) Welche funktionelle Rolle spielen die transportaktiven Epithelzellen der Ausführgänge für die Modifikation des Primärspeichels?



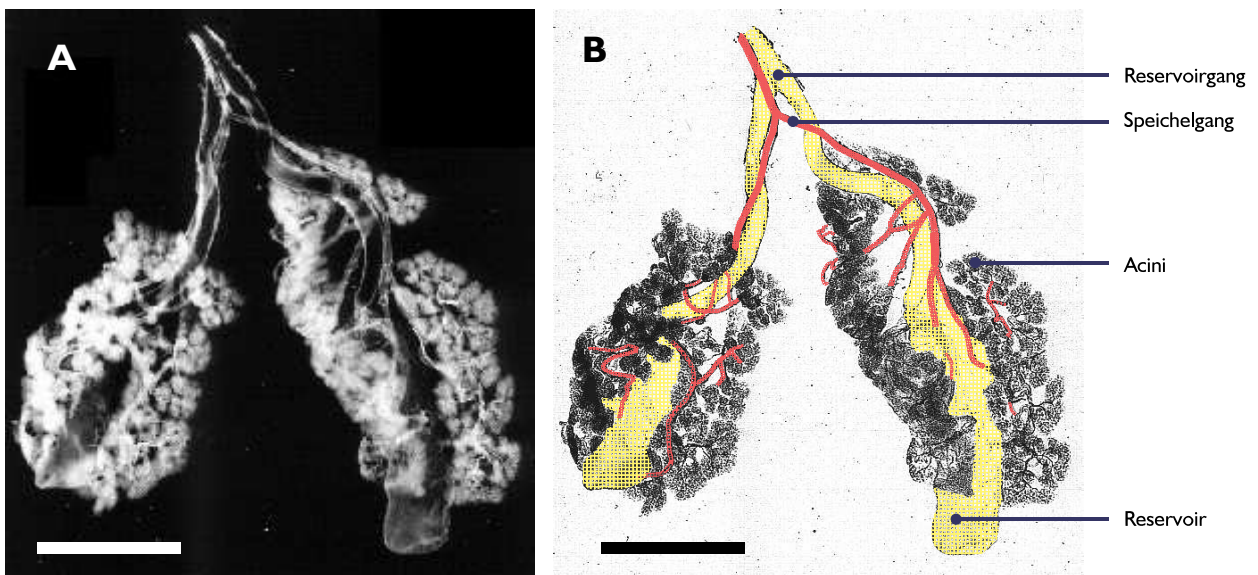
Mikrofluorometrische Messungen der Ionenkonzentrationen sollten zur Aufklärung der in den Acinzellen ablaufenden Mechanismen der Speichelbildung beitragen.

Da die Mechanismen, welche zwischen Stimulation und Proteinsekretion vermitteln, unbekannt sind, sollte die Proteinsekretion gemessen und in pharmakologischen Experimenten charakterisiert werden, welche intrazellulären Signalkaskaden an der Proteinsekretion beteiligt sind.

Warum für diese Untersuchungen die Speicheldrüse von *P. americana* als Modellobjekt ausgewählt wurde, wird nach der folgenden Beschreibung der mikroskopischen Anatomie, der Innervation und der bisher bekannten Mechanismen der Speichelsekretion unmittelbar verständlich werden.

### 1.3 Speicheldrüse von *Periplaneta americana*

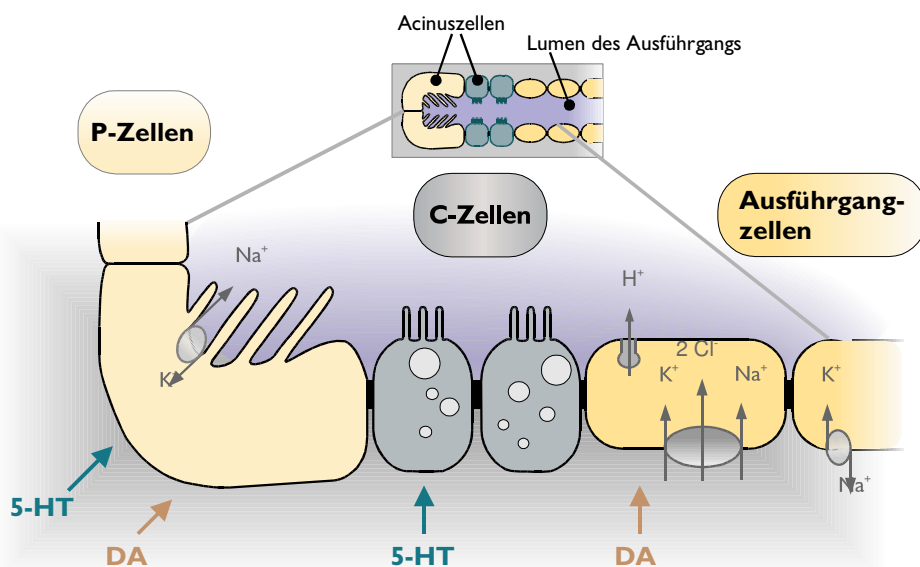
Schaben haben eine acinöse Speicheldrüse (Abb. 1), die im Thorax der Tiere liegt. Der Speichel wird in zahlreichen Acini, den traubenförmigen sekretorischen Endstücken der Drüse, gebildet und fließt über das Gangsystem aus. Ventral der Acini liegen zwei Reservoirs, deren Gänge gemeinsam mit dem Hauptspeichelgang zum Hypopharynx der Tiere ziehen. Die Reservoirs sind dopaminerg und serotonerg innerviert (Baumann et al., 2002); jedoch ist ihre Funktion nicht genau bekannt. Während der Nahrungsaufnahme werden sie geleert (Sutherland & Chillseyzn, 1968), so daß sie als Speichelspeicher dienen könnten, außerdem wurde eine Funktion als Wasserspeicher (Laird et al., 1972) oder als Exkretionsorgan (Raychaudhuri & Gosh, 1964) diskutiert.



**Abb. 1: Speicheldrüse von *Periplaneta americana*.** Dunkelfeldaufnahme (A) und bearbeitete Version des Bildes (B), zur besseren Darstellung einzelner Bereiche. Die acinöse Drüse besteht aus zwei Lappen, die beidseitig des Darms im Thorax des Tieres liegen. Sekretorisch aktiv sind die Acini, aus denen der Speichel über Gänge (rot eingezeichnet in B) ausfließt. Das zunächst verzweigte Gangsystem vereinigt sich zu zwei Speichelgängen, die zu einem unpaaren Hauptspeichelgang verschmelzen. Unter den Acini liegen die Reservoirs (gelb eingezeichnet in B), die in Reservoirgänge münden, mit dem Hauptspeichelgang verschmelzen und zusammen mit ihm zur Mundöffnung des Tieres ziehen.

Balken: 1mm

Die transportaktiven Zellen der Speicheldrüse sind in Abb. 2 schematisch dargestellt. Die peripheren Zellen (P-Zellen) haben starke basolaterale Einfaltungen, eine hohe Dichte an Mitochondrien sowie zahlreiche Mikrovilli, die sie als transportaktive Zellen auszeichnen (Just & Walz, 1994a). Die P-Zellen sind für die Flüssigkeitssekretion verantwortlich und produzieren bei Stimulierung einen wäßrigen, NaCl-reichen Speichel. Baumann et al. (2002) haben gezeigt, daß sie dopaminerg und serotonerg innerviert sind. Der zweite sekretorisch aktive Zelltyp der Acini sind die zentralen Zellen (C-Zellen), die ausschließlich serotonerg innerviert sind (Baumann et al., 2002). Sie sind dicht mit sekretorischen Vesikeln gefüllt, deren Inhalt bei Serotonin-Stimulierung (5-HT-Stimulierung) abgegeben wird (Just & Walz, 1996). Der dritte transportaktive Zelltyp der Drüse sind die Ausführungszellen. Sie sind über ihren gesamten Verlauf dopaminerg innerviert, nur in unmittelbarer Nähe der Acini auch serotonerg (Baumann et al., 2002). Als Funktion der Ausführungszellen wird die Modifikation des Primärspeichels angenommen (Gupta & Hall, 1983; Lang & Walz, 1999a, 2001), was durch morphologische, immunocytochemische und physiologische Daten belegt wird: die Ausführungszellen haben starke apikale und basolaterale Einfaltungen (Just & Walz 1994a), eine apikal lokalisierte V-H<sup>+</sup>-ATPase sowie eine basolaterale Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase (Just & Walz 1994b). Bei Dopamin-Stimulierung (DA-Stimulierung) kommt es in den Epithelzellen der Ausführungsgänge zu einer Depolarisation des basolateralen Membranpotentials, zu einem Anstieg der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>- und der Na<sup>+</sup>-Konzentrationen sowie zu einem Abfall der intrazellulären K<sup>+</sup>-Konzentration (Lang & Walz, 1999a, 2001). Die DA-stimulierten reziproken Änderungen der intrazellulären Na<sup>+</sup>- und K<sup>+</sup>-Konzentrationen werden durch einen basolateral lokalisierten Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup>-Cotransporter (NKCC) beeinflusst (Lang & Walz, 2001). Eine 5-HT-Stimulierung verändert weder das Membranpotential noch die Ionenkonzentrationen in den Ausführungszellen (Lang & Walz, 1999a).



**Abb. 2: Schematische Darstellung der transportaktiven Zelltypen in der Speicheldrüse von *P. americana* und der nachgewiesenen Transporter.** Die Acini werden von zwei sekretorisch aktiven Zelltypen gebildet: den peripheren Zellen (P-Zellen), die paarig an ihrer Basis liegen, und mehreren zentralen Zellen (C-Zellen). Die P-Zellen haben basolateral starke Einfaltungen und tragen apikal zahlreiche Mikrovilli. In der Apikalmembran ist eine Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase lokalisiert. Sie werden von DA und wahrscheinlich auch von 5-HT stimuliert. Die C-Zellen sind dicht mit sekretorischen Vesikeln gefüllt und werden durch 5-HT stimuliert. Die Ausführungszellen werden durch DA stimuliert. Sie besitzen in der Basolateralmembran einen Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup>-Cotransporter sowie eine Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase und in der Apikalmembran eine V-H<sup>+</sup>-ATPase. Basolateral haben sie zahlreiche Einfaltungen.

Beide biogene Amine, DA und 5-HT, aktivieren die Speichelsekretion, unterscheiden sich jedoch in ihren zellulären Wirkungen: DA stimuliert die P-Zellen und Ausführungszellen, aktiviert die Flüssigkeitssekretion und löst so die Bildung eines proteinfreien Speichels aus, während 5-HT die Flüssigkeitssekretion in den P-Zellen und die Proteinsekretion in den C-Zellen stimuliert und so die Bildung eines proteinhaltigen Speichels auslöst (Just & Walz, 1996). Die Ausführungszellen werden von 5-HT nicht stimuliert (Lang & Walz, 1999a, 2001).

In der Speicheldrüse von *P. americana* sind also die Elementarprozesse der Speichelbildung (Elektrolyt- und Flüssigkeitssekretion, Proteinsekretion und Modifikation des Primärspeichels) auf getrennte Zelltypen verteilt, die zudem noch zum Teil von unterschiedlichen Neurotransmittern aktiviert werden. Dieses Präparat ermöglicht es also (wenn auch mit Einschränkungen), die genannten Teilprozesse selektiv zu stimulieren und mit einer Vielzahl optischer, physiologischer und biochemischer Methoden zu untersuchen.

## **I.4 Nähere Beschreibung der untersuchten Themengebiete**

### **I.4.1 Elektrolyt- und Flüssigkeitssekretion**

Im ersten Teil der Arbeit habe ich die Elektrolyt- und Flüssigkeitssekretion in den Speicheldrüsen von *P. americana* untersucht. Gupta & Hall (1983) haben mit Hilfe der Elektronenstrahl-Röntgenmikroanalyse die Ionenkonzentrationen in den Zellen der Acini sowie in verschiedenen Abschnitten des Ausführungsgangs der Speicheldrüse von *P. americana* analysiert. Sie fanden einen isoosmotischen NaCl-reichen Primärspeichel, der während der Passage des Ausführungsgangsystems durch Na<sup>+</sup> und Cl<sup>-</sup>-Reabsorption modifiziert wird, wobei die Modifikation unerwarteterweise in den unstimulierten Ausführungsgängen stärker war, als in den stimulierten. Diese Befunde unterstützen die Hypothese, daß die Gangzellen den Primärspeichel modifizieren, möglicherweise durch Na<sup>+</sup>-Reabsorption und K<sup>+</sup>-Sekretion (Smith & House, 1979; Gupta & Hall, 1983; Lang & Walz, 2001).

Die Gültigkeit dieser Hypothese soll weiter überprüft werden. Hierzu habe ich den Elektrolytgehalt (Na<sup>+</sup>-, K<sup>+</sup>- und Cl<sup>-</sup>-Konzentration) des Endspeichels nach Stimulierung mit DA und 5-HT kapillarelektrophoretisch analysiert (CE-Analysen) und quantifiziert. Die CE ist eine sehr empfindliche analytische Methode, mit welcher Elektrolyte oder Proteine in kleinsten Probenvolumina (bis zum Sekret einzelner Zellen oder dem Inhalt einzelner sekretorischer Vesikel), analysiert und quantifiziert werden können (Chiu et al., 1998 ; Linhardt & Toida, 2002; Übersicht zur Methode in Tagliaro et al., (1998)).

Die Aktivität von Ionenkanälen und Transportern beeinflussen sowohl die Geschwindigkeit der Flüssigkeitssekretion als auch die Zusammensetzung des Sekrets (z. B. Linton & O'Donnell, 1999; Xu & Marshall, 1999; Hopkin et al., 2001 zur Funktion der Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase und / oder des NKCC in Malpighischen Gefäßen). Von den Transportern, die in der Speicheldrüse von *P. americana* nachgewiesen sind, wurde in der vorliegenden Arbeit die Bedeutung der Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase und des NKCC für die Elektrolyt- und Flüssigkeitssekretion untersucht. Neben den CE-Analysen des Endspeichels wurden hierzu auch die Geschwindigkeit der Flüssigkeitssekretion gemessen und analysiert.

#### I.4.2 Änderung intrazellulärer Ionenkonzentrationen in den Acinuszellen

Die Arbeit von Gupta & Hall (1983) gibt Aufschlüsse über die Änderungen der intrazellulären Ionenkonzentrationen nach DA-Stimulierung der Speicheldrüse von *P. americana*. In der zitierten Arbeit wurden mit Hilfe der Elektronenstrahl-Röntgenmikroanalyse jedoch nur die Änderungen nach einer 15 - 30 minütigen DA-Stimulierung analysiert, so daß keine Aussagen über den zeitlichen Verlauf der Änderungen während einer Stimulierung gemacht werden konnten.

In diesem Dissertationsprojekt sollen ebenfalls die Änderungen der intrazellulären  $\text{Na}^+$ -,  $\text{K}^+$ - und  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen in den sekretorisch aktiven Acinuszellen gemessen werden, jedoch mit mikrofluorometrischen Methoden. Hierbei stellte sich heraus, daß die Acinuszellen schlecht mit ionenempfindlichen Fluorochromen zu beladen sind und eine unerwartet hohe Autofluoreszenz zeigen, die sich außerdem noch reizabhängig ändern kann. Dieser methodische Ansatz erwies sich deshalb als problematisch. Ergebnisse meiner Pilotexperimente werden in dieser Arbeit beschrieben und kritisch diskutiert.

#### I.4.3 Proteinsekretion

Die Regulation der Proteinsekretion sekretorisch aktiver Insektengewebe, wie z.B. der Speicheldrüse, ist kaum untersucht. Ein Überblick über die wesentlichen Mechanismen der Exocytose sekretorischer Vesikel, sowie der Methoden, mit denen Exocytosevorgänge untersucht werden können, wird im Anhang (Kap. 8.3) gegeben. Von der Vielzahl möglicher Methoden werden in dieser Arbeit nur zwei Methoden angewandt: (1) die vitalmikroskopische Beobachtung der Exocytose ungefärbter Vesikel und (2) die biochemische Bestimmung des Proteingehalts im Endspeichel. Die erste Methode wurde von Terakawa et al. (1991) beschrieben. Dabei wird die Exocytose einzelner Vesikel mit Hilfe videoverstärkter differentieller Interferenzkontrast-Mikroskopie (DIK-Mikroskopie) während einer Stimulierung analysiert. Da sich die Brechungsindices des Vesikelinhalts und des Cytoplasmas unterscheiden, kommt es bei der Exocytose zur plötzlichen Änderung der Helligkeit des fusionierten Vesikels. Durch die Subtraktion sequentiell aufgenommener Bilder können im Präparat die Stellen sichtbar gemacht werden, an denen es zur Exocytose eines Vesikels kam. Die sekretorischen Vesikel in den C-Zellen sind groß genug, um im DIK-Verfahren gut abgebildet zu werden. Deshalb habe ich versucht, die 5-HT-stimulierte Proteinsekretion mit der beschriebenen Methode aufzunehmen und zu quantifizieren. Da die mit dieser Methode erzielten Ergebnisse entmutigend waren, wurde die Proteinsekretion letztendlich ausschließlich über die biochemische Bestimmung des Proteingehalts im Endspeichel charakterisiert.

## 2. Material & Methoden

### 2.1 Verwendete Substanzen und Lösungen

Der verwendete Ringer hat die folgende Zusammensetzung (in mM): 160 NaCl, 10 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub>, 10 Glukose und 10 TRIS. Sein pH-Wert wird mit HCl auf 7,4 eingestellt.

Angaben zu den Substanzen, die zur Stimulierung der Drüsen verwendet wurden, sind in Tab. 2 aufgelistet. Die Lösungen wurden direkt vor den Versuchen aus den Stammlösungen angesetzt.

**Tab. 2: Übersicht der zur Stimulierung eingesetzten Substanzen**

Substanz	Konzentration im Versuch	Konzentration der Stammlösung	Lösungsmittel (Stammlösung)	Lagerungstemperatur	Herkunft	Funktion
Dopamin (DA)	1 µM	10 mM	MQ H <sub>2</sub> O	- 20 °C	Sigma	Neurotransmitter
Serotonin (5-HT)	1 µM	10 mM	MQ H <sub>2</sub> O	- 20 °C	Sigma	Neurotransmitter
Ouabain	100 µM	10 mM	MQ H <sub>2</sub> O	- 20 °C	Sigma	Hemmstoff der Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -ATPase
Bumetanid	10 µM	10 mM	EtOH	- 20 °C	Alexis	Hemmstoff des NKCC
IBMX	100 µM	10 mM	EtOH	- 20 °C	Alexis	Hemmstoff von Phosphodiesterasen
Forskolin	100 µM	10 mM	EtOH	- 20 °C	Alexis	Aktivator der Adenylatcyclase
cAMP	10 mM	-	Ringer	- 20 °C	Serva	Botenstoff
db cAMP	1 - 10 mM	-	10 mM TRIS	- 20 °C	Serva	Membranpermeables cAMP-Analogon
Ionomycin	5 µM	10 mM	DMSO	- 20 °C	Alexis	Ca <sup>2+</sup> - Ionophor
db cGMP	1 mM	10 mM	Ringer	- 20 °C	Sigma	Membranpermeables cGMP-Analogon
Chelerythrin	1 / 10 µM	1 / 10 mM	MQ H <sub>2</sub> O	- 20 °C	Alexis	Hemmstoff der PKC
Bisindolylmaleimid I (GÖ 6850)	10 µM	10 mM	DMSO	- 20 °C	Alexis	Hemmstoff der PKC
Bisindolylmaleimid V	10 µM	10 mM	DMSO	- 20 °C	Alexis	Unwirksame Form von Bisindolylmaleimid
MDL 12,330 A (= RMI 12,330 A)	100 µM	10 mM	MQ H <sub>2</sub> O	- 20 °C	Alexis	Hemmstoff der Adenylatcyclase

Zum Ansetzen des Ringers und der Eichlösungen für die kapillarelektrophoretischen Analysen wurden Salze (p.A.) unterschiedlicher Herkunft verwendet. Weitere Substanzen sind in Tab. 3 aufgelistet.

**Tab. 3: Übersicht weiterer in den Versuchen verwendeter Substanzen**

Substanz	Konzentration im Versuch	Konzentration der Stammlösung	Lösungsmittel (Stammlösung)	Lagerungstemperatur	Herkunft	Funktion
Pronase		1 mg/ml	Ringer	- 20 °C	Sigma	Enzym, Isolation von Zellen
Elastase		5 mg/ml	Ringer	- 20 °C	Sigma	Enzym, Isolation von Zellen
Collagenase		5 mg/ml	Ringer	- 20 °C	Sigma	Enzym, Isolation von Zellen
Fura-2 AM	5 µM	1 mM	DMSO	-20 °C	Molecular Probes / Biotium	Ca <sup>2+</sup> -empfindlicher Fluoreszenzfarbstoff
MnCl <sub>2</sub>	20 mM	1 M	H <sub>2</sub> O	- 20°C	Sigma	Unterdrücken der Fura-2 Fluoreszenz
α-HIBA					Waters	Kationenpuffer CE
18-Kronen-6-Ether					Aldrich	Kationenpuffer CE, Chiraler Kronenether
UV Cat-I Reagenz					Waters	Kationenpuffer CE
Natriumchromat					Aldrich	Anionenpuffer CE
OFM-Anion-BT					Waters	Anionenpuffer CE
Cell-Tak	3 µl pro Objektträger (1,05 mg/ml)				Becton & Dickinson	Festkleben der Drüsenläppchen auf einem Objektträger

Eine Liste der Händler, von denen die Substanzen bezogen wurden, befindet sich im Anhang (Kap. 8.1).

## **2.2 Präparation der Speicheldrüsen**

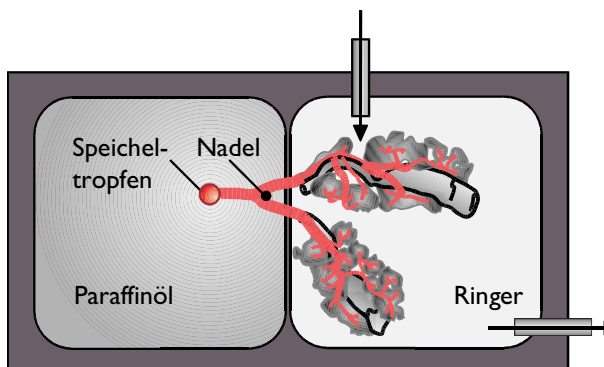
*Periplaneta americana* (L.) (Blattodea, Blattidae) wird bei 27°C in einem Licht-Dunkelrhythmus von 12h:12h gehalten. Die Tiere haben freien Zugang zu Futter (Ratten- und Mäusepellets (Ssniff) sowie Äpfel für die Nymphen) und Wasser. Für die Versuche werden nur männliche Imagines in einem Alter zwischen einer und zwölf Wochen verwendet.

Für die Entnahme der Speicheldrüsen werden die Tiere durch Dekapitation getötet, Flügel und Beine entfernt und der Körper in einer mit Sylgard (Drawin) ausgegossenen und mit Ringer gefüllten Petrischale festgesteckt. Der Körper wird dorsal mit einem Medianschnitt geöffnet. Der vorderste Teil des Darmes und die Speicheldrüse werden mit einer gebogenen Pinzette umfaßt und nach posterior aus dem Tier herausgezogen. Anschließend wird der Darm hinter der Drüse mit der Pinzette umfaßt und die Pinzette vorsichtig zum Vorderende des Darms bewegt, so daß die Drüse in Richtung Vorderende des Darms gezogen wird. Die dabei sichtbaren Fasern zwischen Speicheldrüse und Darm werden mit einer Augenschere durchtrennt, und die Drüse wird vollständig vom Darm entfernt.

## 2.3 Sammlung von Speichelproben und Messungen der Sekretionsrate

### 2.3.1 Präparation des Gewebes, Versuchsaufbau und Volumenbestimmung

Die Reservoirgänge der frei im Ringer liegenden Drüse werden gekappt und von den Speichelgängen entfernt. Anschließend wird die Drüse in ein mit Sylgard ausgegossenes und mit Ringer gefülltes Plexiglaswännchen (s. Abb. 3) gehoben, der Ausführgang über einen Steg in eine mit flüssigem Paraffinöl gefüllte Kammer gezogen und dort mit einer Insektennadel festgesteckt. Anschließend wird die Drüse mit oxygeniertem Ringer überspült. Die Messungen beginnen erst, nachdem die bei einigen Drüsen stattfindende spontane Sekretion aufhört. Die Durchflußgeschwindigkeit der Lösungen beträgt 2 ml/Min. Einmal pro Minute werden die Speicheltropfen mit einer an einem flexiblen Schlauch befestigten Gel-Ladespitze (Roth) vom offenen Ende des Speichelgangs abgesammelt. Die Präparation der für die Sekretionsmessungen verwendeten Speicheldrüsen findet in oxygeniertem Ringer statt.

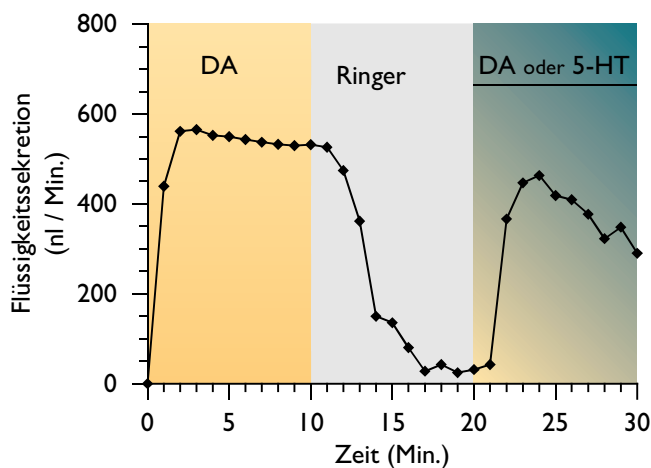


**Abb. 3: Schematische Darstellung des für die Sekretionsmessungen verwendeten Aufbaus.** Die Speicheldrüse wird in die rechte Kammer des Plexiglaswännchens gelegt. Diese wird ständig mit oxygeniertem Ringer durchspült. Der von den Reservoirgängen getrennte Ausführgang (rot dargestellt) wird über einen Steg in die linke Kammer gezogen und dort festgesteckt. Die linke Kammer ist mit Paraffinöl gefüllt, in welchem die bei Stimulierung der Drüse gebildeten Speicheltropfen gut zu erkennen sind.

Die abgesammelten Speicheltropfen werden einzeln in ein zweites paraffinölgefülltes Wännchen umgesetzt. Die ellipsoiden Tropfen werden mit einer CCD-Kamera (Hamamatsu) abgebildet, die an ein LEICA MZAPO Stereomikroskop und ein Argus-10 Bildverarbeitungssystem (Hamamatsu) angeschlossen ist. Der Längs- und Querdurchmesser ( $a$ ,  $b$ ) der Tropfen wird gemessen und daraus das Volumen ( $V$ ) des Speicheltropfens nach der Formel  $V=4/3\pi ab^2$  berechnet.

### 2.3.2 Versuchsablauf und Auswertung

Abb. 4 illustriert am Beispiel einer Originalmessung den zeitlichen Ablauf der Stimulierung für die Messung der Sekretionsraten. Die Drüsen werden zunächst 10 Minuten lang mit  $1 \mu\text{M}$  DA stimuliert. Anschließend wird das DA mit Ringer ausgewaschen und gewartet, bis die Flüssigkeitssekretion endet. In einer zweiten Stimulierungsperiode, die ebenfalls 10 Minuten dauert, wird mit  $1 \mu\text{M}$  DA oder 5-HT stimuliert. Sollte die Wirkung eines Hemmstoffs getestet werden, so wird dieser bereits zwei Minuten vor der zweiten Stimulierung appliziert und anschließend während 10 Minuten mit DA oder 5-HT in Anwesenheit des Hemmstoffs stimuliert. Einmal pro Minute wird ein Speicheltropfen abgesammelt und, wie beschrieben, sein Volumen bestimmt.



**Abb. 4: Zeitlicher Ablauf der Stimulierung für die Messung der Sekretionsraten.** Dargestellt sind die Sekretionsraten einer Drüse in nl/Min. In den ersten zehn Minuten wird die Drüse mit  $1 \mu\text{M}$  DA stimuliert. Zwischen der ersten und zweiten Stimulierung wird das DA mit Ringer ausgewaschen. Die zweite Stimulierung dient als Teststimulierung: während dieser Periode wird mit DA oder 5-HT stimuliert. Die Periode der Teststimulierung ist mit einem waagerechten Strich gekennzeichnet, im abgebildeten Experiment erfolgt sie mit  $1 \mu\text{M}$  5-HT. Eine nähere Erläuterung des Versuchsprotokolls erfolgt im Text.

Abb. 4 zeigt, daß die Sekretionsrate in den ersten zwei Minuten nach Beginn der Stimulierung steigt. Deswegen werden diese Meßwerte nicht zur Ermittlung der Sekretionsrate herangezogen. Zur Bestimmung der "mittleren Sekretionsrate" werden die Meßwerte zwischen Minute drei bis zehn gemittelt. Speicheldrüsen aus verschiedenen Tieren zeigen sehr variable absolute Sekretionsraten. Deshalb werden die Sekretionsraten der zweiten Stimulierungsperiode auf diejenigen der ersten Stimulierung am gleichen Präparat normalisiert. Sekretionsraten, die in An- und Abwesenheit eines Hemmstoffs gemessen werden, können durch Vergleich der normalisierten Sekretionsraten während der zweiten Stimulierungsperiode beurteilt werden. Die verwendeten statistischen Tests sind in Kapitel 2.7 sowie im Ergebnisteil aufgeführt.

## 2.4 Messungen des Elektrolytgehalts im Speichel

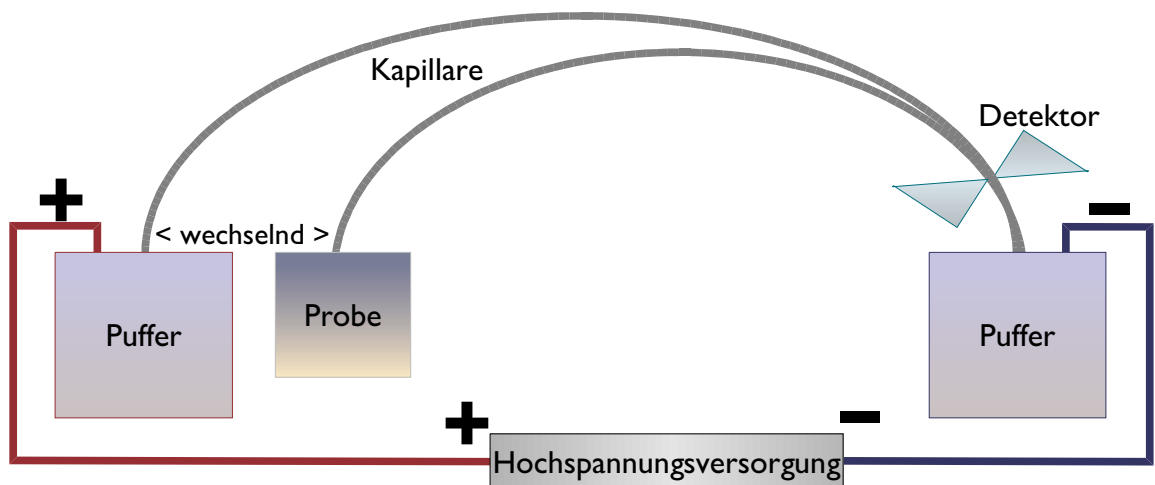
### 2.4.1 Präparation des Gewebes, Versuchsaufbau und Meßprinzip

Die Drüsen werden, wie unter 2.3.1 beschrieben, präpariert und stimuliert. Allerdings werden drei Speicheldrüsen direkt nacheinander präpariert, zusammen in ein Wännchen eingespannt und simultan stimuliert. Speicheltropfen werden alle 5 Minuten abgesammelt und ihr Volumen bestimmt. Bis zur späteren Analyse werden die vermessenen Speicheltropfen in ein Eppendorf Reaktionsgefäß übertragen und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  in Paraffinöl aufbewahrt.

Der Elektrolytgehalt im Speichel wird mit einer kapillarelektrophoretischen Analyse (CE-Analyse) bestimmt. Diese ermöglicht die gleichzeitige qualitative und quantitative Messung verschiedener Ionen in sehr kleinen Probenvolumina (z.B.  $\sim 1 \mu\text{l}$  Speichel). Abb. 5 illustriert schematisch den Aufbau einer CE. Für die Detektion der Ionen wird die Probe in eine Kapillare injiziert, an welche an-



schließlich ein elektrisches Feld angelegt wird. Die Ionen bewegen sich mit unterschiedlicher Geschwindigkeit durch dieses elektrische Feld und werden deshalb während der Passage der Kapillare aufgetrennt.



**Abb. 5: Schematischer Aufbau einer CE.** Zur Injektion der Probe wird das linke Ende der Kapillare in die verdünnte Probe getaucht, während des CE-Laufs befinden sich beide Enden der Kapillare im Puffer. Die Auftrennung der in der Probe enthaltenen Ionen findet während der Passage der Kapillare statt. Nähere Details befinden sich im Text.

Die Geschwindigkeit einzelner Ionen hängt vor allem von ihrem effektiven Durchmesser, inklusive ihrer Hydrathülle, und der Zusammensetzung des verwendeten Puffers ab. Die Detektion der Ionen erfolgt durch Messung der UV-Absorption am Ende der Kapillare. Dem Puffer werden UV-Licht absorbierende Substanzen zugesetzt, die von den Ionen verdrängt werden. Fließt eine Bande von Ionen am Detektor vorbei, so mißt dieser eine geringere UV-Absorption. Die genauen Parameter des verwendeten CE-Systems sind in Kapitel 2.4.1.1 beschrieben. Weitere Informationen befinden sich in Ziegler & Scholz (1997) sowie Grospietsch et al. (2000).

#### **2.4.1.1 Probenaufbereitung für die kapillarelektrophoretische Analyse**

Die CE-Analysen werden mit verdünnten Speichelproben durchgeführt. Die Speichelproben werden in ein zweites Reaktionsgefäß überführt, in dem sich ca. 100 µl zuvor auf einer Präzisionswaage (Satorius) eingewogenes MQ H<sub>2</sub>O befinden. Diese Stammlösungen werden bei 14000 g durch Filter (Micron YM-30, Millipore) zentrifugiert, um alle Komponenten mit einem Molekulargewicht von > 30 kDa zu entfernen. Bei Speichelvolumina unter 0,5 µl werden die Stammlösungen vor der Analyse nicht weiter verdünnt. Stammlösungen, die mehr als 0,5 µl Speichel enthalten, werden vor der Analyse 1:200 und 1:500 mit MQ H<sub>2</sub>O verdünnt. Alle Proben werden bis zu den CE-Analysen bei - 80 °C aufbewahrt.

### 2.4.1.2 Bestimmungen des Elektrolytgehalts

Für die CE-Analysen wird ein Quanta 4000 Elektrophorese System (Millipore / Waters) benutzt. Die verwendeten Kapillaren bestehen aus Quarz- / Kieselglas mit einer Polyimid-Beschichtung (Länge 60 cm, Innendurchmesser 75 µM, Grom). Die Proben werden 10 Sekunden lang hydrostatisch in die Kapillare injiziert. Tabelle 4 faßt die unterschiedlichen Meßparameter für Kationen- und Anionenanalysen zusammen.

**Tabelle 4: Meßparameter für die kapillarelektrophoretische Kationen- und Anionenanalyse**

	<b>Kationen</b>	<b>Anionen</b>
Messung (quantitativ)	Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup>	Cl <sup>-</sup>
Messung (qualitativ)	Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup>	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
Angelegte Spannung	20 kV	15 kV
Messung der UV-Absorption bei	214 nm	254 nm
Verwendete Lampe	Quecksilberdampflampe	Zinkdampflampe
Spülen der Kapillare mit	~ 1 N HCl (30 Min.) MQ H <sub>2</sub> O (5 Min.) Kationenpuffer (10 Min.)	1 N NaOH (30 Min.) MQ H <sub>2</sub> O (5 Min.) Anionenpuffer (10 Min.)
Laufzeit	5 Min.	5 / 8 Min.

Die beiden verschiedenen Laufzeiten von 5 oder 8 Minuten für die Anionenanalysen werden für Speichelproben verwendet, die mit unterschiedlichen Sekretionsraten sezerniert wurden.

Kontrollmessungen zeigen, daß die Fläche des Cl<sup>-</sup>-Signals den größten Anteil der gesamten Signalfläche aller Anionen hat, wenn die Proben mit einer Sekretionsrate von > 160 nl/Min. gebildet werden. Das Cl<sup>-</sup>-Signal wird immer innerhalb der ersten fünf Minuten des CE-Laufs gemessen. Deshalb beträgt die Laufzeit für Proben, die mit einer Sekretionsrate von > 160 nl/Min. sezerniert wurden, nur fünf Minuten. Wurden die Proben mit einer geringeren Sekretionsrate gebildet, so haben andere Anionen als Cl<sup>-</sup> einen relativ größeren Anteil an der gesamten Fläche des Anionensignals. Um auch die anderen Anionen zu detektieren, beträgt die Laufzeit dieser Proben acht Minuten. Da nur die Cl<sup>-</sup>-Konzentration quantifiziert wird, konnte die Summe der Konzentration aller Anionen in diesen Proben nicht zuverlässig bestimmt werden. Deshalb werden in diesen Proben auch größere scheinbare Anionendefizite akzeptiert. Aufgrund der ungenaueren Bestimmung der Anionenkonzentrationen wird die Osmolarität aller Proben als (Na<sup>+</sup>-Konzentration + K<sup>+</sup>-Konzentration) \* 2 berechnet.

Die Pufferzusammensetzung bestimmt, welche Ionen in einer CE-Analyse nachgewiesen werden können. Für die Kationenanalysen enthält der Puffer 0,0628 g α-HIBA (Waters), 0,0528 g 18-Kronen-6-Ether (Aldrich), 64 µl UV-Cat-I Reagenz (Waters), gelöst in 100 ml MQ H<sub>2</sub>O. Für die Anionenanalysen wird ein Chromatpuffer benutzt. Dieser enthält 20 mM Natriumchromat (Aldrich) und 2,5 ml (OFM)-Anion-BT (Waters), gelöst in 100 ml MQ H<sub>2</sub>O. Der pH-Wert wird mit 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> auf 7,7 eingestellt.

An jedem Meßtag wird die CE geeicht, wobei für Kationen- und Anionenanalysen verschiedene Eichlösungen genutzt werden. In Lösungen mit hohen Natriumkonzentrationen (über 1 mM) werden die  $\text{Na}^+$ -,  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -Signale nicht mehr gut getrennt. Deshalb enthält die am höchsten konzentrierte Eichlösung nur 1 mM  $\text{NaHCO}_3$  und 0,5 mM KCl. Die niedriger konzentrierten Eichlösungen werden aus einer Stammlösung mit folgender Zusammensetzung hergestellt: 1 mM  $\text{NaHCO}_3$ ; 0,5 mM KCl; 0,25 mM  $\text{CaCl}_2$  und 0,25 mM  $\text{MgCl}_2$ , die in MQ  $\text{H}_2\text{O}$  1:2,5, 1:5, 1:10 und 1:20 verdünnt werden. Die Stammlösung für die Anionenanalysen enthält 0,5 mM  $\text{NaHCO}_3$  und 1 mM KCl und wird, wie für die Kationenanalysen beschrieben, verdünnt. Zur Kalibrierung wird eine lineare Regression durch die gemessenen Absorptionswerte der Eichlösung berechnet und bei einem Korrelationskoeffizienten  $R^2 > 0,99$  für die Quantifizierung der Ionenkonzentrationen benutzt.

González et al. (1996) haben gezeigt, daß Bumetanid über das Nierenepithel in den Urin transportiert werden kann. Bumetanid kann in der CE bei 220 nm nachgewiesen werden (Riekkola & Jumpsanen, 1996). Um sicherzustellen, daß kein Bumetanid in den Speichelproben vorhanden ist und die Ergebnisse nicht durch Bumetanid-Signale verfälscht werden, werden Kontrollexperimente ( $n=3$ ) durchgeführt: Zu den Standard-Kalibrierungslösungen wird 10  $\mu\text{M}$  Bumetanid hinzugefügt und die Ionenkonzentrationen in der CE gemessen. Es wird kein Bumetanid-Signal registriert, und die gemessenen Ionenkonzentrationen werden durch die Anwesenheit von Bumetanid nicht beeinflusst.

#### **2.4.2 Versuchsablauf und Auswertung**

Die Drüsen werden wie unter 2.3.2 beschrieben stimuliert (Abb. 4). Die Probennahme findet zu folgenden Zeitpunkten statt: (1) zwischen Minute 5 -10 der ersten DA-Stimulierung: Kontrolle (Probe #1), (2) zwischen Minute 0 - 5 der zweiten Stimulierungsperiode (Probe #2) und (3) zwischen Minute 5 - 10 der zweiten Stimulierungsperiode (Probe #3). Der in den ersten fünf Minuten der ersten DA-Stimulierung gebildete Speichel wird verworfen, da er auch den noch vor Stimulierungsbeginn in den Ausführgängen befindlichen Speichel enthält.

Das Volumen der Proben wird wie unter 2.3 beschrieben ermittelt. Für die Auswertung werden die Ionenkonzentrationen in Probe #3 mit denen in Probe #1 verglichen. Die verwendeten statistischen Tests sind in Kapitel 2.7 sowie im Ergebnisteil zu finden. Nach Hemmung des NKCC sind die Sekretionsraten sehr niedrig, so daß während der zweiten Stimulierungsperiode nur eine Speichelprobe gesammelt werden kann. Deshalb mußte der statistische Vergleich der Ionenkonzentrationen wie in Kapitel 2.3.2 für die Flüssigkeitssekretion durchgeführt werden.

### **2.5 Mikrofluorometrische $\text{Ca}^{2+}$ -Messungen in den Acinuszellen**

#### **2.5.1 Präparation des Gewebes, Versuchsaufbau und Meßprinzip**

Die Änderungen der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in den Acinuszellen werden mikrofluorometrisch mit dem Verfahren des "ratiometric imaging" gemessen. Dafür wird ein ionenempfindlicher Fluoreszenzfarbstoff in die Zellen geladen, in den durchgeführten Messungen der  $\text{Ca}^{2+}$ -emp-

findliche Farbstoff Fura-2 AM. Die Fluoreszenz des  $\text{Ca}^{2+}$ -empfindlichen Indikators wird bei zwei Wellenlängen angeregt (340 und 380 nm), seine Emission wird in einem längerwelligen Bereich gemessen. Bindet Fura-2  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, so verschiebt sich sein Absorptionsmaximum von 380 nm zu 340 nm. Dadurch steigt das bei einer Anregung mit 340 nm gemessene Fluoreszenzsignal bei einer Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  an, während das bei 380 nm angeregte Signal sinkt. Für die Messung wird der Farbstoff deshalb in sehr schneller zeitlicher Folge bei 340 und 380 nm angeregt. Die Intensität des bei beiden Anregungswellenlängen emittierten Lichts wird gemessen, und für die Auswertung wird das Verhältnis (die "Ratio") der gemessenen Emissionen gebildet, als Intensität (Rohsignal) bei 340 nm / Intensität (Rohsignal) bei 380 nm. Diese Form der Auswertung reduziert Artefakte, die z.B. durch die Bleichung des Farbstoffs oder Änderungen der Farbstoffkonzentration in der Zelle hervorgerufen werden. Da viele Zellen bei den genannten Wellenlängen eine starke Autofluoreszenz zeigen, sollte diese in der vorliegenden Arbeit ebenfalls charakterisiert werden.

Fura-2 AM ist hydrophob verestert und membrangängig. Die isolierten Drüsen werden bei leichtem Schütteln im Dunkeln 25 bis 30 Minuten in 5  $\mu\text{M}$  Fura-2 AM inkubiert und anschließend in Rin-ger gewaschen. Kontrollmessungen der Autofluoreszenz finden an unbeladenen Drüsen statt.

Zur Messung werden von den Drüsen kleine Lämpchen abgeschnitten und auf dem Boden eines mit 3  $\mu\text{l}$  Cell-Tak (Becton & Dickinson) beschichteten Wännchens festgeklebt. Zur Präparation und Stimulierung werden nicht oxygenierte Lösungen verwendet. Während der Versuche werden die Lösungen mit einer Geschwindigkeit von 1 ml/Min. über das Präparat geleitet.

Die Messungen erfolgen an einem Zeiss Axiovert 135TV Mikroskop (Objektiv: Neofluar 20, n.A. 0,75). Für die Messungen mit Fura-2 wird ein 450 nm Strahlteiler und ein 515-565 nm Bandpass Emissionsfilter verwendet. Für die Messung der Autofluoreszenz nach Anregung mit 340 und 475 nm wird ein 580 nm Strahlteiler und ein 590 nm Langpass Emissionsfilter verwendet. Als Lichtquelle dient eine 75 W Xenon-Kurzbogenlampe (Ushio), die sich in einem VisiChrome High-Speed Polychromatorsystem (VisiTron Systems) befindet. Dieses Polychromatorsystem erzeugt monochromes Licht, das über eine Quarzfaser in das Mikroskop eingekoppelt wird. Zur Abbildung dient eine gekühlte digitale CCD-Kamera (Modell TEA/CCD-512, Princeton Instruments). Es werden bei jeder Anregungswellenlänge zwei bis fünf Bilder pro Sekunde mit einer Farbtiefe von 12 bit aufgenommen. Jeweils vier Bildpunkte werden zusammengefaßt (2x2 "binning" ), so daß die erzeugten Bilder 256x256 Bildpunkte haben. Die Steuerung des Polychromatorsystems, der Bildaufnahme und -bearbeitung wird mit dem Computerprogramm MetaFluor (Version 4.6r7, Meta Imaging Series 4.6, Universal Imaging) auf einem PC (VisiTron Systems) durchgeführt. Zur Dokumentation werden vor Beginn und am Ende der Versuche Mikroaufnahmen der Präparate ohne "binning" aufgenommen. Dazu wird das Computerprogramm MetaMorph verwendet.

### **2.5.2 Versuchsablauf und Auswertung**

Neben den Messungen mit dem  $\text{Ca}^{2+}$ -empfindlichen Farbstoff Fura-2 wird untersucht, ob es während einer Stimulierung zu Änderungen der Autofluoreszenz der Drüsen kommt. Der zeitliche Ablauf der Stimulierungen für die verschiedenen Experimente ist in Tab. 5 beschrieben. Der Begriff Experiment wird im folgenden immer für eine Gruppe gleichartiger Versuche, z. B. Fura-2 Messungen mit dem gleichen Ablauf der Stimulierung, angewendet.

**Tab. 5: Zeitlicher Ablauf der Stimulierungen für die mikrofluorometrische Messung der Ca<sup>2+</sup>-Änderungen und der Änderungen der Autofluoreszenz**

Protokoll für die Messung der	Stimulierung 1	Pause	Stimulierung 2	Anregungslicht	Belichtungszeit
<b>Fura-2 Fluoreszenz</b>					
DA-stimulierte Änderungen der intrazellulären Ca <sup>2+</sup> -Konzentration	DA 1 µM 5 Min.	Ringer 10 Min.	Ionomycin ~ 20 µM MnCl <sub>2</sub> 20 mM	340 & 380 nm	100 ms
<b>Autofluoreszenz</b>					
DA- und 5-HT-stimulierte Änderungen unter Fura-Bedingungen	DA 1 µM 5 Min.	Ringer 5 Min.	5-HT 1 µM 5 Min.	340 & 380 nm	200 ms
DA-stimulierte Änderungen unter Fura-Bedingungen	DA 1 µM 5 Min.			340 & 380 nm	100 ms
DA- und 5-HT-stimulierte Änderungen der NAD(P)H- und Flavoprotein-Fluoreszenz	DA 1 µM 10 Min.	Ringer 10 Min.	5-HT 1 µM 10 Min.	340 & 475 nm	200 ms

Das MnCl<sub>2</sub>, welches am Ende der Fura-Messungen appliziert wird, dient zum "quenchen", also zum Unterdrücken der Fura-2 Fluoreszenz. Die bei beiden Anregungswellenlängen aufgenommenen Rohsignale sinken in Anwesenheit von MnCl<sub>2</sub> auf den Wert, der durch die zelluläre Autofluoreszenz hervorgerufen wird. Damit diese Hintergrundfluoreszenz die Meßergebnisse nicht beeinträchtigt, wird sie vor der Auswertung von allen zuvor aufgenommenen Bildern abgezogen. Die in der Arbeit angegebenen Werte für die "Ratio" stellen also die reine Fura-2 "Ratio" dar. Auf eine absolute Quantifizierung der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration nach dem Grynkiewicz-Formalismus (Grynkiewicz et al., 1985) wird verzichtet. In allen Graphen wird nur die "Ratio" als relatives Maß für die Ca<sup>2+</sup>-Konzentration angegeben.

Für die Ca<sup>2+</sup>-Messungen werden die Drüsen mit dem AM-Ester von Fura-2 beladen. Als Kontrolle, wieviel Zeit bis zur Abspaltung der Acetoxymethylgruppe vergeht, wird die Fluoreszenz einer beladenen, unstimulierten Drüse einmal pro Minute über einen Zeitraum von 45 Minuten gemessen. Dabei wird kein Anstieg der Fluoreszenz mit der Zeit registriert.

Zur Auswertung wird die Änderung der Fluoreszenz in jeweils 10x10 Bildpunkte großen Bereichen ("regions of interest", ROI) gemessen. In jedem Präparat wird jeweils ein Bereich über einem Acinus sowie über einem Gang ausgewertet. Es wird außerdem getestet, ob die starke Fluoreszenz der Ausführungsgänge bei Messungen über benachbarten Regionen registrierbar ist.

Zu verschiedenen Zeitpunkten wird für die Auswertung jeweils die mittlere Fluoreszenz der Bereiche berechnet. Dafür wird der Mittelwert der über einen Zeitraum von 15 Sekunden gemessenen Fluoreszenz gebildet. Dieses geschieht an folgenden Zeitpunkten: (1) direkt vor Beginn der DA-Stimulierung, (2) während des Maximums der DA-Stimulierung, (3) am Ende der DA-Stimulierung. Sofern eine zweite Stimulierung mit 5-HT stattfindet, werden außerdem die Werte der folgenden Zeitpunkte berechnet: (4) während des Minimums in der Auswaschphase, (5) direkt vor Beginn der 5-HT-Stimulierung, (6) während des Maximums der 5-HT-Stimulierung und (6) am Ende der 5-HT-Stimulierung. Aufgrund der Streuung der absoluten Meßwerte werden die Werte auf die Fluoreszenz der gleichen Drüse vor Beginn der Stimulierungen (Zeitpunkt (1)) normalisiert.

## **2.6 Messungen der Proteinsekretion**

Die 5-HT-stimulierte Proteinsekretion der C-Zellen soll mit zwei Methoden charakterisiert werden: einer vitalmikroskopischen Analyse der Exocytose einzelner Vesikel sowie einer biochemischen Bestimmung des Proteingehalts im Endspeichel.

### **2.6.1 Vitalmikroskopische Analysen der Proteinsekretion**

#### **2.6.1.1 Präparation der Drüsen, Versuchsaufbau und Meßprinzip**

Die Sekretion proteinhaltiger Vesikel aus den C-Zellen soll mit videoverstärkter DIK-Mikroskopie sowohl an isolierten Zellen als auch an Drüsenläppchen analysiert werden. Die Präparation der Speicheldrüsen erfolgt zunächst wie in Kapitel 2.2 beschrieben. Für die Beobachtung an Drüsenläppchen wird ein kleines Lämpchen auf dem Boden eines mit 3 µl Cell-Tak beschichteten Wännchens festgeklebt. Für die Beobachtung an isolierten Zellen wird die Drüse durch eine enzymatische Verdauung dissoziiert. Dafür werden die Reservoirs und Gänge der Speicheldrüsen weitgehend entfernt und die Drüse in ein mit 500 µl Pronase-Lösung gefülltes Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Während der 30-minütigen enzymatischen Verdauung wird Sauerstoff auf die Oberfläche der Lösung geleitet. Anschließend wird die Drüse mit einer Pinzette in ein mit ca. 1200 µl Ringer gefülltes Reaktionsgefäß gegeben. Der Ringer wird zur Entfernung von Pronase-Resten 3 x gewechselt. Nach dem letzten Wechsel bleibt die Drüse in 300 - 500 µl Ringer liegen und wird (1) durch kräftiges Schütteln des Reaktionsgefäßes oder (2) durch mehrfaches Einsaugen in eine Glas-Pasteurpipette (Spitzenlänge ca. 14 cm), deren Vorderrand über einem Gasbrenner abgerundet wurde, dissoziiert.

Nach 1-2 Minuten werden mit einer Glas-Pasteurpipette ca. 200 - 500 µl der Zellsuspension aus dem unteren Bereich des Reaktionsgefäßes entnommen und in ein mit Cell-Tak beschichtetes Wännchen gegeben. Dieses wird mit Ringer aufgefüllt und unter dem Mikroskop fixiert. Damit die Zellen am Boden des Wännchens fest haften, wird der Ringerdurchfluß erst nach 1-2 Minuten gestartet.

Alternativ werden auch die Enzyme Elastase und Collagenase zur Dissoziation der Zellen getestet. Aufgrund der höheren Konzentration dieser Enzymlösungen werden die Drüsen nur 20 Minuten inkubiert.

Das Wännchen mit den Drüsenläppchen oder den isolierten Zellen wird in ein Zeiss UEM/UMSP-Mikroskop eingespannt (Objektiv: Leitz Fluor 50 W, n.A. 1,0). Die Beleuchtung erfolgt mit einer Halogenlampe (12 V, 100 W). Bilder der Zellen werden mit einer CCD-Kamera (Typ C2400-77, Hamamatsu) und einem Argus-10 Bildverarbeitungssystem aufgenommen. Diese Bilder werden mit der Software MetaMorph (Version 4.6r7, Meta Imaging Series 4.6, Universal Imaging) auf einem PC gespeichert. Es werden jeweils 4 Bilder pro Minute aufgezeichnet.

### **2.6.1.2 Versuchsablauf und Auswertung**

Die Zellen werden in den verschiedenen Experimenten wie folgt stimuliert:

- (1) nur mit oxygeniertem Ringer. Bilder werden über einen Zeitraum von 10 - 45 Minuten aufgenommen. Dieses Experiment dient der Kontrolle, ob es auch ohne eine Stimulierung zur Degranulation sekretorischer Vesikel kommt.
- (2) mit  $1 \mu\text{M}$  5-HT. Die Bilder werden über einen Zeitraum von 10 - 90 Minuten aufgenommen.

Für die Auswertung erfolgt eine Subtraktion jeweils nacheinander aufgenommener Bildpaare mit der Software Photo Graphics Pro (Version 2.02; True Spectra Inc., 1993-1997). Die Differenzbilder werden auf Bereiche kontrolliert, an denen sich die Helligkeit deutlich von derjenigen der Umgebung unterscheidet. Bei diesen Stellen wird durch Vergleich der Einzelbilder untersucht, ob die Helligkeitsänderung durch Bewegungs-Artefakte oder die Exocytose eines Vesikels ausgelöst wird.

Zusätzlich werden zwei Kontrollversuche durchgeführt, welche das Ausmaß der Degranulation während einer 45-minütigen 5-HT-Stimulierung zeigen sollen. In der ersten Kontrolle wird die Drüse in dem für die Sekretionsmessungen verwendeten Aufbau 45 Minuten lang mit  $1 \mu\text{M}$  5-HT stimuliert. Anschließend werden einzelne Drüsenläppchen abgeschnitten und die C-Zellen mikroskopisch analysiert. In der zweiten Kontrolle wird jeweils einer der beiden Drüsenlappen 45 Minuten lang in oxygeniertem Ringer, der andere in oxygeniertes  $1 \mu\text{M}$  5-HT gelegt. Anschließend werden Lämpchen der beiden unterschiedlich stimulierten Drüsenlappen in dem Wännchen festgeklebt und das Ausmaß der Degranulation in ihnen verglichen

### **2.6.2 Biochemische Bestimmungen des Proteingehalts im Speichel**

#### **2.6.2.1 Präparation der Drüsen, Versuchsaufbau und Meßprinzip**

Die Präparation der Drüsen sowie die Volumenbestimmung der abgesammelten Speicheltropfen erfolgt wie in Kapitel 2.2.1 für die Messung der Flüssigkeitssekretion beschrieben. Es werden ebenfalls drei direkt nacheinander präparierte Drüsen gleichzeitig stimuliert und die Lösungen mit einer Geschwindigkeit von 0,5 ml/Min. über das Gewebe geleitet. Alle 2,5 Minuten wird ein Speicheltropfen abgesammelt und sein Volumen bestimmt. Die vermessenen Speicheltropfen werden bis zur späteren Analyse des Proteingehalts in einem Reaktionsgefäß bei  $-20^{\circ}\text{C}$  in Paraffinöl aufbewahrt.

Der Proteingehalt in den Speicheltropfen wird nach einem modifizierten Bradford-Assay (Bradford, 1976) bestimmt. Als Reagenz wird Roti-Nanoquant-Lösung (Roth) nach dem mitgelieferten Protokoll verwendet. Die Speicheltropfen werden einzeln in die Löcher einer Mikrotiterplatte (Roth) gegeben und dort mit  $50 \mu\text{l}$  MQ  $\text{H}_2\text{O}$  verdünnt. Speicheltropfen mit einem Volumen von  $> 1 \mu\text{l}$ , welche anscheinend einen hohen Proteingehalt haben, wurden vor der Analyse mit MQ  $\text{H}_2\text{O}$  verdünnt und  $50 \mu\text{l}$  der verdünnten Probe in die Mikrotiterplatte pipettiert. Der Proteingehalt

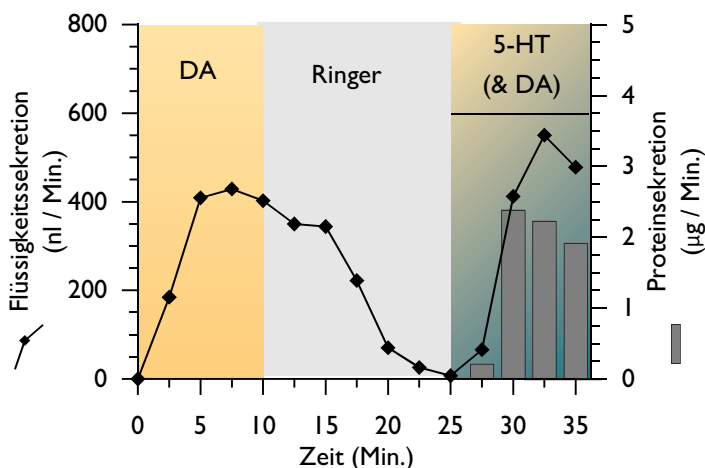
wird über die Viskosität der Probe beurteilt. Nachdem alle Proben in die Mikrotiterplatte übertragen sind, werden jeweils 200 µl der Roti-Nanoquant-Arbeitslösung als Färbereagenz zugegeben. Fünf Minuten später wird die Absorption bei 450 nm und 650 nm in einem Milenia Kinetic Analyzer (Diagnostic Products Corporation) gemessen. Zur gründlichen Durchmischung werden die Platten vor der Messung 3 x auf dem Plattenlesegerät durchgerüttelt.

Für die zuverlässige Quantifizierung wird jede Platte mit BSA-Lösungen geeicht. Die Eichlösungen enthalten 0, 20, 30, 40, 50, 60, 80 und 100 µg BSA/ml; das BSA wurde in MQ H<sub>2</sub>O gelöst. Jeweils 50 µl der Eichlösungen werden in ein Loch der Mikrotiterplatte pipettiert. Da die Speicheltropfen nicht ohne Reste von Paraffinöl übertragen werden können, werden zu den Eichlösungen ~ 3 µl Paraffinöl gegeben. Dies entspricht ungefähr der maximal "mitgeführten" Menge an Paraffinöl. Für die Auswertung wird der Quotient der Absorption bei 650/450 nm gebildet. Zur Kalibrierung wird eine Eichgerade durch die Absorptionswerte der Eichlösungen berechnet und zur Quantifizierung des Proteingehalts genutzt, wenn  $R^2 > 0,99$  ist. Die geringste detektierbare Proteinkonzentration liegt bei 10 µg BSA/ml, entsprechend einem Proteingehalt von 500 ng in der Probe.

### 2.6.2.2 Versuchsablauf: Beeinflußt DA die 5-HT-stimulierte Proteinsekretion?

Abbildung 6 zeigt den zeitlichen Ablauf dieser Kontrollversuche. Die erste Stimulierung der Drüsen mit 1 µM DA dient als Kontrolle, ob diese Drüsen nach DA-Stimulierung überhaupt Speichel sezernieren. Nach zehn Minuten wird das DA ausgewaschen. Nachdem die Sekretion der Drüsen endet, erfolgt eine zweite Stimulierung mit 5-HT oder mit 5-HT und DA.

Für die Auswertung wird die maximale Proteinsekretion in Anwesenheit und Abwesenheit von DA miteinander verglichen.

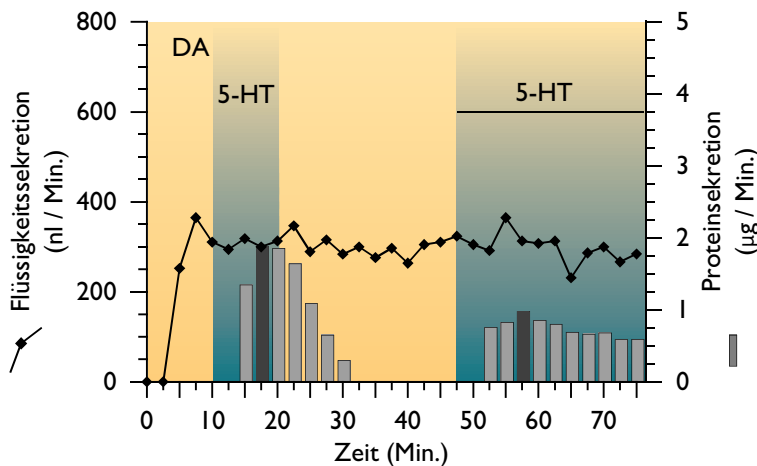


**Abb. 6: Zeitlicher Ablauf der Stimulierung für die Untersuchung, ob DA die 5-HT-stimulierte Proteinsekretion beeinflusst.** Die erste Stimulierung erfolgt mit 1 µM DA. Dieses wird ausgewaschen und gewartet, bis die Flüssigkeitssekretion endet. Die zweite Stimulierung erfolgt mit 1 µM 5-HT oder jeweils 1 µM 5-HT und DA. Sie dient als Teststimulierung und ist mit einem waagerechten Strich gekennzeichnet. Angegeben sind die Raten der Flüssigkeits- und Proteinsekretion einer Drüse (nl/Min. bzw. µg/Min.).



### 2.6.2.3 Versuchsablauf zur Erstellung der Dosis-Wirkungskurve der Proteinsekretion

In Abb. 7 ist am Beispiel einer Originalmessung der zeitliche Ablauf der Stimulierung für die Erstellung der Dosis-Wirkungskurve illustriert. Während der gesamten Versuchsdauer erfolgt eine Hintergrundstimulierung mit  $1 \mu\text{M}$  DA. Diese findet auch in allen nachfolgend beschriebenen Versuchen statt, um einen kontinuierlichen Speichelfuß zu gewährleisten. Während der ersten zehn Minuten der Versuche wird nur mit DA stimuliert. Diese Phase dient als Kontrolle, ob die Drüsen überhaupt Speichel sezernieren. Für die Erstellung der Dosis-Wirkungskurve wird dann 10 Minuten lang  $1 \mu\text{M}$  5-HT appliziert. Anschließend wird das 5-HT 25 Minuten lang mit Ringer ausgewaschen. In dieser Zeit endet die Proteinsekretion. Während einer zweiten 5-HT-Stimulierung werden die Drüsen 30 Minuten lang mit Konzentrationen zwischen  $10^{-9}$  und  $10^{-3}$  M 5-HT stimuliert.



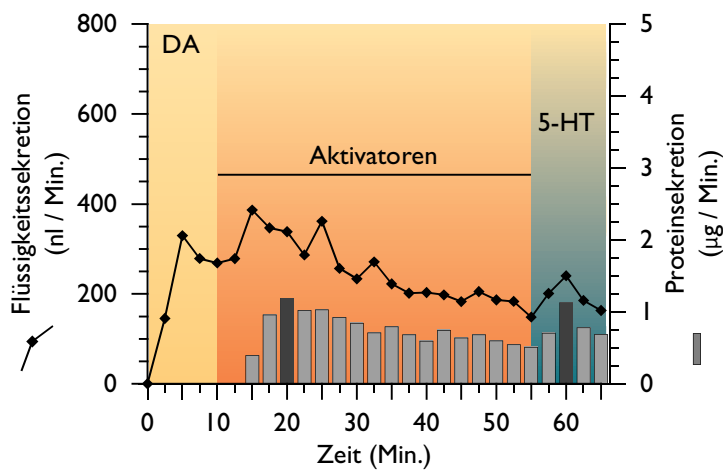
**Abb. 7: Zeitlicher Ablauf der Stimulierung zur Erstellung der Dosis-Wirkungskurve.** Während der gesamten Versuchsdauer wird  $1 \mu\text{M}$  DA appliziert, um einen ständigen Speichelfuß zu gewährleisten. Die erste 5-HT-Stimulierung erfolgt immer 10 Minuten lang mit  $1 \mu\text{M}$  5-HT und dient als Kontrolle. Die zweite 5-HT-Stimulierung erfolgte 30 Minuten lang mit unterschiedlichen Konzentrationen ( $10^{-9}$  -  $10^{-3}$  M 5-HT). Sie dient als Teststimulierung und ist mit einem waagerechten Strich gekennzeichnet. Die dunkelgrauen Balken geben die jeweils maximalen Raten der Proteinsekretion an. Dargestellt sind die Raten der Flüssigkeits- und Proteinsekretion einer Drüse (nl/Min. bzw. µg/Min.) bei zweimaliger Stimulierung mit  $1 \mu\text{M}$  5-HT.

Da die absolute Proteinsekretion verschiedener Drüsen sehr variabel ist, wird die maximale Proteinsekretion während der zweiten Stimulierungsperiode auf die der ersten Stimulierung normalisiert. Zur Erstellung der Dosis-Wirkungskurve wird eine sigmoide Funktion durch die normalisierten Werte berechnet (Details in Kapitel 2.7).

### 2.6.2.4 Versuchsablauf zum Test, ob die Erhöhung der intrazellulären $\text{Ca}^{2+}$ -, cAMP- und / oder cGMP-Konzentration eine Proteinsekretion aktiviert

Abb. 8 zeigt am Beispiel einer Originalmessung den zeitlichen Ablauf der Stimulierung zur Messung der Proteinsekretion. Zehn Minuten nach Versuchsbeginn werden für einen Zeitraum von 45 Minuten Substanzen zugegeben, welche die intrazellulären Konzentrationen verschiedener Botenstoffe erhöhen ("Aktivatoren", s. Tab. 2). Nach dieser Teststimulierung erfolgt zehn Minuten lang eine Kontrollstimulierung mit  $1 \mu\text{M}$  5-HT.

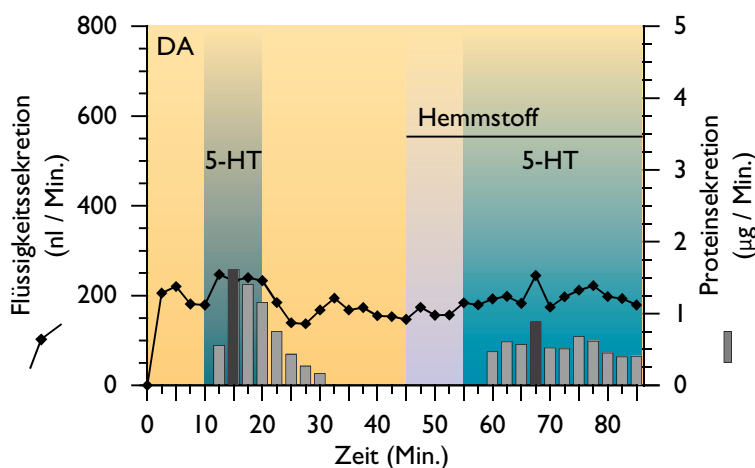
Um die Wirksamkeit der getesteten Substanzen zu beurteilen, wird der Mittelwert der maximalen Proteinsekretion (dunkelgraue Balken in Abb. 8) für jede Substanz berechnet und die maximale Proteinsekretion der verschiedenen Substanzen miteinander verglichen.



**Abb. 8: Zeitlicher Ablauf der Stimulierung für den Test, welche Botenstoffe die Proteinsekretion aktivieren.** Während der 45-minütigen Teststimulierung, gekennzeichnet mit einem waagerechten Strich, werden verschiedene Substanzen appliziert (Zusammenfassung der verwendeten Substanzen und ihrer Konzentrationen in Tab. 2). Als Kontrolle werden alle Drüsen nach der Teststimulierung mit  $1 \mu\text{M}$  5-HT stimuliert. In der dargestellten Messung werden während der Teststimulierung  $100 \mu\text{M}$  Forskolin und  $5 \mu\text{M}$  Ionomycin appliziert. Angegeben sind die Raten der Flüssigkeits- und Proteinsekretion einer Drüse (nl/Min. bzw.  $\mu\text{g}/\text{Min.}$ )

### 2.6.2.5 Versuchsablauf zur Untersuchung, ob die Protein Kinase C und die Adenylatcyclase an der Protein- und Flüssigkeitssekretion beteiligt sind

Die Drüsen werden, wie in Abb. 9 am Beispiel einer Originalmessung dargestellt, stimuliert. Zehn Minuten nach Versuchsbeginn wird zusätzlich zum DA mit  $1 \mu\text{M}$  5-HT stimuliert. Anschließend wird das 5-HT 25 Minuten lang ausgewaschen. In dieser Phase endet die Proteinsekretion.



**Abb. 9: Zeitlicher Ablauf der Stimulierung zur Untersuchung, ob die Protein Kinase C und die Adenylatcyclase an der Protein- und Flüssigkeitssekretion beteiligt sind.** Die erste 5-HT-Stimulierung dauert 10 Minuten und dient als Kontrolle. Anschließend wird das 5-HT in kontinuierlicher Anwesenheit von DA ausgewaschen. Während dieser 25 Minuten dauernden Periode endet die Proteinsekretion. Anschließend erfolgt eine zweite 5-HT-Stimulierung in Anwesenheit des Hemmstoffs, die 30 Minuten dauert. Die Stimulierungen in Anwesenheit des Hemmstoffs sind die Teststimulierungen. Diese Periode ist durch einen waagerechten Strich gekennzeichnet. Die dunkelgrauen Balken sind die jeweils maximalen Raten der Proteinsekretion. Dargestellt sind die Raten der Flüssigkeits- und Proteinsekretion einer Drüse (nl/Min. bzw.  $\mu\text{g}/\text{Min.}$ ).

Zehn Minuten vor der zweiten 5-HT-Stimulierung werden die Hemmstoffe zugegeben und anschließend die Drüsen über einen Zeitraum von 30 Minuten in Anwesenheit der Hemmstoffe mit 5-HT stimuliert.

Aufgrund der starken Streuung der absoluten Meßwerte werden die Raten der Protein- und Flüssigkeitssekretion normalisiert: (1) die maximalen Raten der Proteinsekretion während der zweiten 5-HT-Stimulierung auf die Raten während der ersten 5-HT-Stimulierung; (2) die Raten der Flüssigkeitssekretion während der DA-Stimulierung in Anwesenheit des Hemmstoffs auf die Raten während der ersten DA-Stimulierung sowie (3) die Raten der Flüssigkeitssekretion während der 5-HT-Stimulierung in Anwesenheit des Hemmstoffs auf die Raten während der ersten 5-HT-Stimulierung. Um die Wirkung der Hemmstoffe zu beurteilen, werden die normalisierten Werte miteinander verglichen.

## **2.7 Datenanalyse und Statistik**

Die Meßwerte von Speicheldrüsen werden nicht ausgewertet, wenn eines der folgenden Kriterien zutrifft:

- (1) wenn die Flüssigkeitssekretion nicht innerhalb der ersten beiden Probennahmeintervalle während der DA-Stimulierung einsetzt,
- (2) wenn die maximale Sekretionsrate während der ersten DA-Stimulierung 100 nl/Min. nicht überschreitet,
- (3) wenn die Sekretionsrate während einer anhaltenden DA-Stimulierung (z. B. die Teststimulierung der Proteinbestimmungen) mehrfach unter 100 nl/Min. sinkt,
- (4) wenn mehr als 5 Minuten nach Beginn der DA-Stimulierung noch Proteine im Speichel nachweisbar sind,
- (5) wenn der Speichel mehr als 5 µg Proteine enthält (obere Grenze der Eichgeraden).
- (6) wenn die Differenz der Summe der Kationen- und Anionenkonzentrationen in den Speichelproben mehr als 25 % beträgt,
- (7) wenn in den Messungen mit dem Ca<sup>2+</sup>-empfindlichen Farbstoff Fura-2 keine Änderungen der Fluoreszenz in den Gängen stattfinden.

Die statistische Auswertung erfolgt mit dem Computerprogramm "Statistica" (Version 4.5, Statsoft Inc., 1995). Die Werte sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (MW  $\pm$  SD) angegeben,  $\star$ :  $p \leq 0,05$ . Die Ergebnisse werden - sofern nötig - nach Bonferroni korrigiert.

Zur statistischen Auswertung werden nicht-parametrische Tests verwendet, die jeweils im Ergebnisteil aufgeführt sind. Für den Vergleich von mehr als zwei Datensätzen wird zunächst mit einer Kruskal-Wallis ANOVA auf signifikante Unterschiede getestet. Sofern diese vorhanden sind, wurden Mann-Whitney U-Tests durchgeführt. Liegen nur zwei ungepaarte Datensätze vor, so werden diese direkt mit dem Mann-Whitney U-Test miteinander verglichen. Für den Vergleich der Proteinsekretion nach unterschiedlichen Stimulierungen wird eine Ein-Wege ANOVA benutzt. Durch eine log-Transformation wird die Normalverteilung der Daten und deren Varianzhomogenität erreicht, so daß dieser parametrische Test durchgeführt werden kann.

Es soll auch geprüft werden, ob zwischen der Sekretionsrate bei der Speichelbildung und (1) dem Elektrolytgehalt im Endspeichel sowie (2) der Proteinsekretion ein Zusammenhang besteht. Dafür wird der Spearman R Korrelationskoeffizient verwendet.

Die Berechnung der nicht-linearen Regressionen wird mit dem Computerprogramm XACT (Version 7.22a, SciLab) durchgeführt. Für die Dosis-Wirkungskurve wird eine sigmoide Funktion durch die normalisierten Meßwerte berechnet (Fehlerminimierung nach dem "least-square" Verfahren, Berechnung mit einem Simplex Fit). Außerdem soll beurteilt werden, ob sich die Kinetik der Proteinsekretion nach Stimulierung mit unterschiedlichen 5-HT-Konzentrationen unterscheidet. Dafür wird, ausgehend von der maximalen Proteinsekretion, eine Kurve nach der Boltzmann-Gleichung durch die Werte berechnet.

In einigen Experimenten ist entweder die Größe der Stichprobe zu gering für die Anwendung statistischer Tests, oder die Daten sind nicht zuverlässig zu quantifizieren, so daß eine rein deskriptive Auswertung stattfindet. Dies betrifft die folgenden Versuchsansätze: (1) die mikrofluorometrische Messung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und der Autofluoreszenz in den Acinuszellen, (2) die vitalmikroskopische Beobachtung der Proteinsekretion sowie (3) die während der Experimente zur Proteinsekretion aufgenommenen Raten der Flüssigkeitssekretion.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Elektrolyt- und Flüssigkeitssekretion

##### 3.1.1 Flüssigkeitssekretion

Zunächst werden die DA- und 5-HT-stimulierten Sekretionsraten bestimmt. Die Meßwerte sind in Tab. 6 zusammengefaßt. Die Sekretionsrate während einer ersten DA-Stimulierung beträgt  $317 \pm 126$  nl/Min. Dieser Wert entspricht der von Just & Walz (1996) beschriebenen DA-stimulierten Sekretionsrate, sowie der von allen in dieser Arbeit gemessenen Drüsen ( $321 \pm 134$  nl/Min.,  $n=475$ ). Während einer zweiten Stimulierung mit  $1 \mu\text{M}$  DA ist die Sekretionsrate signifikant geringer (Tab. 6). Dieser Unterschied ist bedeutend für die pharmakologischen Experimente mit Hemmstoffen, deren Wirkung während der zweiten Stimulierungsphase getestet werden soll, und nur über den Vergleich der normalisierten Sekretionsraten während der zweiten Stimulierung beurteilt werden kann.

Die Sekretionsrate während einer zweiten Stimulierung mit 5-HT ist geringer als die während einer zweiten Stimulierung mit DA (Tab. 6), was den von Just & Walz (1996) veröffentlichten Befunden entspricht. Während die DA-stimulierte Sekretionsrate über den Zeitraum der Stimulierung annähernd konstant ist (s. Abb. 4), oder nach einem anfänglichen Maximum für die weitere Dauer der Stimulierung auf einem etwas niedrigeren Niveau konstant bleibt (s. Abb. 8), verläuft die 5-HT-stimulierte Flüssigkeitssekretion innerhalb der zehn Minuten dauernden Stimulierung transient (s. Abb. 4).

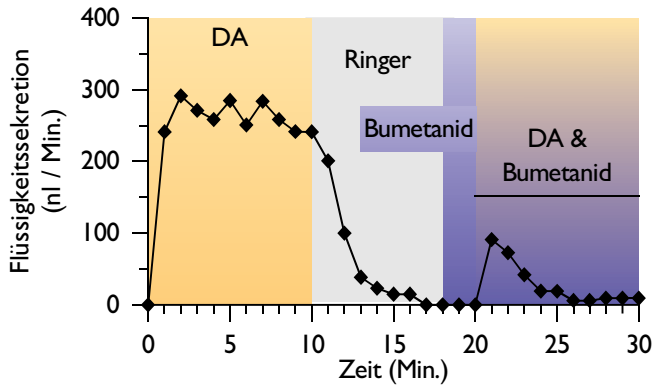
**Tab. 6: Raten der DA- und 5-HT-stimulierten Flüssigkeitssekretion.** Angegeben sind die absoluten und normalisierten Sekretionsraten während zweier aufeinanderfolgender Stimulierungen mit DA ( $1 \mu\text{M}$ ) sowie mit DA ( $1 \mu\text{M}$ ) und 5-HT ( $1 \mu\text{M}$ ). Die Werte sind als MW  $\pm$  SD angegeben.

Erste Stimulierung "Kontrolle" (nl/Min.)	Zweite Stimulierung "Test"		n	p
	(nl/Min.)	(%)		
DA $317 \pm 126$	DA $259 \pm 119$	$82 \pm 17$	10	*
DA $338 \pm 174$	5-HT $168 \pm 107$	$49 \pm 19$	10	

Wilcoxon Matched Pairs Test, \*  $p \leq 0,05$

Als nächstes wird getestet, ob Ouabain, ein Hemmstoff der  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ , und Bumetanid, ein Hemmstoff des NKCC, die DA- und 5-HT-stimulierten Sekretionsraten beeinflussen. Abb. 10 zeigt exemplarisch die DA-stimulierte Flüssigkeitssekretion einer Drüse nach Hemmung des NKCC mit Bumetanid. In Anwesenheit des Hemmstoffs ist die Sekretionsrate geringer und verläuft transient.

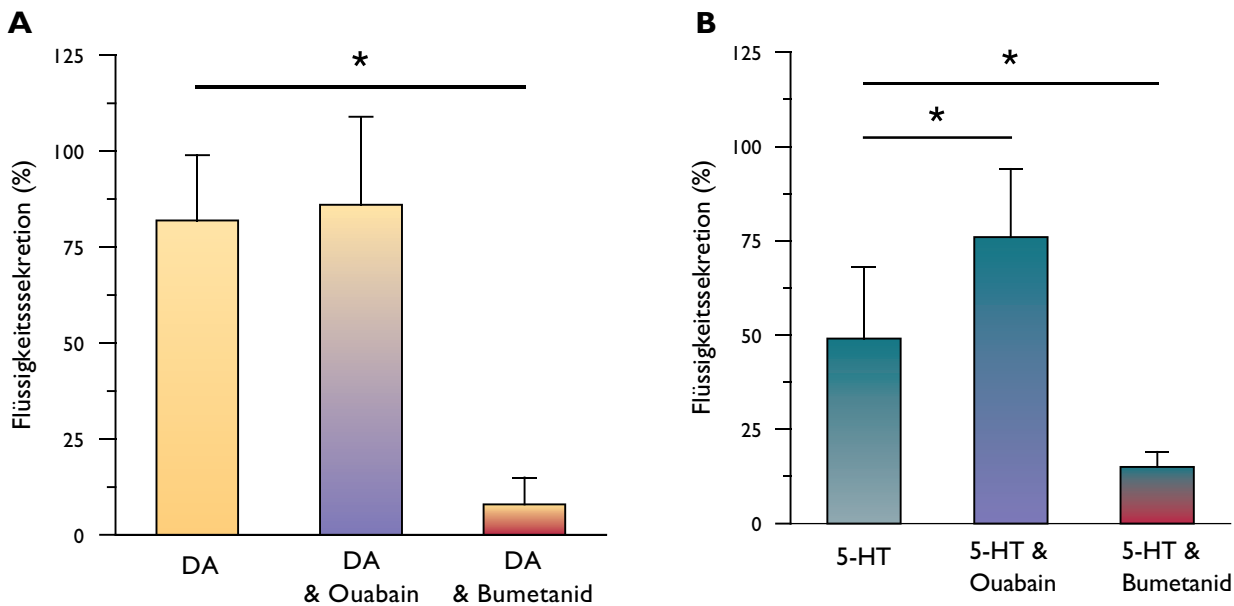
Die Wirkung von Ouabain wird unter den gleichen Bedingungen getestet.



**Abb. 10: Flüssigkeitssekretion nach Hemmung des NKCC.** Die Sekretionsrate während der ersten DA-Stimulierung ist in etwa konstant. Bei Hemmung des NKCC mit 100  $\mu$ M Bumetanid ist die maximale DA-stimulierte Sekretionsrate geringer, und die Sekretion verläuft transient. Dargestellt ist die Sekretionsrate in nl/Min. einer Drüse. Der dargestellte Verlauf ist repräsentativ für alle durchgeführten Versuche (n=10).

Abb. 11 A faßt die Wirkung der Hemmstoffe auf die DA-stimulierte Sekretionsrate zusammen. Die Hemmung der  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase mit Ouabain beeinflusst die Sekretionsraten nicht signifikant. Dagegen verringert die Hemmung des NKCC die Sekretionsrate signifikant von  $317 \pm 119$  nl/Min. auf  $22 \pm 22$  nl/Min., also auf  $8 \pm 7$  % der Kontrolle.

Die Wirkung der Hemmstoffe auf die 5-HT-stimulierten Sekretionsraten ist in Abb. 11 B zusammengefaßt. Eine Hemmung des NKCC reduziert die 5-HT-stimulierten Sekretionsrate auf  $43 \pm 20$  nl/Min., also auf  $15 \pm 4$  % der Kontrolle. Diese Sekretionsrate ist signifikant niedriger als die in Abwesenheit des Hemmstoffs gemessene ( $49 \pm 19$  %, s. Tab. 6). Die Hemmung der  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase erhöht dagegen die 5-HT-stimulierte Sekretionsrate signifikant auf  $291 \pm 133$  nl/Min., also  $76 \pm 17$  % der Kontrolle.



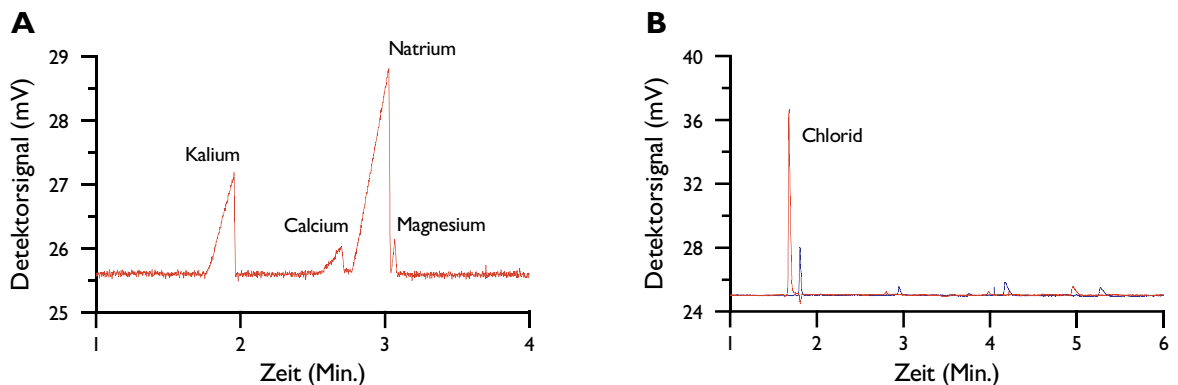
**Abb. 11: Einfluß der Hemmstoffe Ouabain und Bumetanid auf die Raten der Flüssigkeitssekretion.** Angegeben ist die Flüssigkeitssekretion (%) nach DA-Stimulierung (A) bzw. 5-HT-Stimulierung (B) sowie in Anwesenheit des  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase-Hemmstoffs Ouabain (100  $\mu$ M) und des NKCC-Hemmstoffs Bumetanid (10  $\mu$ M). Die durch beide Neurotransmitter aktivierte Sekretionsrate wird durch Bumetanid signifikant verringert. Ouabain erhöht signifikant die 5-HT-stimulierte Sekretionsrate. Die Werte werden auf die Sekretionsraten der gleichen Drüsen bei der ersten DA-Stimulierung normalisiert und sind in MW  $\pm$  SD angegeben, n=10 (DA) und n=12 (5-HT).  $p \leq 0,05$ , Mann-Whitney U-Test.

Der NKCC spielt also eine Schlüsselrolle für die DA- und 5-HT-stimulierte Flüssigkeitssekretion.

Eine quantitative Beteiligung der Ouabain-sensitiven  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase für die Flüssigkeitssekretion kann nur während einer 5-HT-Stimulierung nachgewiesen werden.

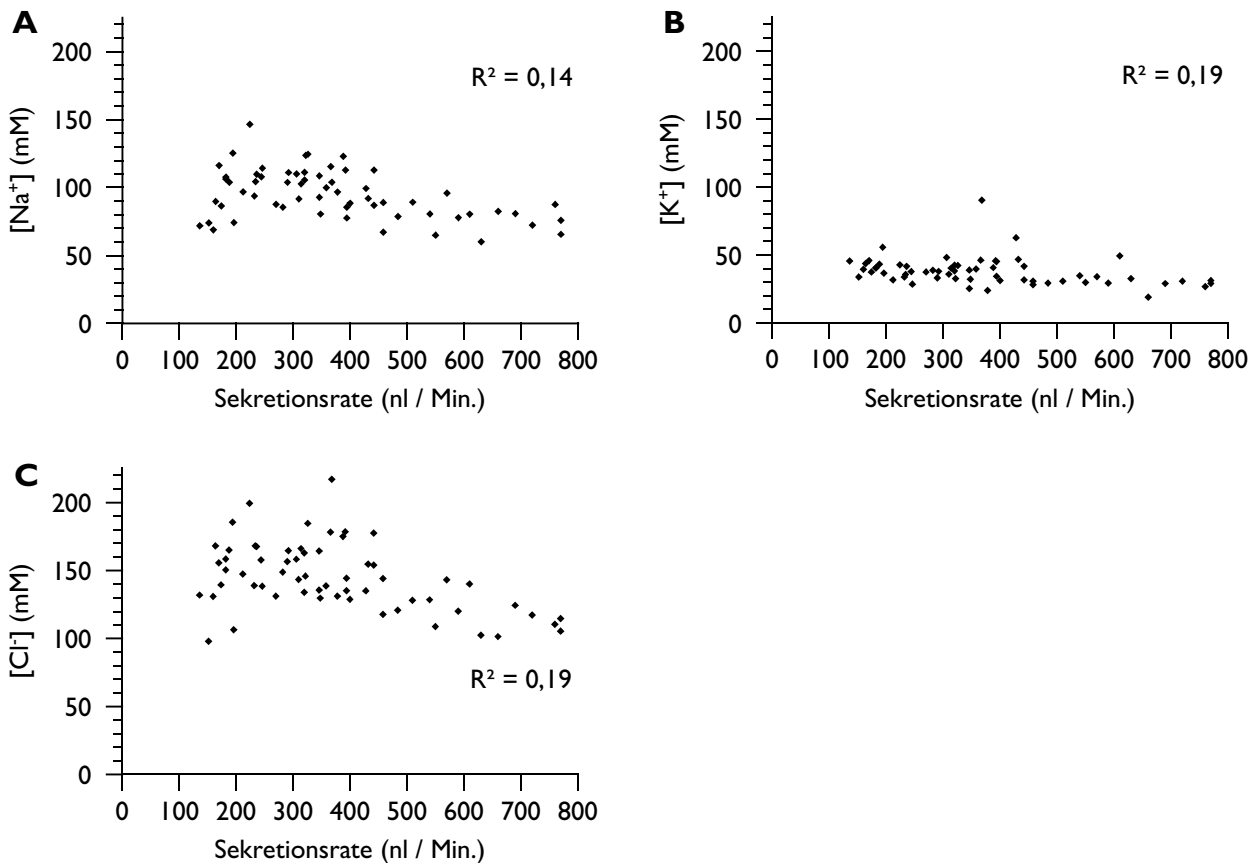
### 3.1.2 Elektrolytgehalt im Speichel

In allen Speichelproben werden neben  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  und  $\text{Cl}^-$  auch geringe Mengen von  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  nachgewiesen. Die Abb. 12 zeigt jeweils einen repräsentativen CE-Lauf der Kationen- (A) und Anionenanalysen (B). Für eine zuverlässige Quantifizierung müssen die  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentrationen in den unverdünnten Proben bei etwa 2,5 mM liegen. Die gemessenen Werte sind häufig niedriger, so daß die  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentrationen nicht quantifiziert werden.



**Abb. 12: Kapillarelektrophoretische Analyse der im Schabenspeichel enthaltenen Ionen.** Der CE-Lauf einer repräsentativen Kationenanalyse ist in **A** dargestellt (Sekretionsrate 300 nl/Min.). Die prominenten Kationen sind  $\text{K}^+$  und  $\text{Na}^+$ , daneben sind  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  im Speichel enthalten. **B** zeigt CE-Läufe der Anionenanalysen von zwei Speichelproben, die mit unterschiedlichen Sekretionsraten gebildet wurden: die des rot dargestellten Laufs wurde mit einer Sekretionsrate von 300 nl/Min. gebildet, die des blau dargestellten Laufs mit 66 nl/Min. In beiden Fällen ist  $\text{Cl}^-$  das prominente Anion. In der mit geringer Sekretionsrate gebildeten Probe ist der relative Anteil des  $\text{Cl}^-$ -Signals am Signal aller Anionen geringer als in der Probe, die mit höherer Sekretionsrate gebildet wurde.

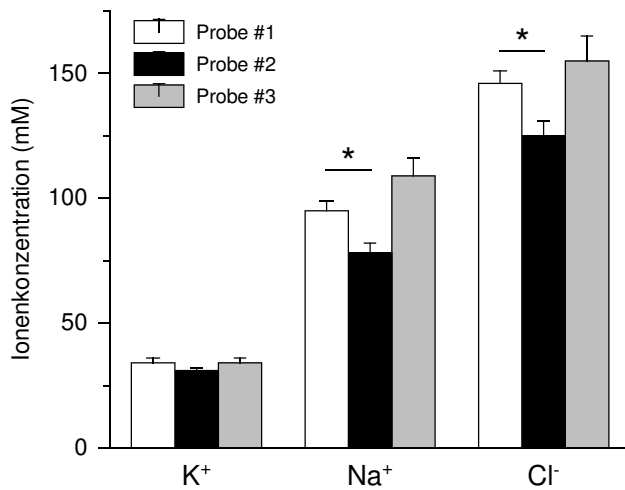
In den Speichelproben von insgesamt 61 "ersten" DA-Stimulierungen (Probe #1) werden die folgenden Ionenkonzentrationen gemessen:  $\text{Na}^+$   $95 \pm 18$  mM;  $\text{K}^+$   $38 \pm 10$  mM;  $\text{Cl}^-$   $145 \pm 25$  mM. Diese Werte entsprechen den Ergebnissen von Gupta & Hall (1983) und bestätigen, daß  $\text{Na}^+$  und  $\text{Cl}^-$  die am stärksten im Endspeichel vertretenen Ionen sind. Die Osmolarität des DA-stimulierten Endspeichels beträgt  $265 \pm 47$  mosM und ist demnach hypoosmotisch zum Ringer (355 mosM bzw. berechnet 340 mosM). Die gemessenen Ionenkonzentrationen korrelieren nicht stark mit den Sekretionsraten, mit denen die Speichelproben gebildet wurden (Abb. 13).



**Abb. 13: Korrelation zwischen Ionenkonzentrationen im Endspeichel und Sekretionsraten.** Aufgetragen sind die  $Na^+$ -,  $K^+$ - und  $Cl^-$ -Konzentrationen, die während der ersten DA-Stimulierung aller Drüsen gemessen werden ( $n=61$ ) sowie die zugehörigen Sekretionsraten. Die angegebenen Korrelationskoeffizienten ( $R^2$ , Spearman) zeigen, daß es keine starke Korrelation zwischen den Daten gibt.

Da sich die Sekretionsraten während zweier aufeinanderfolgender DA-Stimulierungen signifikant voneinander unterscheiden, wurde getestet, ob dies auch auf die Ionenkonzentrationen zutrifft. Die  $K^+$ -Konzentration ist in allen drei gesammelten Proben nicht signifikant unterschiedlich (s. Abb. 14). Die  $Na^+$ - und  $Cl^-$ -Konzentrationen sind in Probe #2 (gesammelt zwischen Minute 0-5 der zweiten DA-Stimulierung) signifikant niedriger als in Probe #1, während es keinen Unterschied gibt zwischen Probe #1 und #3 (gesammelt zwischen Minuten 5-10 der zweiten DA-Stimulierung) (Abb. 14). Die Wirkung der während der zweiten Stimulierungsperiode zugegebenen Hemmstoffe kann also durch direkten Vergleich der Ionenkonzentrationen aus Probe #1 und Probe #3 beurteilt werden (s. Tab. 7). Der Anteil des  $Cl^-$ -Signals an der gesamten Fläche der Anionensignale beträgt  $88 \pm 5 \%$  in Probe #2 und  $93 \pm 4 \%$  in Probe #3. Dieser Befund zeigt, daß  $Cl^-$  das Hauptanion im DA-stimulierten Schabenspeichel ist.





**Abb. 14: Ionenkonzentrationen im Speichel nach DA-Stimulierung.** Probe #1 (weißer Balken) wird zwischen Minuten 5-10 der ersten Stimulierungsperiode gesammelt. Während der zweiten DA-Stimulierung wird zwischen Minute 0-5 Probe #2 (schwarzer Balken) und zwischen Minute 5-10 Probe #3 (grauer Balken) gesammelt.

Es gibt keine signifikanten Unterschiede der K<sup>+</sup>-Konzentration in den Proben #1 bis #3. Die Na<sup>+</sup>- und Cl<sup>-</sup>-Konzentrationen sind in Probe #2 signifikant niedriger als in Probe #1. Die Werte sind als MW ± SD angegeben, n=11; \* p ≤ 0,05, Wilcoxon Matched Pairs Test.

Anschließend wird getestet, ob sich der Elektrolytgehalt nach 5-HT-Stimulierung (Probe #3) von dem nach DA-Stimulierung (Probe #1) der selben Drüsen unterscheidet (Tab. 7). Beide Transmitter stimulieren die Bildung eines Speichels mit nahezu identischen K<sup>+</sup>-Konzentrationen. Die Na<sup>+</sup>- und Cl<sup>-</sup>-Konzentrationen scheinen im 5-HT-stimulierten Speichel niedriger zu sein; die Unterschiede sind jedoch statistisch nicht signifikant. Wie der DA-stimulierte Speichel ist auch der 5-HT-stimulierte hypoosmotisch zum Ringer.

**Tab. 7: Ergebnisse der CE-Analysen nach DA- und 5-HT-Stimulierung sowie nach Hemmung der Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase.** Zusammengefaßt sind die K<sup>+</sup>-, Na<sup>+</sup>- und Cl<sup>-</sup>-Konzentrationen, die Osmolarität<sup>1</sup> und das Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-Verhältnis im Speichel isolierter Drüsen bei Stimulierung mit DA (1 µM) und 5-HT (1 µM) in Anwesenheit und Abwesenheit von Ouabain (100 µM).

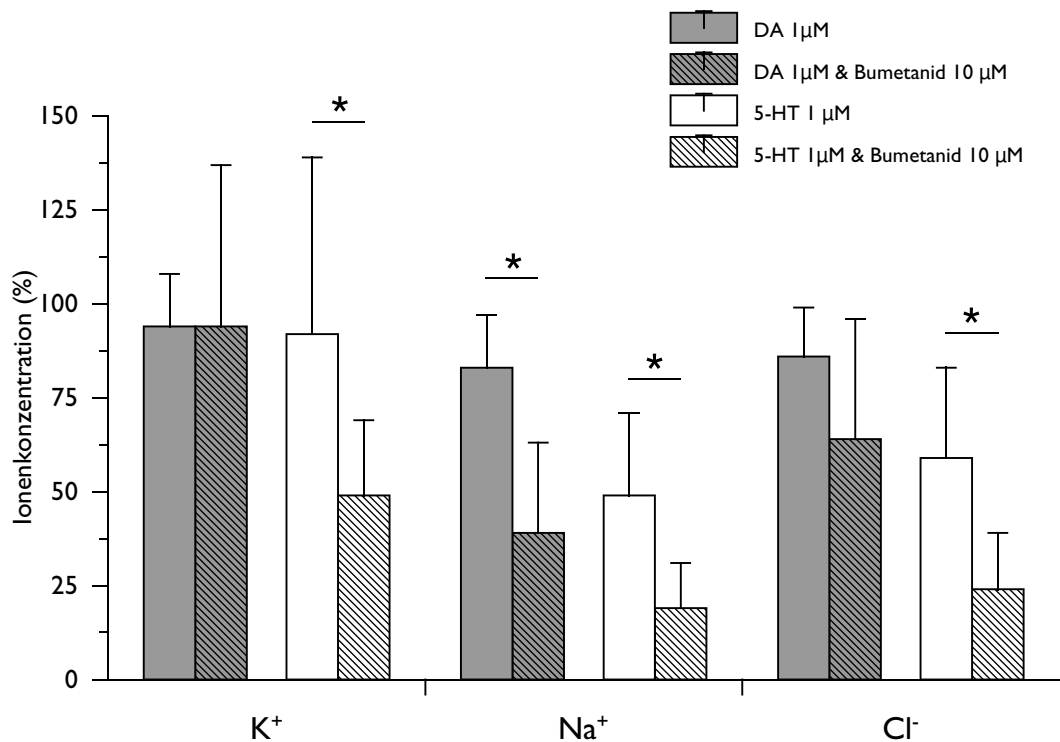
	I. Stimulierungsperiode	2. Stimulierungsperiode		n	p <sup>2</sup>
	Minute 5-10 Probe #1	Minute 0-5 Probe #2	Minute 5-10 Probe #3		
	DA	5-HT	5-HT	10	
[K <sup>+</sup> ] (mM)	41 ± 19	32 ± 7	44 ± 14		n.s.
[Na <sup>+</sup> ] (mM)	92 ± 15	43 ± 16	70 ± 25		n.s.
[Cl <sup>-</sup> ] (mM)	150 ± 33	83 ± 21	131 ± 40		n.s.
Osmolarität (mosM)	266 ± 56	150 ± 43	229 ± 74		
Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -Verhältnis	2,2	1,3	1,6		
	DA	DA & Ouabain	DA & Ouabain	12	
[K <sup>+</sup> ] (mM)	42 ± 5	35 ± 5	30 ± 6		★
[Na <sup>+</sup> ] (mM)	107 ± 20	120 ± 30	149 ± 17		★
[Cl <sup>-</sup> ] (mM)	162 ± 21	165 ± 33	194 ± 31		★
Osmolarität (mosM)	298 ± 42	309 ± 66	359 ± 41		
Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -Verhältnis	2,5	3,4	5,0		
	DA	5-HT & Ouabain	5-HT & Ouabain	9	
[K <sup>+</sup> ] (mM)	35 ± 7	29 ± 10	31 ± 5		n.s.
[Na <sup>+</sup> ] (mM)	77 ± 24	75 ± 25	87 ± 25		n.s.
[Cl <sup>-</sup> ] (mM)	111 ± 28	104 ± 29	22 ± 31		n.s.
Osmolarität (mosM)	224 ± 59	209 ± 68	236 ± 55		
Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -Verhältnis	2,2	2,6	2,8		

<sup>1</sup> Die Werte sind als MW ± SD angegeben, die Osmolarität wurde aus  $([Na^+] + [K^+]) \cdot 2$  berechnet.

<sup>2</sup> Wilcoxon Matched Pairs Test zwischen Probe #1 und #3, ★ p ≤ 0,05

Die Hemmung der Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase mit Ouabain bewirkt eine signifikante Verringerung der K<sup>+</sup>-Konzentration und einen signifikanten Anstieg der Na<sup>+</sup>- und Cl<sup>-</sup>-Konzentration im DA-stimulierten Speichel (Tab. 7). Die Osmolarität des Endspeichels steigt auf 359 ± 41 mosM, was ungefähr der Osmolarität des Ringers entspricht (355 mosM). Dagegen beeinflusst die Hemmung der Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase die Ionenkonzentrationen im 5-HT-stimulierten Speichel nicht signifikant. Der gebildete Endspeichel ist hypoosmotisch zum Ringer (Tab. 7, Vergleich zwischen Probe #1 und #3).

Nach Hemmung des NKCC mit Bumetanid verringern sich nicht nur die Raten der Flüssigkeitssekretion, sondern auch die Ionenkonzentrationen im Endspeichel (Tab. 8). Aufgrund der geringen und transienten Flüssigkeitssekretion in Anwesenheit von Bumetanid (s. Abb. 11) kann nur eine Bumetanid-Speichelprobe während der gesamten Stimulierungsphase gesammelt werden (Probe #2). Abb. 15 zeigt, daß die Na<sup>+</sup>- und Cl<sup>-</sup>-Konzentrationen in dieser Probe sowohl nach DA- als auch nach 5-HT-Stimulierung niedriger sind, als in Probe #1. Allerdings sind auch ohne einen Hemmstoff die Na<sup>+</sup>- und Cl<sup>-</sup>-Konzentrationen in Probe #2 niedriger als in Probe #1 (s. Abb. 14). Deshalb wird die Wirkung von Bumetanid durch den Vergleich der normalisierten Ionenkonzentrationen in Probe #2 beurteilt.



**Abb. 15: Ionenkonzentrationen im Speichel bei Hemmung des NKCC während einer DA- oder 5-HT-Stimulierung.** Angegeben sind die K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> und Cl<sup>-</sup>-Konzentrationen während der zweiten Stimulierungsperiode, die auf die Konzentrationen in der Probe #1 normalisiert werden. Die zugehörigen Werte befinden sich in Abb. 13 sowie den Tabellen Tab. 7 und 8. \* p ≤ 0,05; Mann-Whitney U-Test.

Die Verringerung der Cl<sup>-</sup>-Konzentration im DA-stimulierten Speichel unter Einwirkung von Bumetanid ist statistisch nicht signifikant (Tab. 8 und Abb. 15). Die Na<sup>+</sup>-Konzentration verringert sich signifikant auf 39 ± 24 % der Kontrolle (Probe #1), und die Osmolarität sinkt auf 136 ± 49 mosM. In Anwesenheit von Bumetanid ist die Konzentration aller quantifizierten Ionen im 5-HT-stimulierten Speichel geringer. Dessen Osmolarität beträgt nur 81 ± 35 mosM (Tab. 8 und Abb. 15). Dieser Wert ist noch niedriger als die Osmolarität des DA-stimulierten Speichels bei Hemmung des NKCC. Neben der absoluten Cl<sup>-</sup>-Konzentration verringert sich im 5-HT-stimulierten Speichel auch die relative Cl<sup>-</sup>-Konzentration. Diese beträgt bei 5-HT-Stimulierung ohne Hemmstoff 77 ± 12 %, in Anwesenheit von Bumetanid dagegen nur 64 ± 13 %.

**Tab. 8: Ergebnisse der CE-Analysen nach Hemmung des NKCC bei DA- und 5-HT-Stimulierung.** Zusammengefaßt sind die K<sup>+</sup>-, Na<sup>+</sup>- und Cl<sup>-</sup>-Konzentrationen, die Osmolarität<sup>1</sup> und das Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-Verhältnis im Speichel isolierter Drüsen bei Stimulierung mit DA (1 µM) und 5-HT (1 µM) in Anwesenheit und Abwesenheit von Bumetanid (10 µM).

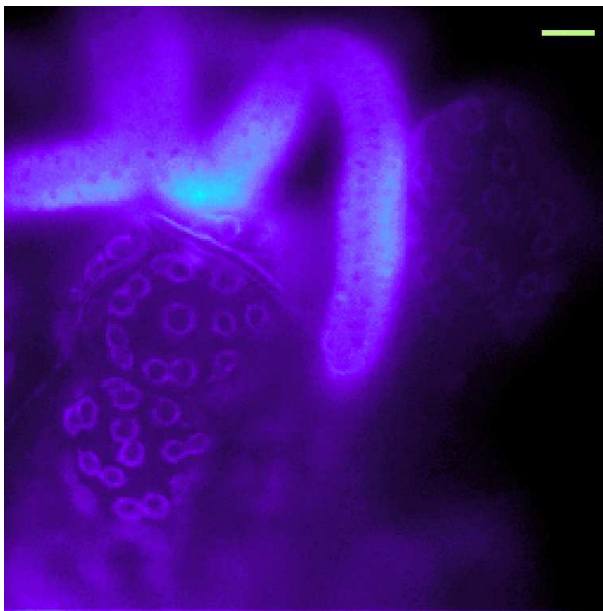
	I. Stimulierungsperiode	2. Stimulierungsperiode	
	Minute 5-10, Probe #1	Minute 0-10, Probe #2	n
	DA	DA & Bumetanid	7
[K <sup>+</sup> ] (mM)	34 ± 4	31 ± 12	
[Na <sup>+</sup> ] (mM)	97 ± 19	37 ± 21	
[Cl <sup>-</sup> ] (mM)	129 ± 24	79 ± 30	
Osmolarität (mosM)	261 ± 40	136 ± 49	
	DA	5-HT & Bumetanid	8
[K <sup>+</sup> ] (mM)	45 ± 8	22 ± 9	
[Na <sup>+</sup> ] (mM)	99 ± 12	19 ± 12	
[Cl <sup>-</sup> ] (mM)	150 ± 13	35 ± 24	
Osmolarität (mosM)	288 ± 28	81 ± 35	

<sup>1</sup> Die Werte sind als MW ± SD angegeben, die Osmolarität wurde aus ([Na<sup>+</sup>] + [K<sup>+</sup>])•2 berechnet.

## 3.2 Mikrofluorometrische Messungen der $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und der Autofluoreszenz

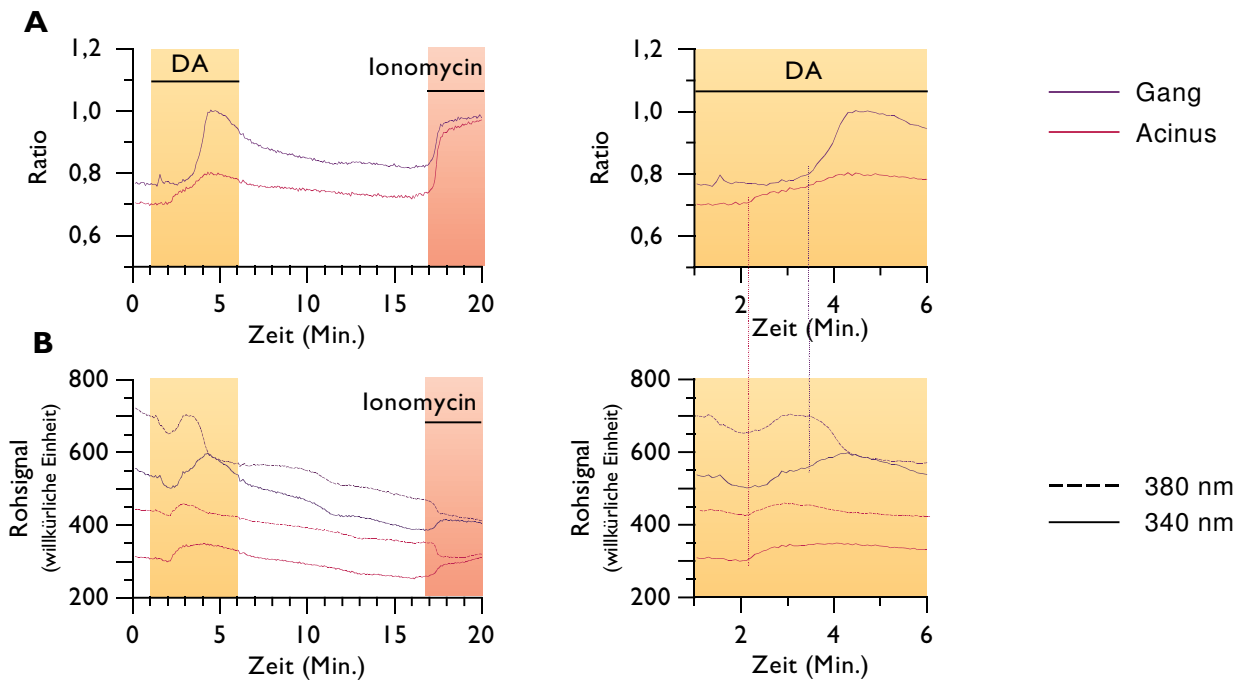
### 3.2.1 Änderungen der $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in den Acinuszellen

In den folgenden Messungen wird untersucht, ob sich die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in den Acinuszellen bei Stimulierung mit DA ändert. Abb. 16 zeigt eine mit Fura-2 AM beladene Drüse vor Versuchsbeginn. Das Fluoreszenzsignal geht ausschließlich von den P-Zellen der Acini und von den Ausführungszellen aus. Von den C-Zellen kann dagegen kein Fluoreszenzsignal registriert werden.



**Abb. 16: Fura-2 beladene Speicheldrüse.** Das Bild zeigt die Fura-2-Fluoreszenz einer Speicheldrüse bei Anregung mit 340 nm vor Versuchsbeginn (der Hintergrund wurde subtrahiert). Die Ausführungszellen fluoreszieren stärker als die Acinuszellen. Die schmetterlingsförmigen Strukturen sind die mit dem Fluoreszenzfarbstoff beladenen P-Zellen, von den C-Zellen geht kein meßbares Signal aus. Balken: 100  $\mu\text{m}$ .

In Abb. 17 sind die Änderungen der "Ratio" sowie der Rohsignale der Fluoreszenz nach Anregung mit 340 und 380 nm beispielhaft an einer Originalmessung dargestellt. DA verursacht in beiden Bereichen der Drüse einen Anstieg der "Ratio". In den Ausführungszellen steigt die "Ratio" stärker als in den P-Zellen (s. Abb. 17). Bei Betrachtung der Rohsignale (rechte Seite von Abb. 17) erkennt man, daß diese zunächst gleichsinnig transient abfallen und anschließend gleichsinnig transient ansteigen. Etwa bei Minute 3,5 (gestrichelte blaue Linie in Abb. 17, rechts) beginnt eine gegenläufige Änderung der Rohsignale, die "Ratio" steigt an. In den P-Zellen Acinus dagegen kommt es auch während des Anstiegs der "Ratio" nicht zu einer gegenläufigen Änderung der Rohsignale (rote gestrichelte Linie in Abb. 17, rechts). Ursache der Erhöhung der "Ratio" ist hier eine leicht unterschiedliche Kinetik des annähernd parallel verlaufenden Anstiegs der Rohsignale. Applikation des  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophors Ionomycin führt erwartungsgemäß zu einer gegenläufigen Änderung der Rohsignale und zu einem Anstieg der "Ratio", da Ionomycin die Zellmembran durchlässig für  $\text{Ca}^{2+}$  macht und so die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration erhöht.



**Abb. 17: Änderung der Fura-2-Fluoreszenz in den Zellen der Acini und Ausführgänge.** Abgebildet ist die "Ratio" der Fluoreszenz (340/380 nm) (A) sowie deren Rohsignale (B) während und nach einer DA-Stimulierung (1  $\mu$ M) sowie nach Applikation von Ionomycin ( $\sim$  20  $\mu$ M). Auf der rechten Seite ist der Zeitraum der DA-Stimulierung vergrößert dargestellt. DA verursacht einen Anstieg der "Ratio" in den P-Zellen und den Zellen der Ausführgänge, wobei der Anstieg in den Gangzellen der gleichen Drüse höher ist. Die Zugabe von Ionomycin bewirkt in beiden Bereichen einen Anstieg der "Ratio". Eine nähere Erläuterung erfolgt im Text.

Die dargestellte Originalregistrierung ist repräsentativ für die sechs ausgewerteten Drüsen. Im Mittel steigt die "Ratio" in den P-Zellen auf  $14 \pm 9$  % des Werts vor Beginn der DA-Stimulierung, die in den Gangzellen auf  $43 \pm 47$  %. Kontrollmessungen zeigen, daß die stark fluoreszierenden Ausführgänge das über den benachbarten Regionen gemessene Fluoreszenzsignal nicht nennenswert beeinflussen (maximaler Anstieg der "Ratio" auf  $6 \pm 4$  % des Werts vor einer DA-Stimulierung). Die normalisierten Änderungen der "Ratio" sind in Abb. 18 A dargestellt. Im Anhang befindet sich eine Zusammenfassung der absoluten und normalisierten Änderungen der "Ratio" (Tab. A3).

Merkwürdigkeiten der vorgestellten Messungen werfen die Frage auf, in welchem Ausmaß die registrierten Rohsignale und die "Ratios" wirklich durch Änderungen der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration hervorgerufen werden (s. Diskussion). An dieser Stelle sei nur darauf hingewiesen, daß parallele Änderungen der Rohsignale durch zelluläre Volumenänderungen und / oder Änderungen der Autofluoreszenz hervorgerufen werden können. Deshalb wird untersucht, ob sich bei Stimulierung mit DA die Autofluoreszenz der Acini und Ausführgänge ändert.

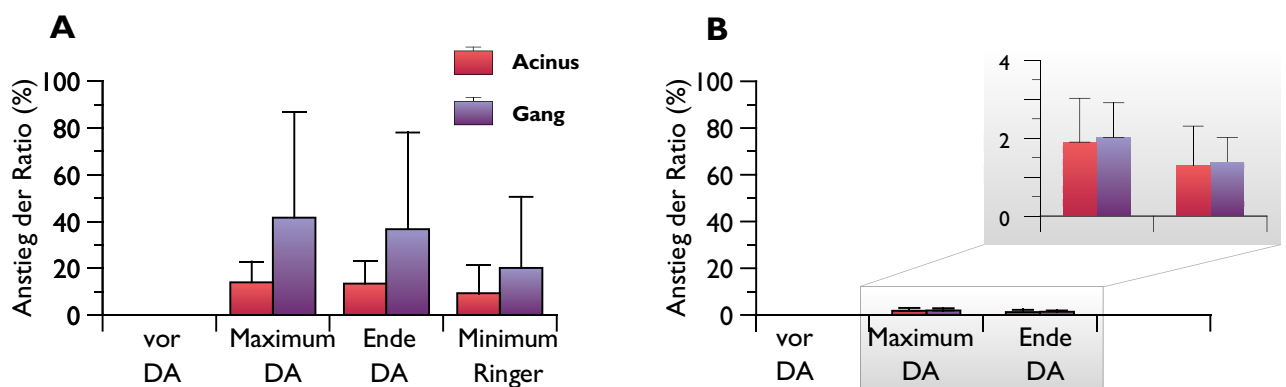
### 3.2.2 Änderungen der Autofluoreszenz unter Bedingungen einer Fura-2-Messung

Zur Kontrolle, ob die Stimulierung mit DA oder 5-HT die Autofluoreszenz in den Acini verändert, wird die Autofluoreszenz von unbeladenen Drüsen unter den gleichen Bedingungen analysiert, welche für die Messungen mit Fura-2 verwendet werden.

In einem ersten Kontrollexperiment werden die Drüsen zunächst mit DA stimuliert, anschließend mit 5-HT. Die Belichtungszeit in diesem Experiment beträgt 200 ms. Es wird nur die Änderung der Fluoreszenz in einem Bereich der Acini ausgewertet.

DA verursacht nur einen sehr geringen Anstieg der Autofluoreszenz (maximal auf  $2 \pm 1$  % des Werts vor Beginn der Stimulierung). Die Rohsignale der bei 340 und 380 nm angeregten Fluoreszenz ändern sich annähernd parallel; der Anstieg der "Ratio" wird durch eine leicht unterschiedliche Kinetik im Anstieg der Rohsignale ausgelöst. Nach Auswaschen des DA fällt die "Ratio" wieder auf den Ruhewert. Eine anschließende 5-HT-Stimulierung bewirkt keinen weiteren Anstieg der "Ratio". Im Anhang befindet sich eine Zusammenfassung der absoluten und normalisierten Änderungen der "Ratio" (Tab. A4).

In einem zweiten Kontrollexperiment werden die DA-stimulierten Änderungen der Autofluoreszenz in den Acini und Gängen analysiert. Die Belichtungszeit beträgt 100 ms, genau wie in den Messungen mit Fura-2. In Abb. 18 sind die Ergebnisse dieses Experiments denen des Fura-2 Experiments gegenüber gestellt. Im Vergleich zu den Änderungen in Fura-2 beladenen Drüsen (Abb. 18, A) sind die Änderungen der Autofluoreszenz winzig (Abb. 18, B). Erst in einem stark vergrößerten Ausschnitt erkennt man den durch DA verursachten Anstieg der "Ratio", der sowohl in den Acinuszellen, als auch in den Ausführungszellen stattfindet.



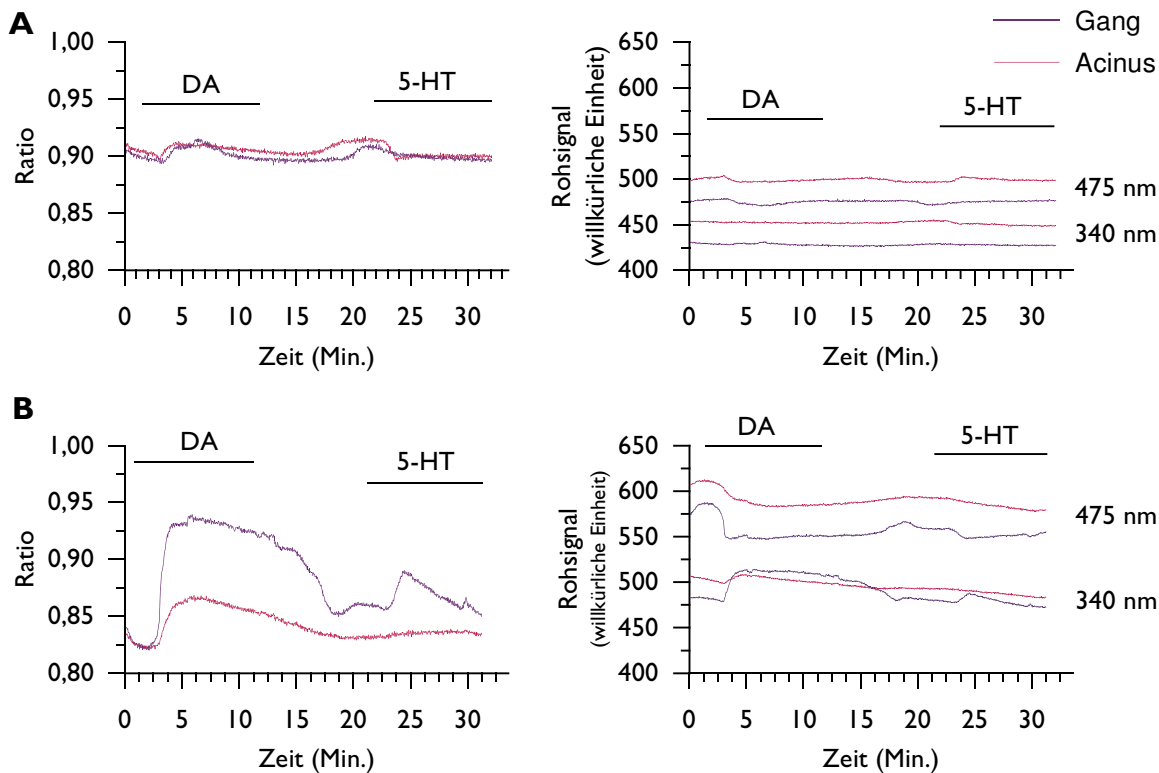
**Abb. 18 : DA-stimulierter Anstieg der "Ratio" in den Zellen der Acini und Ausführungsgänge.** Abgebildet ist die "Ratio" der Fluoreszenz (340/380 nm) zu verschiedenen Zeitpunkten einer 5-minütigen DA-Stimulierung und nach Auswaschen des DA. Die Werte werden auf die "Ratio" vor Beginn der Stimulierung normalisiert. **A** zeigt die Veränderung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration, gemessen mit dem  $Ca^{2+}$ -empfindlichen Fluoreszenzfarbstoff Fura-2. Die "Ratio" steigt während der DA-Stimulierung in den Gängen deutlich an. Sie fällt innerhalb von zehn Minuten nach Auswaschen des DA ab, ohne in diesem Zeitraum den Ruhewert wieder zu erreichen. Der Anstieg der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration in den Acini ist geringer als in den Gängen und ebenfalls im analysierten Zeitraum nicht vollständig reversibel. In **B** ist die Änderung der Autofluoreszenz in Drüsen bei identischen Meßbedingungen dargestellt. Im Vergleich zur Fura-2-beladenen Drüse sind die Änderungen minimal. Wie in der Vergrößerung zu erkennen, steigt die Autofluoreszenz sowohl in den Acini als auch in den Gängen nur geringfügig an. Für jede Drüse wird die Änderung der Fluoreszenz aus jeweils einem Bereich der Acini und der Gänge ausgewertet. Die Werte sind als MW  $\pm$  SD angegeben, n=6 (Fura) und n=10 (Autofluoreszenz).

Um zu prüfen, ob die Dauer der Belichtung einen Einfluß auf die Autofluoreszenzänderungen hat, werden die gemessenen Änderungen bei einer Belichtungszeit von 100 und 200 ms verglichen. Ein Unterschied im relativen Anstieg der "Ratio" bei den beiden Belichtungszeiten kann nicht festgestellt werden (Anstieg über den Acini auf  $2,0 \pm 1,4$  vs.  $2,3 \pm 1,1$  %).

### 3.2.3 Änderungen der Autofluoreszenz unter Meßbedingungen, welche spezifisch die Fluoreszenz von NAD(P)H und Flavoproteinen anregen

Die starke absolute Autofluoreszenz der Schabenspeicheldrüsen, welche in den geschilderten Experimenten auffiel, soll genauer charakterisiert werden. Dazu wurde die Fluoreszenz von NAD(P)H und Flavoproteinen ( $\text{FAD}^+$ ) in unstimulierten und DA-stimulierten Drüsen analysiert. Da sich die Fluoreszenz von NAD(P)H und  $\text{FAD}^+$  bei gesteigerter Stoffwechselaktivität der Zelle gegenläufig ändern, kann der Redoxzustand der Zellen durch die Bildung der "Ratio" 340 / 475 nm charakterisiert werden.

Abb. 19 illustriert am Beispiel zweier Originalmessungen die Extremfälle gemessener NAD(P)H- und  $\text{FAD}^+$ -Fluoreszenz. Bei Stimulierung mit DA kommt es sowohl in den Gängen als auch in den Acini zu einem transienten Anstieg der "Ratio". Dieser ist in den Gängen geringfügig stärker (Anstieg auf  $8,5 \pm 4,1$  % des Ruhewerts vs.  $6,6 \pm 3,9$  % in den Acini). Mit Ausnahme der in Abb. 19 A dargestellten Drüse, kommt es in beiden Bereichen immer zu einer gegenläufigen Änderung der Rohsignale.



**Abb. 19: Änderungen der Autofluoreszenz in den Zellen der Acini und Ausführgänge bei Anregung der NAD(P)H- und  $\text{FAD}^+$ -Fluoreszenz.** Dargestellt sind die Änderungen in der "Ratio" (340 / 475 nm) und der Rohsignale der Fluoreszenz zweier Drüsen, die eine sehr schwache (A) bzw. eine sehr starke (B) Reaktion zeigen. Während der 10-minütigen DA-Stimulierung steigt die "Ratio" in beiden Drüsen. Nur bei dem in B beobachteten starken Anstieg der "Ratio" kommt es zu einer gegenläufigen Veränderung der gemessenen Rohsignale bei beiden Anregungswellenlängen. Bei der in A dargestellten schwachen Reaktion bleibt das durch 340 nm angeregte Rohsignal annähernd konstant, während das bei 475 nm angeregte Rohsignal der Fluoreszenz gering abfällt. Nach Auswaschen des DA sinkt die "Ratio" in beiden Drüsen zunächst, steigt aber bereits vor Beginn der 5-HT-Stimulierung wieder an (mit Ausnahme der rot dargestellten Acinuszellen in B). Die in A dargestellte Drüse reagiert nicht auf die 5-HT-Stimulierung, während es im Gang der in B dargestellten Drüse zu einem Anstieg der "Ratio" kommt. Die Anregung von NAD(P)H erfolgt mit 340 nm, die von Flavoproteinen mit 475 nm, die Belichtungszeit beträgt 200 ms. Zur Stimulierung werden jeweils  $1 \mu\text{M}$  DA bzw. 5-HT eingesetzt.



Die bei 340 nm angeregte Fluoreszenz des NAD(P)H steigt transient an, während die bei 475 nm angeregte Fluoreszenz des FAD<sup>+</sup> geringer wird und auf einem niedrigeren Niveau annähernd konstant bleibt. Etwa 8 Minuten nach Auswaschen des DA wird der Ruhewert wieder erreicht.

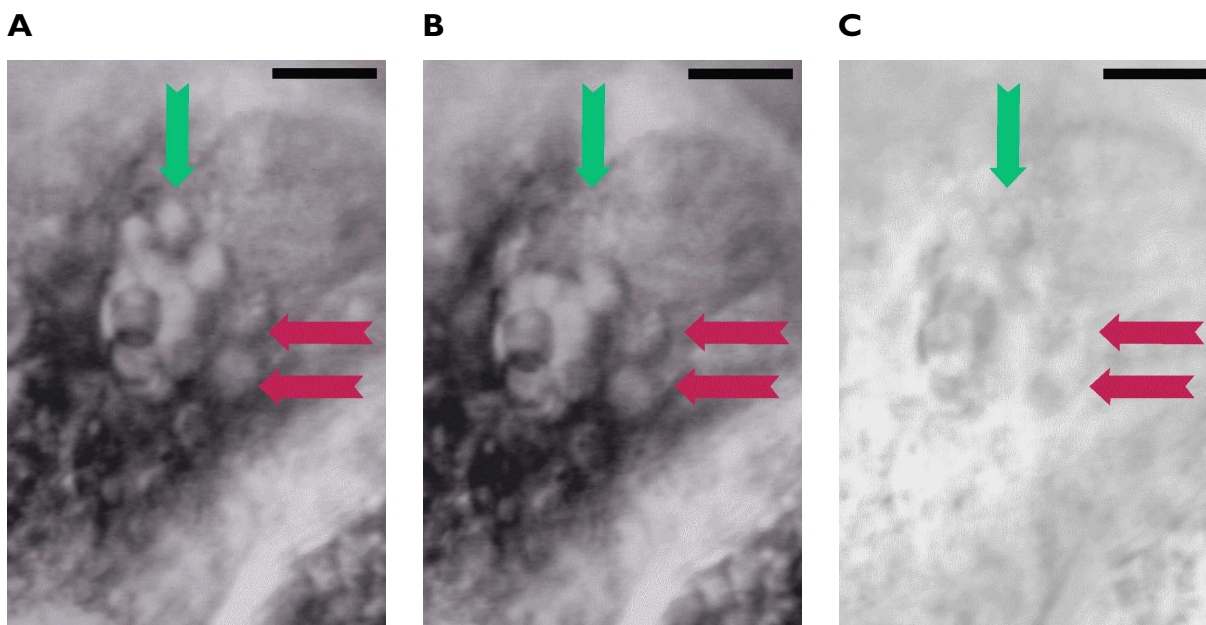
In fünf der sieben Drüsen wird in den Gängen nach Rückkehr der "Ratio" auf den Ruhewert ein erneuter geringer Anstieg der "Ratio" registriert, ohne dass die Drüsen stimuliert werden (Anstieg vom Minimalwert  $1 \pm 3 \%$  auf  $2 \pm 3 \%$ ). Dieser Anstieg der "Ratio" wird durch einen leichten Anstieg des bei 340 nm angeregten Rohsignals und / oder durch ein leichtes Abfallen des bei 475 nm angeregten Rohsignals bedingt. Die Stimulierung mit 5-HT bedingt nur in insgesamt zwei Drüsen einen deutlichen Anstieg der "Ratio", welcher durch gegenläufige Änderungen des Rohsignals ausgelöst wird. Eine Zusammenfassung der absoluten und normalisierten Änderungen der "Ratio" befindet sich im Anhang (Tab. A5).

### 3.3 Messungen der Proteinsekretion

#### 3.3.1 Vitalmikroskopische Analysen der Proteinsekretion

Es soll eine Methode etabliert werden, mit welcher die Exocytose einzelner sekretorischer Vesikel in den C-Zellen vitalmikroskopisch beobachtet und quantifiziert werden kann. Dazu sollen isolierte Zellen verwendet werden.

Nach der Dissoziation der Speicheldrüsen erhält man neben Einzelzellen vor allem kleine Grüppchen von Acinuszellen. In Abb. 20 ist exemplarisch ein Ausschnitt aus einer solchen Zellgruppe dargestellt. In den beiden Einzelbildern (A, B) sind in den Zellen Vesikel unterschiedlicher Größe zu sehen, C zeigt das Differenzbild (B - A). In ihm sind einige dunklere Stellen zu erkennen, die auf die Degranulation von Vesikeln oder auf Bewegungs-Artefakte hindeuten. Eine Exocytose ist an dem mit einem grünen Pfeil gekennzeichneten Vesikel nachzuvollziehen. Dagegen bewegen sich die mit roten Pfeilen markierten Vesikel zwischen der Aufnahme beider Bilder, so daß der Helligkeitsunterschied auf ein Bewegungs-Artefakt zurückzuführen ist. Dies ist auch in anderen Bereichen des Bildes der Fall.



**Abb. 20: Ausschnitt aus einer Gruppe isolierter Zellen während einer-Stimulierung mit 5-HT.** Bild **A** wird 1,5 Minuten nach Beginn der Stimulierung aufgenommen, Bild **B** 15 Sekunden später. **C** ist das Differenzbild (B - A). Die im Differenzbild zu erkennenden Helligkeitsunterschiede sollen auf eine Exocytose von Vesikeln hindeuten, können aber auch Bewegungs-Artefakte sein. Das mit einem grünen Pfeil gekennzeichnete Vesikel ist in Bild A eindeutig erkennbar, wohingegen es in Bild B nicht mehr zu sehen ist. In diesem Fall kann man von einer Exocytose des Vesikels ausgehen. Dagegen sind die mit einem roten Pfeil gekennzeichneten Vesikel in Bild A und B zu erkennen, allerdings haben sie sich zwischen der "Aufnahme" bewegt. In diesem Fall wird der Helligkeitsunterschied im Differenzbild nicht durch eine Degranulation verursacht, sondern ist ein Bewegungs-Artefakt. Balken: 50  $\mu$ m.

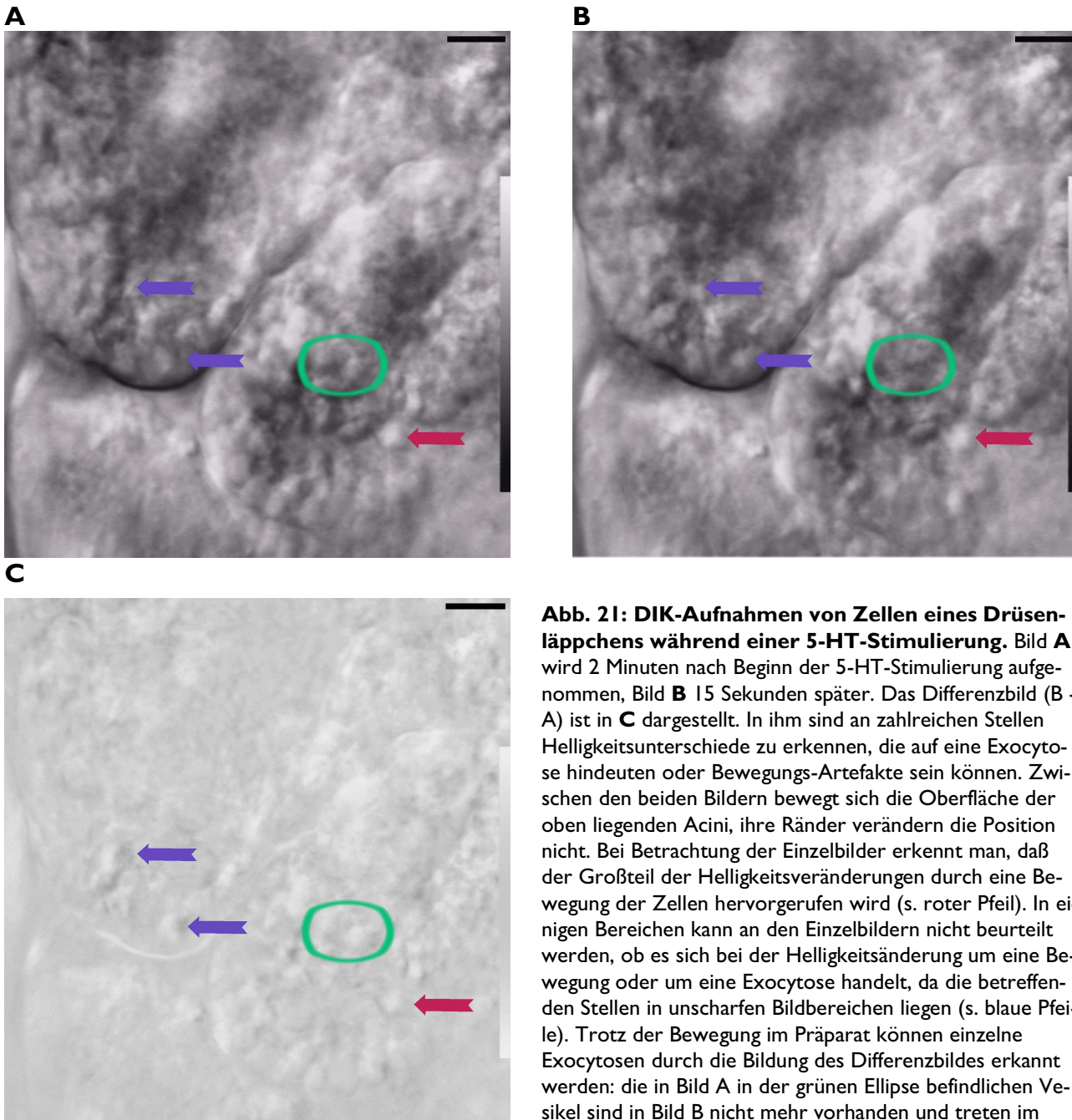
An den isolierten Zellen oder Zellgrüppchen können in wenigen Fällen eindeutige Exocytosevorgänge beobachtet werden. Dies ist (zum Teil) trotz geringfügiger Bewegungen des Präparats mög-

lich. Von den insgesamt sieben untersuchten Präparaten werden in drei Präparaten deutlich Exocytosevorgänge beobachtet, jedoch nur in wenigen der aufgenommenen Bilder. Dies erlaubt keine zuverlässige Quantifizierung der Exocytoserate, wie sie für die Charakterisierung der 5-HT-stimulierten Exocytose nötig wäre. Der Großteil der Helligkeitsunterschiede in den Differenzbildern beruht leider ausschließlich auf einer Bewegung von Bildbereichen oder des gesamten Präparats.

Als Kontrolle, ob die Zellen aufgrund der enzymatischen Dissoziation des Gewebes nur eine geringe Exocytoserate zeigen, werden die Versuche mit Drüsenläppchen wiederholt. Abb. 21 zeigt exemplarisch Bilder von C-Zellen eines Drüsenläppchens während einer 5-HT-Stimulierung. Wiederum ist nur ein Teil der im Differenzbild (C) zu erkennenden Helligkeitsänderungen auf Exocytosen zurückzuführen (z. B. die Vesikel in der grünen Ellipse). Der Großteil der Helligkeitsänderungen beruht erneut auf Bewegungen des Präparats (rote Pfeile), oder es kann anhand der Einzelbilder nicht eindeutig beurteilt werden, ob es zu einer Exocytose kommt (blaue Pfeile). Die mit roten Pfeilen gekennzeichneten Bewegungs-Artefakte beruhen nicht auf einer Bewegung des gesamten Präparats, sondern nur auf einer in Teilen des Präparats, da sich die sichtbaren Ränder der beiden oberen Acini zwischen den Bildern nicht verschieben. Im weiteren Verlauf des Versuchs verändert sich die Form der Acini, die Vesikelfüllung der C-Zellen erscheint auch nach 30 Minuten noch unverändert.

Insgesamt werden sieben Versuche mit Drüsenläppchen durchgeführt. Nur in dem hier dargestellten können eindeutig Exocytosen beobachtet werden. Die in allen anderen Präparaten beobachteten Helligkeitsänderungen müssen auf Bewegungs-Artefakte zurückgeführt werden.

In vier Kontrollmessungen, bei denen die Drüsen nur mit Ringer überspült werden, kommt es nicht zu Exocytosen. Beobachtete Helligkeitsänderungen sind ausschließlich auf Bewegungs-Artefakte in den Präparaten zurückzuführen.

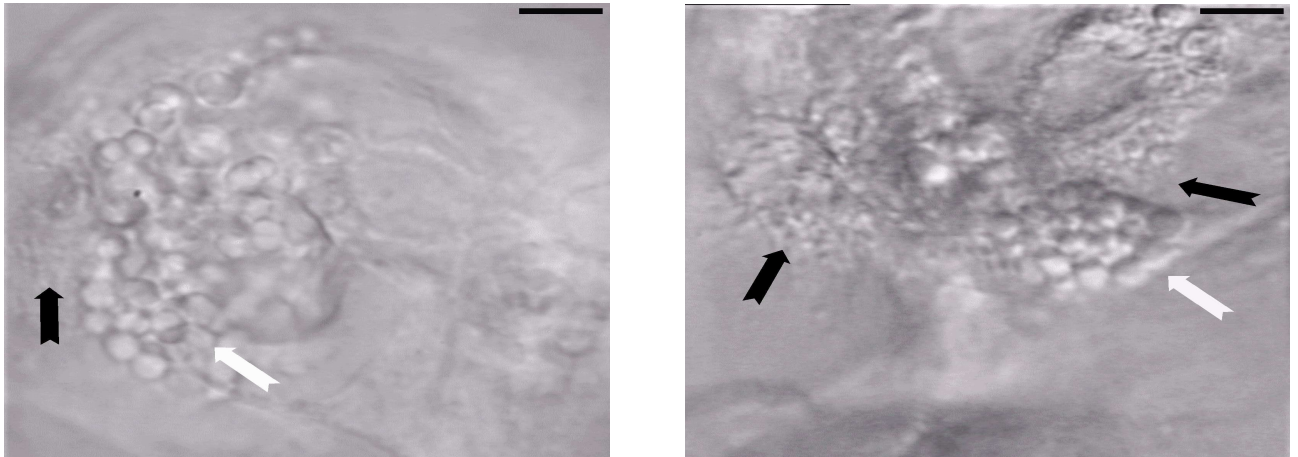


**Abb. 21: DIK-Aufnahmen von Zellen eines Drüsenläppchens während einer 5-HT-Stimulierung.** Bild **A** wird 2 Minuten nach Beginn der 5-HT-Stimulierung aufgenommen, Bild **B** 15 Sekunden später. Das Differenzbild (B - A) ist in **C** dargestellt. In ihm sind an zahlreichen Stellen Helligkeitsunterschiede zu erkennen, die auf eine Exocytose hindeuten oder Bewegungs-Artefakte sein können. Zwischen den beiden Bildern bewegt sich die Oberfläche der oben liegenden Acini, ihre Ränder verändern die Position nicht. Bei Betrachtung der Einzelbilder erkennt man, daß der Großteil der Helligkeitsveränderungen durch eine Bewegung der Zellen hervorgerufen wird (s. roter Pfeil). In einigen Bereichen kann an den Einzelbildern nicht beurteilt werden, ob es sich bei der Helligkeitsänderung um eine Bewegung oder um eine Exocytose handelt, da die betreffenden Stellen in unscharfen Bildbereichen liegen (s. blaue Pfeile). Trotz der Bewegung im Präparat können einzelne Exocytosen durch die Bildung des Differenzbildes erkannt werden: die in Bild A in der grünen Ellipse befindlichen Vesikel sind in Bild B nicht mehr vorhanden und treten im Differenzbild C deutlich hervor. Ebenso verhält es sich für die Gruppe von vier kleineren Vesikeln rechts, leicht unterhalb der grünen Ellipse. Balken: 50  $\mu\text{m}$

In den Versuchen unterscheidet sich die Füllung der C-Zellen mit Vesikeln zwischen Beginn und Ende der 10- 45 Minuten dauernden 5-HT-Stimulierung nicht deutlich. Es ist nicht sicher, ob dies an einer mangelnden sekretorischen Aktivität der Drüsen liegt, da nicht beobachtet werden kann, ob die Drüsen während der 5-HT-Stimulierung proteinhaltigen Speichel sezernierten. Deshalb wird ein weiteres Kontrollexperiment durchgeführt.

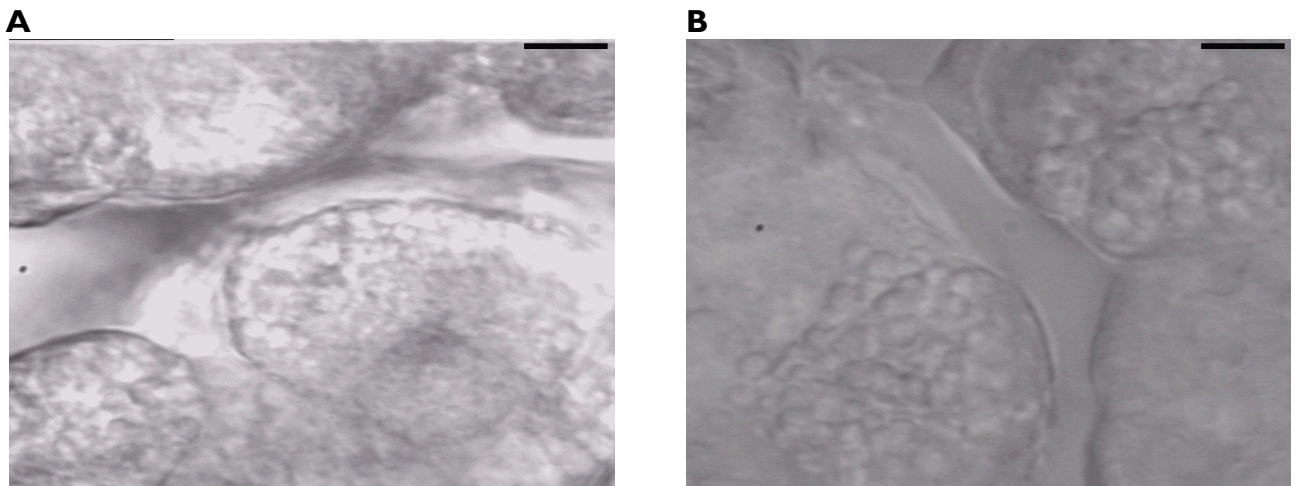
Eine Speicheldrüse wird während 45 Minuten in dem für die Messung der Flüssigkeitssekretion benutzten Wännchen mit 1  $\mu\text{M}$  5-HT stimuliert. Die Drüse sezernierte 45 Minuten lang Speichel. Aufgrund der hohen Viskosität des Speichels ist es sicher, daß dieser Proteine enthält. Abb. 22

zeigt exemplarisch Zellen nach dieser 5-HT-Stimulierung. Es sind Bereiche zu erkennen, in denen große Vesikel deutlich an der Oberfläche hervortreten, allerdings auch solche, in denen nur sehr kleine oder gar keine Vesikel zu erkennen sind.



**Abb. 22: DIK-Aufnahme von Zellen eines Drüsenläppchens nach 45-minütiger Stimulierung mit 1  $\mu\text{M}$  5-HT.** In einigen Zellbereichen sind an der Oberfläche deutlich große Vesikel zu erkennen (weiße Pfeile), während in anderen Zellbereichen keine oder nur kleine Vesikel (schwarze Pfeile) zu sehen sind. Balken: 50  $\mu\text{m}$

In einem weiteren Kontrollexperiment soll untersucht werden, ob es durch eine 5-HT-Stimulierung überhaupt zu einer sichtbaren Verringerung der Vesikeldichte in den C-Zellen kommt. Dazu wird eine Drüse präpariert und die beiden Lappen unterschiedlich behandelt: der erste wird 45 Minuten lang in 1  $\mu\text{M}$  oxygeniertes 5-HT gelegt, der zweite liegt während des gleichen Zeitraums in oxygeniertem Ringer. Anschließend werden Läppchen von beiden in dem Wännchen festgeklebt und die Füllung der C-Zellen mit Vesikeln unter dem Mikroskop analysiert. In beiden Fällen sind die C-Zellen noch dicht mit Vesikeln gefüllt (s. Abb. 23). Nach der 5-HT-Stimulierung treten diese eventuell deutlicher an der Oberfläche hervor.



**Abb. 23: Vergleich der Vesikeldichte in den C-Zellen unstimulierter und 5-HT-stimulierter Drüsen.** Jeweils ein Drüsenlappen wird 45 Minuten lang in oxygeniertem Ringer (A) oder 1  $\mu\text{M}$  5-HT (B) inkubiert. In beiden Bildern sind die Zellen noch dicht mit Vesikeln gefüllt, wobei diese nach der Inkubation in 5-HT eventuell deutlicher an der Oberfläche der Zellen hervortreten. Balken: 50  $\mu\text{m}$

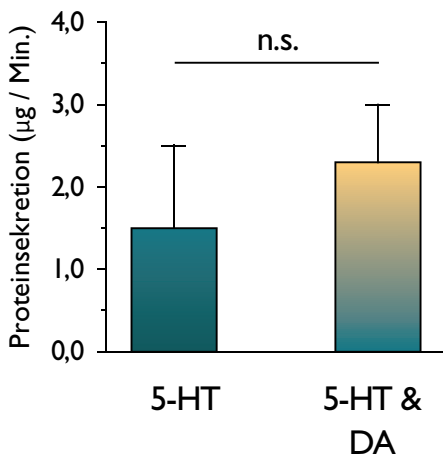
Die C-Zellen der Schabenspeicheldrüse sind auch nach einer anhaltenden 5-HT-Stimulierung noch dicht mit Vesikeln gefüllt. Deshalb und vor allem aufgrund von Problemen mit der Bewegung des Präparats, ist die Charakterisierung und Quantifizierung der Proteinsekretion mit der vitalmikroskopischen Beobachtung nicht möglich. Im folgenden soll deshalb die Proteinsekretion ausschließlich durch eine biochemische Bestimmung des Proteingehalts im Endspeichel charakterisiert werden.

### 3.3.2 Biochemische Proteinbestimmungen

#### b3.3.2.1 Beeinflußt DA die 5-HT-stimulierte Proteinsekretion?

In den folgenden Experimenten soll getestet werden, ob die Erhöhung der intrazellulären Konzentration verschiedener Botenstoffe ( $\text{Ca}^{2+}$ , cAMP, cGMP) eine Proteinsekretion aktiviert. Hierbei ist zunächst unerheblich, ob die Botenstoffe auch eine Flüssigkeitssekretion aktivieren können. Die Messung der Proteinsekretion ist nur möglich, wenn ein ständiger Speichelfluß stattfindet, welcher in allen Experimenten durch eine Hintergrundstimulierung mit  $1 \mu\text{M}$  DA gewährleistet wird.

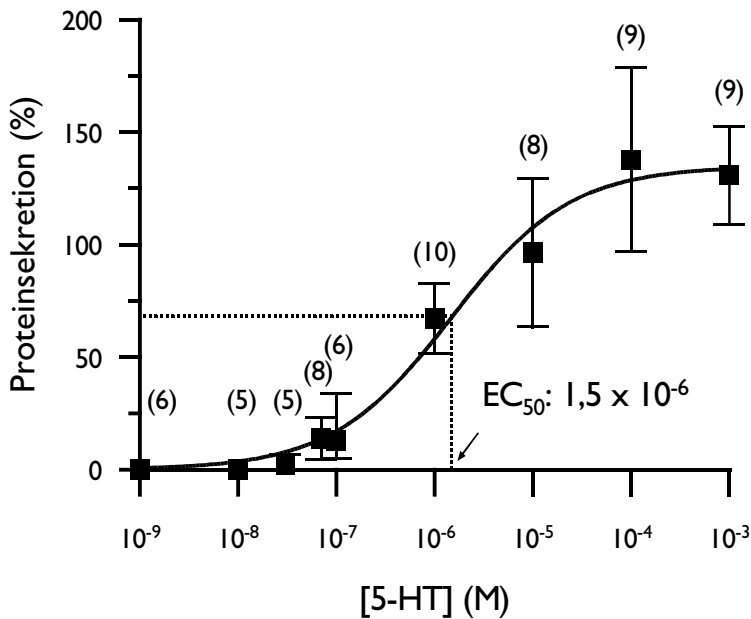
Für die Interpretation dieser Experimente ist wichtig, daß DA die 5-HT-stimulierte Proteinsekretion nicht beeinflusst. Um dieses zu testen, werden die maximalen Raten der Proteinsekretion nach Stimulierung mit  $1 \mu\text{M}$  5-HT in Anwesenheit und Abwesenheit von  $1 \mu\text{M}$  DA miteinander verglichen (Abb. 24). Die durch  $1 \mu\text{M}$  5-HT stimulierte Proteinsekretion beträgt  $1,5 \pm 1,0 \mu\text{g}/\text{Min.}$  In Anwesenheit von DA ist die Proteinsekretion zwar stärker ( $2,3 \pm 0,7 \mu\text{g}/\text{Min.}$ ), der Unterschied ist jedoch statistisch nicht signifikant. DA beeinflusst die 5-HT-stimulierte Proteinsekretion also nicht nennenswert.



**Abb. 24: 5-HT-stimulierte Proteinsekretion in Anwesenheit und Abwesenheit von DA.** Die Abbildung zeigt, daß sich die maximale Rate der durch  $1 \mu\text{M}$  5-HT stimulierten Proteinsekretion in Anwesenheit von DA (türkiser Balken) nicht signifikant von der in Abwesenheit von DA (türkis-gelber Balken) unterscheidet. Angegeben sind MW  $\pm$  SD, n=8 (5-HT), n=5 (DA & 5-HT), n.s.:  $p > 0,05$ ; Mann-Whitney U-Test.

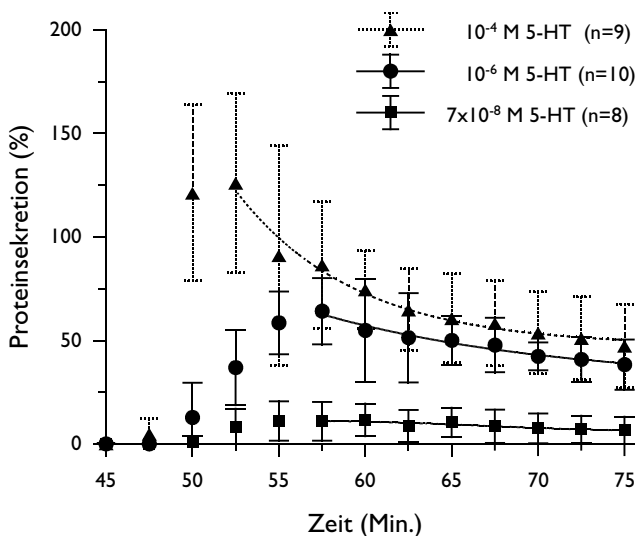
### 3.3.2.2 Dosis-Wirkungskurve

In Abb. 25 wird die Abhängigkeit der Proteinsekretion von der 5-HT-Konzentration, mit der die Drüsen stimuliert werden, dargestellt. Der Schwellenwert für die Proteinsekretion liegt bei  $3 \times 10^{-8}$  M 5-HT. Die maximale Proteinsekretion beträgt bei dieser 5-HT-Konzentration  $0,1 \pm 0,2$   $\mu\text{g}/\text{Min}$ . Die halbmaximale Proteinsekretion ( $EC_{50}$ ) wird bei Stimulierung mit  $1,5 \times 10^{-6}$  M, die Sättigung bei Stimulierung mit  $10^{-4}$  M 5-HT erreicht. Die absoluten und relativen Werte der Proteinsekretion sind im Anhang zusammengefaßt (Tab. A6).



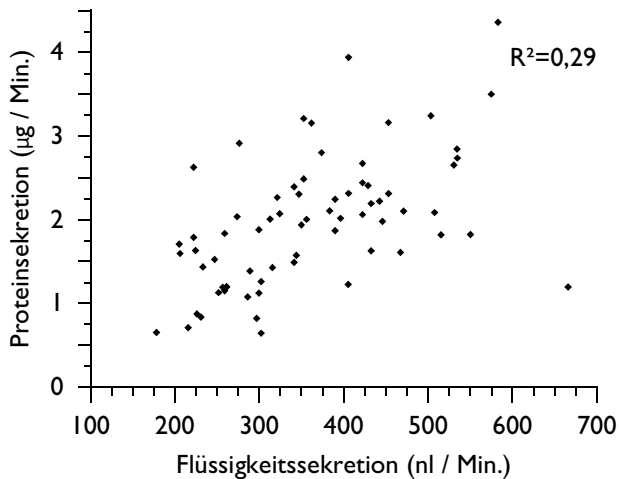
**Abb. 25: Dosis-Wirkungskurve der Proteinsekretion.** Dargestellt ist die Proteinsekretion nach Stimulierung mit unterschiedlichen 5-HT-Konzentrationen, die Werte werden auf die maximale Proteinsekretion der jeweiligen Drüsen während einer vorangegangenen Stimulierung mit  $1 \mu\text{M}$  5-HT normalisiert. Angegeben sind  $\text{MW} \pm \text{SD}$  der Proteinsekretion (%), die Zahlen in Klammern geben die Anzahl getesteter Drüsen (n) bei der jeweiligen 5-HT-Konzentration an.

Die maximale Rate der Proteinsekretion hängt von der zur Stimulierung verwendeten 5-HT-Konzentration ab. In Abb. 26 ist die Proteinsekretion während der zweiten Stimulierung mit drei verschiedenen 5-HT-Konzentrationen dargestellt. Bei der niedrigsten 5-HT-Konzentration ( $7 \times 10^{-8}$  M) ist die Rate der Proteinsekretion gering, und erfolgt über 30 Minuten annähernd konstant. Mit steigender 5-HT-Konzentration steigt nicht nur die maximale Rate der Proteinsekretion, es zeigen sich auch Unterschiede in der Kinetik: die maximale Sekretion findet früher statt, und sie verläuft deutlich transient.



**Abb. 26: Kinetik der Proteinsekretion bei Stimulierung mit unterschiedlichen 5-HT-Konzentrationen.** Dargestellt ist die Proteinsekretion bei Stimulierung mit  $7 \times 10^{-8}$ ,  $10^{-6}$  und  $10^{-4}$  M 5-HT. Alle Werte werden auf die maximale Proteinsekretion während einer vorangegangenen Stimulierung mit  $1 \mu\text{M}$  5-HT normalisiert, angegeben sind  $\text{MW} \pm \text{SD}$ . Vom Maximum der Proteinsekretion ausgehend wird eine nicht-lineare Regression nach der Boltzmann-Gleichung durch die Werte berechnet. Nähere Erläuterung der Ergebnisse im Text.

Die Rate der Proteinsekretion könnte unabhängig von der zur Stimulierung verwendeten 5-HT-Konzentration auch von der Rate der Flüssigkeitssekretion abhängen. Ob es eine derartige Korrelation gibt, wird anhand der Raten der Proteinsekretion während der ersten 5-HT-Stimulierungen (immer mit 1  $\mu\text{M}$  5-HT) aller Drüsen getestet (Abb. 27). Die Werte streuen sehr stark, weshalb der Korrelationskoeffizient nur eine schwache Korrelation der Werte anzeigt. Diese schwache Korrelation ist jedoch statistisch signifikant (genauer zur Auswertung s. Abb. A3 im Anhang).



**Abb. 27: Korrelation zwischen den Raten der Protein- und Flüssigkeitssekretion.** Aufgetragen sind die Raten der maximalen Proteinsekretion, die während der ersten 5-HT-Stimulierung aller Drüsen (1  $\mu\text{M}$  5-HT; n=69) gemessen werden, sowie die zugehörigen Raten der Flüssigkeitssekretion. Der angegebene Korrelationskoeffizient (Spearman R) zeigt, daß es keine starke, aber eine dennoch signifikante Korrelation zwischen den Daten gibt.

Die Raten der Proteinsekretion werden also von zwei Faktoren beeinflusst: (1) von der zur Stimulierung verwendeten 5-HT-Konzentration und (2) in geringem Umfang von den Raten der Flüssigkeitssekretion. Außerdem beeinflusst die verwendete 5-HT-Konzentration auch die Kinetik der Proteinsekretion.

### **3.3.2.3 Welche Signalwege aktivieren die Proteinsekretion?**

In den nachfolgend beschriebenen Experimenten wird getestet, ob eine Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -, cAMP- und / oder cGMP-Konzentration die Kinetik der 5-HT-stimulierten Proteinsekretion qualitativ und quantitativ imitiert. Während einer Teststimulierung werden Substanzen appliziert, welche intrazellulär die verschiedenen Botenstoff-Konzentrationen erhöhen. Als nachfolgende Kontrolle wird immer mit 1  $\mu\text{M}$  5-HT stimuliert.

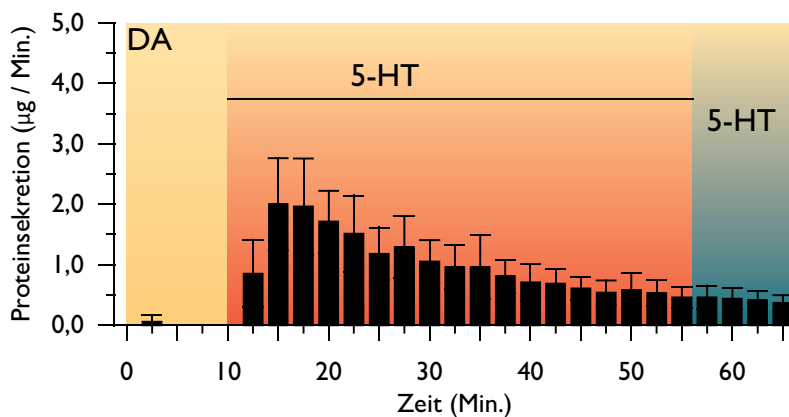
#### **3.3.2.3.1 Kinetik der Proteinsekretion**

Zur qualitativen Beurteilung der Kinetik der Proteinsekretion wird der Mittelwert der Proteinsekretion eines jeden Intervalls im jeweiligen Experiment herangezogen und mit dem in Abb. 28 dargestellten Verlauf verglichen.



### 3.3.2.3.1.1 5-HT stimulierte Proteinsekretion

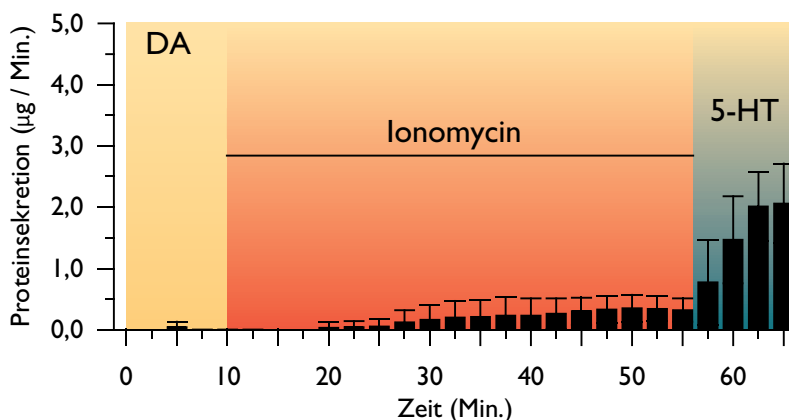
Abb. 28 zeigt die Kinetik der 5-HT-stimulierten Proteinsekretion unter den hier verwendeten experimentellen Bedingungen. Die Proteinsekretion hat während der 45 Minuten dauernden Teststimulierung einen transienten Zeitverlauf. Die maximale Proteinsekretion erfolgt  $8 \pm 2$  Minuten nach Beginn der 5-HT-Stimulierung. Während der Kontrollstimulierung (ab Minute 55, türkis unterlegter Bereich in Abb. 28) erfolgt kein weiterer Anstieg der Proteinsekretion. Dieser Umstand erscheint in dem abgebildeten Experiment trivial. Er ist jedoch in den folgenden Experimenten bedeutsam, in denen während der Teststimulierung zwischen Minute 10 und 55 nicht mit 5-HT, sondern mit anderen Substanzen stimuliert wird. In all diesen Experimenten ist die nachfolgende Stimulierung mit 5-HT eine interne Kontrolle, ob die getesteten Substanzen die Proteinsekretion genauso effektiv stimulieren wie 5-HT, so daß die nachfolgende 5-HT-Stimulierung keine signifikante Verstärkung der Proteinsekretion mehr auslösen kann.



**Abb. 28: Proteinsekretion nach Stimulierung mit 5-HT.** Im dargestellten Experiment wird sowohl während der Teststimulierung (rot unterlegt und mit einem waagerechten Strich gekennzeichnet) als auch während der Kontrollstimulierung (türkis unterlegt)  $1 \mu\text{M}$  5-HT appliziert. MW  $\pm$  SD der Proteinsekretion ( $\mu\text{g}/\text{Min.}$ ),  $n=12$ .

### 3.3.2.3.1.2 Proteinsekretion nach Erhöhung der intrazellulären $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration

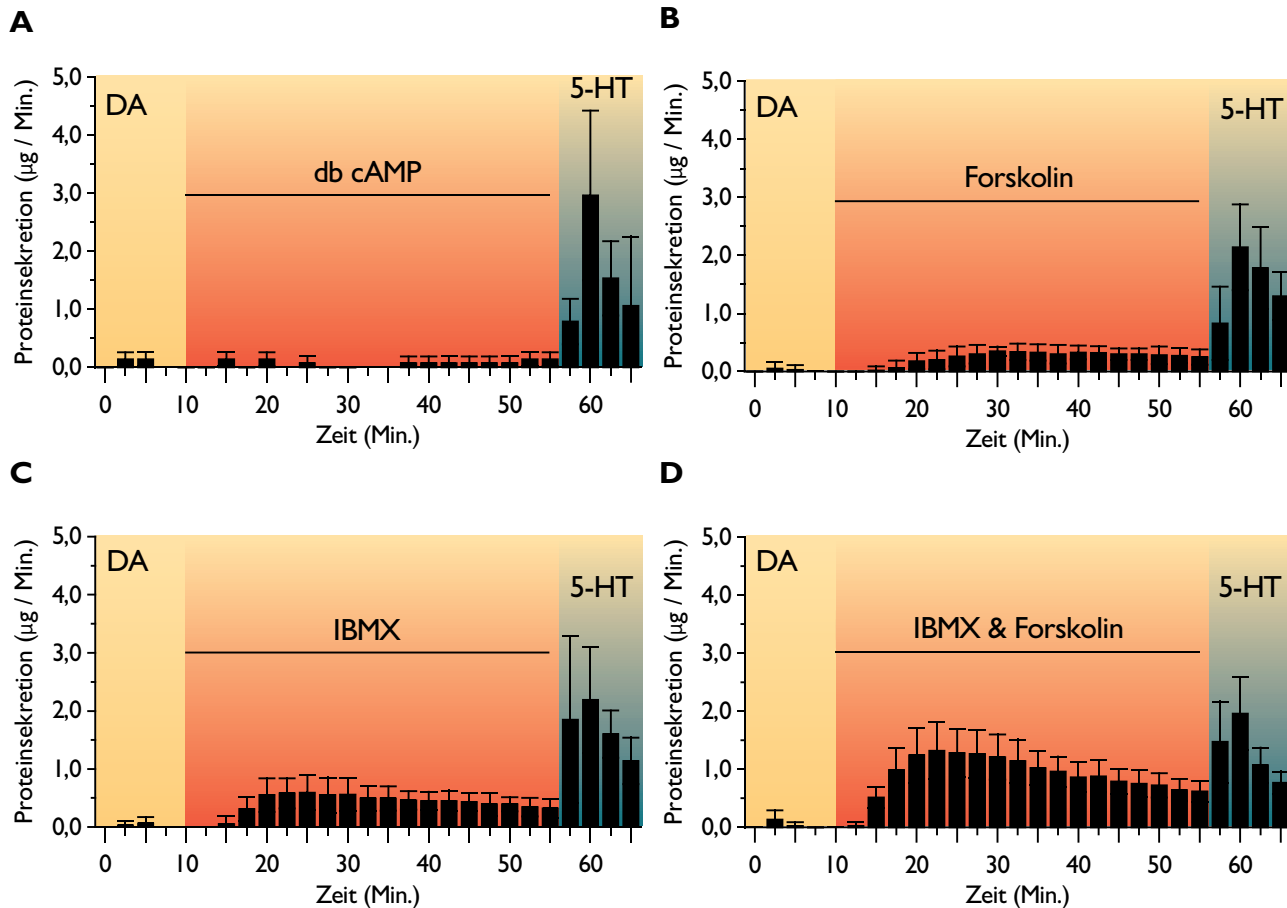
Abb. 29 zeigt, daß nach Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration mit  $5 \mu\text{M}$  Ionomycin die Proteinsekretion langsam einsetzt und quantitativ nur eine geringe Proteinsekretion aktiviert. Während der Kontrollstimulierung mit  $1 \mu\text{M}$  5-HT steigt die Proteinsekretion deutlich an.



**Abb. 29: Proteinsekretion bei Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration.** Eine meßbare Proteinsekretion beginnt 10 Minuten nach Applikation von Ionomycin und steigt während der Versuchsdauer langsam bis zu Minute 50 an. Die nachfolgende Kontrollstimulierung mit  $1 \mu\text{M}$  5-HT bewirkt eine deutliche Steigerung der Proteinsekretion. MW  $\pm$  SD der Proteinsekretion ( $\mu\text{g}/\text{Min.}$ ),  $n=6$ .

### 3.3.2.3.1.3 Proteinsekretion nach Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration

Vorversuche haben gezeigt, daß nach Stimulierung mit cAMP proteinhaltiger Speichel abgegeben wird. Bei einer Teststimulierung mit dem membranpermeablen cAMP-Analogon db cAMP wird eine geringe Proteinsekretion ausgelöst, die allerdings nicht über die gesamte Phase der Teststimulierung nachgewiesen werden kann (Abb. 30 A). Andere Möglichkeiten, die intrazelluläre cAMP-Konzentration zu erhöhen, sind die Aktivierung der cAMP-bildenden Adenylatcyclase mit Forskolin oder die Hemmung von cAMP- und cGMP-abbauenden Phosphodiesterasen mit IBMX. Beide Substanzen aktivieren eine geringfügige Proteinsekretion, die kein deutliches Maximum aufweist (Abb. 30 B & C).



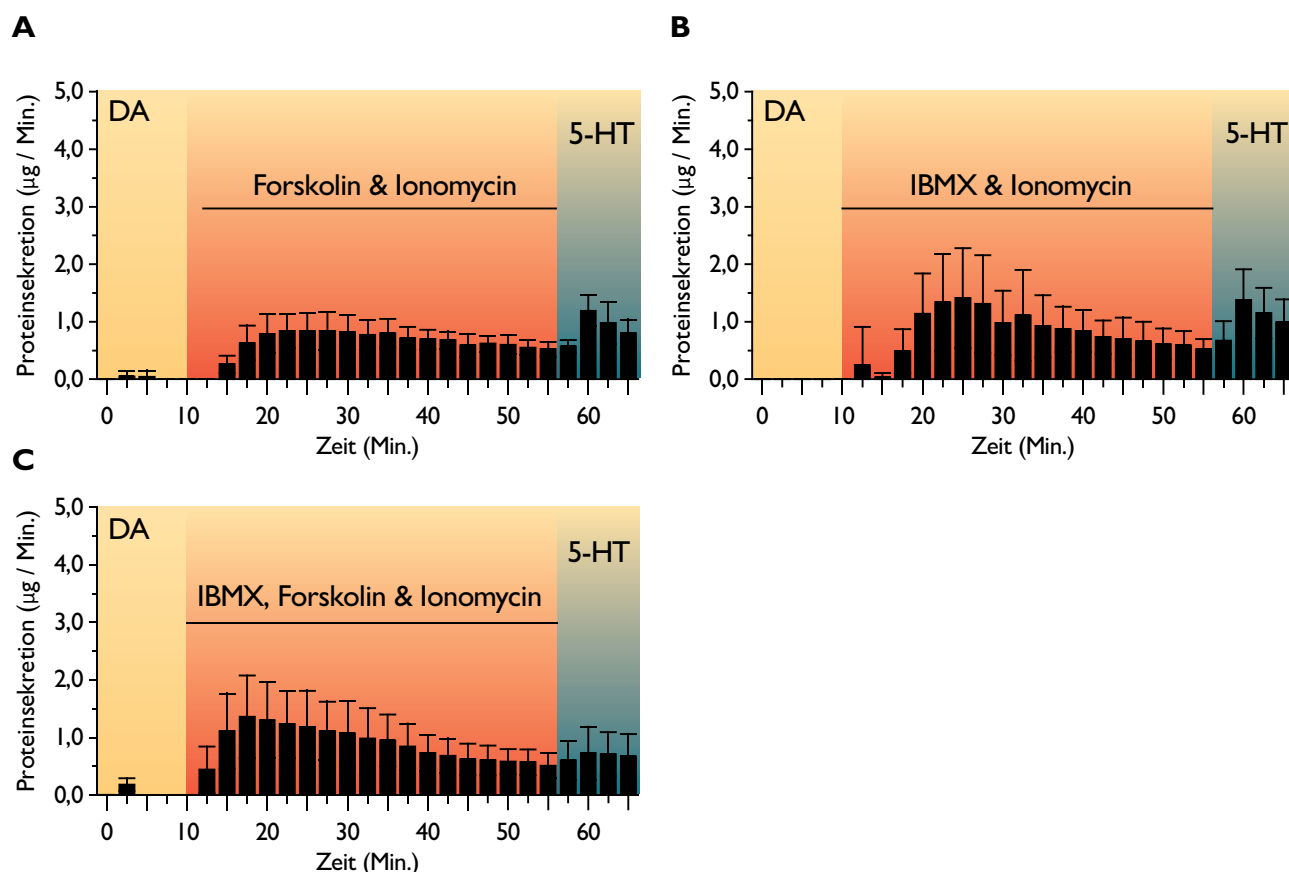
**Abb. 30: Proteinsekretion bei Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration.** Stimulierung mit 10 mM db cAMP (**A**, n=3) bewirkt eine sehr geringe, nicht über die gesamte Dauer der Teststimulierung meßbare Proteinsekretion. Bei Stimulierung der Adenylatcyclase mit 100 µM Forskolin (**B**, n=9), Hemmung der Phosphodiesterasen mit 100 µM IBMX (**C**, n=8) oder Applikation von beiden Substanzen gleichzeitig (**D**, n=9), wird eine über die Dauer der Teststimulierung meßbare Proteinsekretion ausgelöst. Diese bleibt bei Stimulierung mit nur einer Substanz (B, C) über den Versuchszeitraum konstant, bei Stimulierung mit beiden Substanzen gleichzeitig (D) ist die Proteinsekretion stärker und verläuft transient. In allen Experimenten steigert die anschließende Kontrollstimulierung mit 1 µM 5-HT die Proteinsekretion. MW ± SD der Proteinsekretion (µg/Min.).

Die alleinige Aktivierung der cAMP-Bildung oder des cAMP-Abbaus sind eventuell nicht ausreichend für eine effektive Steigerung der intrazellulären cAMP-Konzentration. Deshalb wird ein Experiment durchgeführt, bei dem gleichzeitig IBMX und Forskolin appliziert wird (Abb. 30 D). Dabei wurde eine stärkere Proteinsekretion mit einem deutlichen Maximum stimuliert. In allen Experimenten, in denen die intrazelluläre cAMP-Konzentration erhöht wird, wird die Proteinsekretion während der abschließenden Kontrollstimulierung mit 1 µM 5-HT verstärkt (Abb. 30 A-D, türkis unterlegter Bereich).

### 3.3.2.3.1.4 Proteinsekretion nach gleichzeitiger Erhöhung der intrazellulären $\text{Ca}^{2+}$ - und cAMP-Konzentrationen

Durch Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ - oder cAMP-Konzentration ist es nicht möglich, alle Aspekte der durch 5-HT stimulierten Proteinsekretion zu imitieren. Deshalb wird nun getestet, ob die Proteinsekretion durch gleichzeitige Erhöhung der Konzentrationen beider Botenstoffe verstärkt wird und die durch 5-HT-Stimulierung hervorgerufene Proteinsekretion quantitativ und qualitativ imitiert.

Bei gleichzeitiger Aktivierung der Adenylatcyclase mit Forskolin und Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (Abb. 31 A) steigt die Rate der Proteinsekretion im Vergleich zur Stimulierung mit nur einer der beiden Substanzen in etwa additiv an (die absoluten Werte befinden sich in Tab. A7 im Anhang). Die maximale Rate der Proteinsekretion wird früher erreicht, und der Verlauf ist leicht transient. Bei gleichzeitiger Hemmung der Phosphodiesterasen mit IBMX und Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (Abb. 31 B) wird die Proteinsekretion mehr als nur additiv verstärkt. Sie zeigt ein deutliches Maximum und einen transienten Verlauf. Die nachfolgende Kontrollstimulierung mit 5-HT bewirkt in diesen beiden Experimenten eine Steigerung der Proteinsekretion (türkis unterlegter Bereich in Abb. 31).

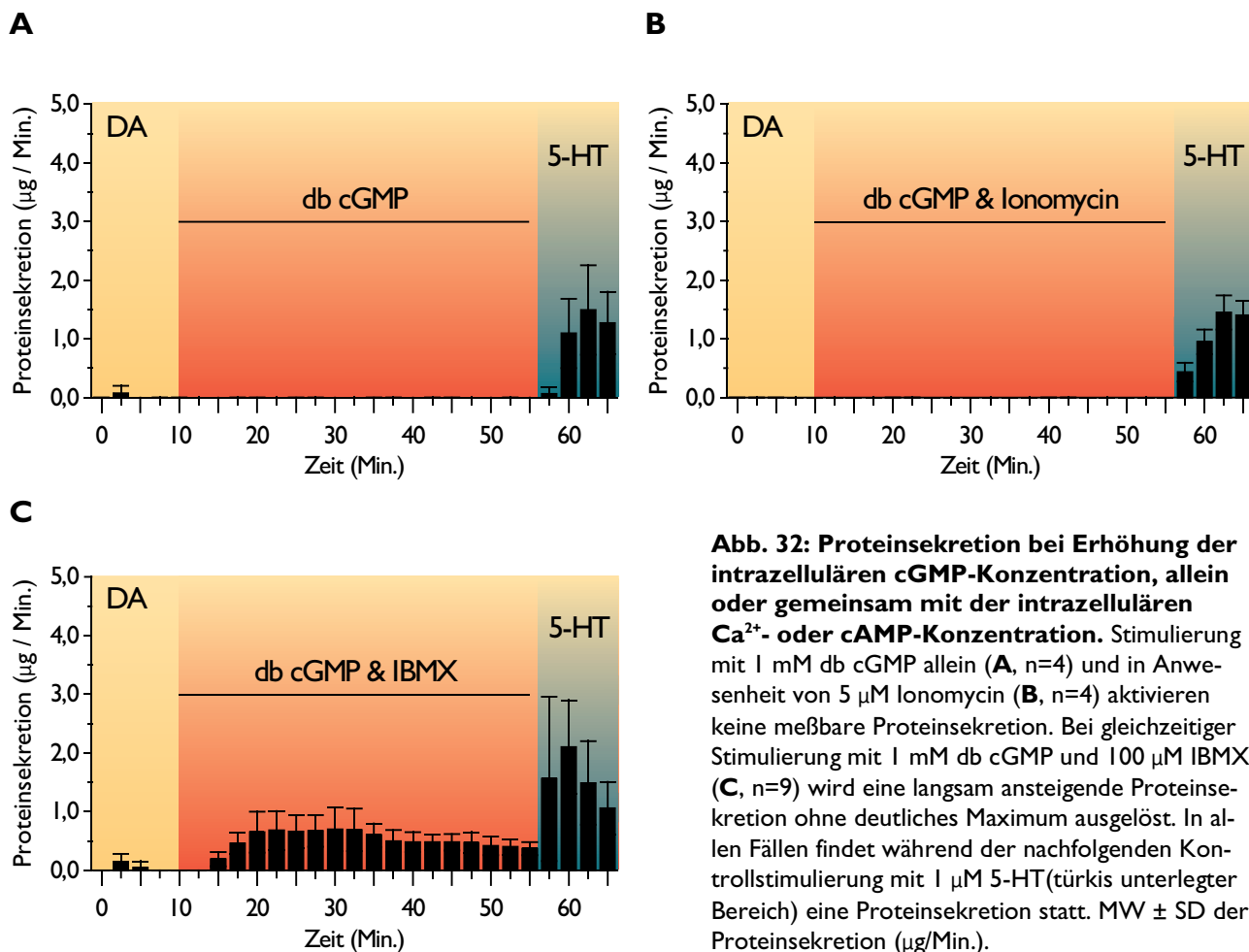


**Abb. 31: Proteinsekretion bei gleichzeitiger Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ - und cAMP-Konzentrationen.** Stimulierung mit 100  $\mu\text{M}$  Forskolin und 5  $\mu\text{M}$  Ionomycin (**A**,  $n=8$ ) löst eine langsam ansteigende Proteinsekretion aus, die nur leicht transient verläuft. Bei Stimulierung mit 100  $\mu\text{M}$  IBMX und 5  $\mu\text{M}$  Ionomycin (**B**,  $n=7$ ) ist die Proteinsekretion stärker und hat ein ausgeprägtes Maximum. Bei den nachfolgenden Kontrollstimulierungen steigt die Rate der Proteinsekretion an. Bei einer Teststimulierung mit 100  $\mu\text{M}$  IBMX, 100  $\mu\text{M}$  Forskolin und 5  $\mu\text{M}$  Ionomycin (**C**,  $n=8$ ) wird das Maximum der Proteinsekretion früher erreicht, sie verläuft transient und steigt bei der nachfolgenden Kontrollstimulierung nicht deutlich an. MW  $\pm$  SD der Proteinsekretion ( $\mu\text{g}/\text{Min.}$ ).

Als nächstes wird getestet, ob sich auch die durch simultane Applikation von IBMX und Forskolin ausgelöste Proteinsekretion durch eine zusätzliche Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration steigern läßt. (Abb. 31 C). Dafür werden die Drüsen mit Forskolin, IBMX & Ionomycin stimuliert. Die Rate der Proteinsekretion und ihr transientser Verlauf entsprechen denen ohne gleichzeitige Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (s. Abb. 30 D). Die maximale Proteinsekretion findet etwa fünf Minuten früher statt. Im Unterschied zu allen anderen applizierten Substanzen (außer 5-HT), kommt es in diesem Experiment nicht zu einer deutlichen Steigerung der Proteinsekretion während der Kontrollstimulierung (türkis unterlegter Bereich in Abb. 31).

### 3.3.2.3.1.5 Proteinsekretion nach Erhöhung der intrazellulären cGMP-Konzentration allein oder gleichzeitig mit der intrazellulären $\text{Ca}^{2+}$ - oder cAMP-Konzentration

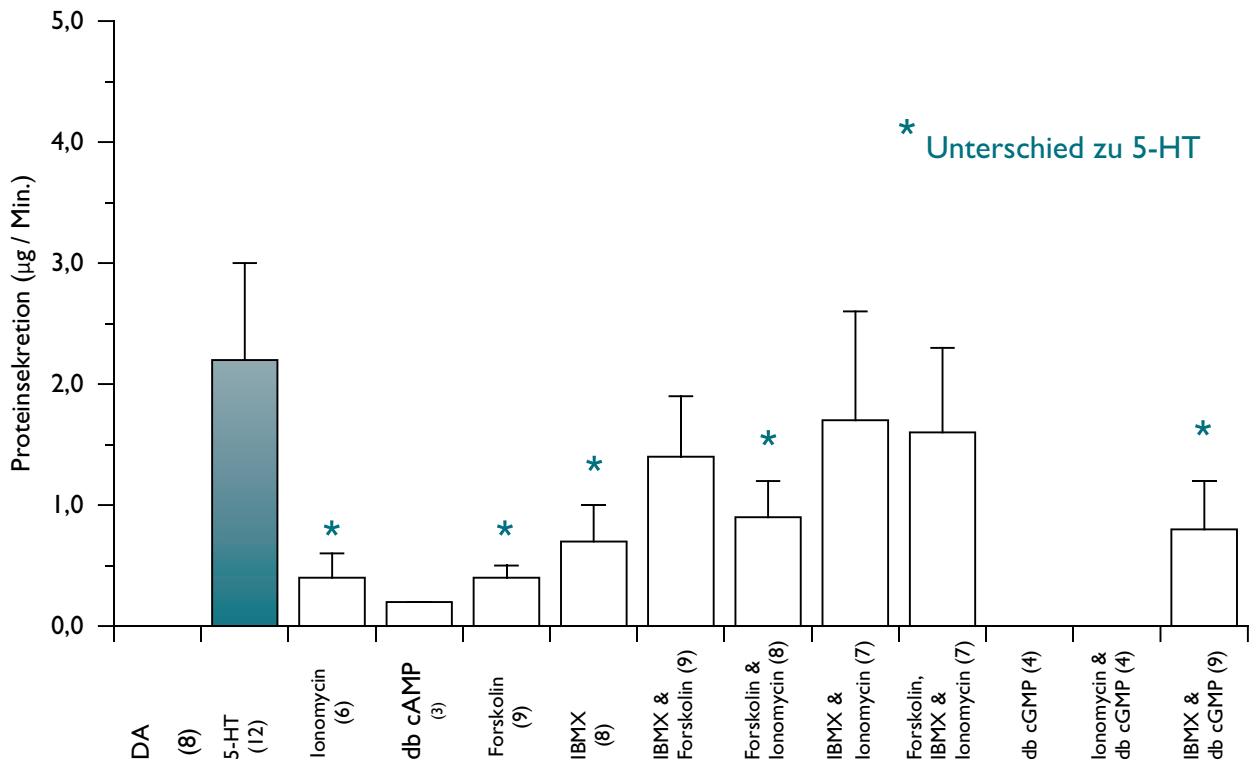
Die Stimulierung mit dem membranpermeablen cGMP Analogon db cGMP (Abb. 32 A), und auch die gleichzeitige Applikation von db cGMP und Ionomycin (Abb. 32 B) lösen keine Proteinsekretion aus. Durch eine Stimulierung mit db cGMP und IBMX (Abb. 32 C) wird eine langsam ansteigende Proteinsekretion aktiviert, deren Verlauf leicht transient ist.



### 3.3.2.3.2 Kinetik der Proteinsekretion (quantitative Aspekte)

Bislang wird der zeitliche Verlauf der Proteinsekretion nur qualitativ beschrieben. Im folgenden soll die Quantität der Proteinsekretion in den verschiedenen Experimenten miteinander verglichen werden. Dazu wird für jede Drüse eines Experiments das Intervall mit der maximalen Proteinsekretion herangezogen. Unter maximaler Proteinsekretion verstehe ich im folgenden den aus diesen Intervallen berechneten Mittelwert. Eine Zusammenfassung der absoluten Werte befindet sich in Tab. A7 im Anhang.

Die maximale Proteinsekretion der **Teststimulierungen** aller Experimente ist in Abb. 33 zusammengefaßt. Erwartungsgemäß stimuliert 5-HT (türkisfarbener Balken) die höchste Proteinsekretion. Imitiert wird diese durch Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration mittels IBMX & Forskolin sowie der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>- und cAMP-Konzentration mittels IBMX, Forskolin & Ionomycin und IBMX & Ionomycin. In allen anderen Experimenten wird eine signifikant geringere Proteinsekretion ausgelöst, die eine durch 5-HT stimulierte also nicht imitiert (gekennzeichnet durch die grünen Sternchen).



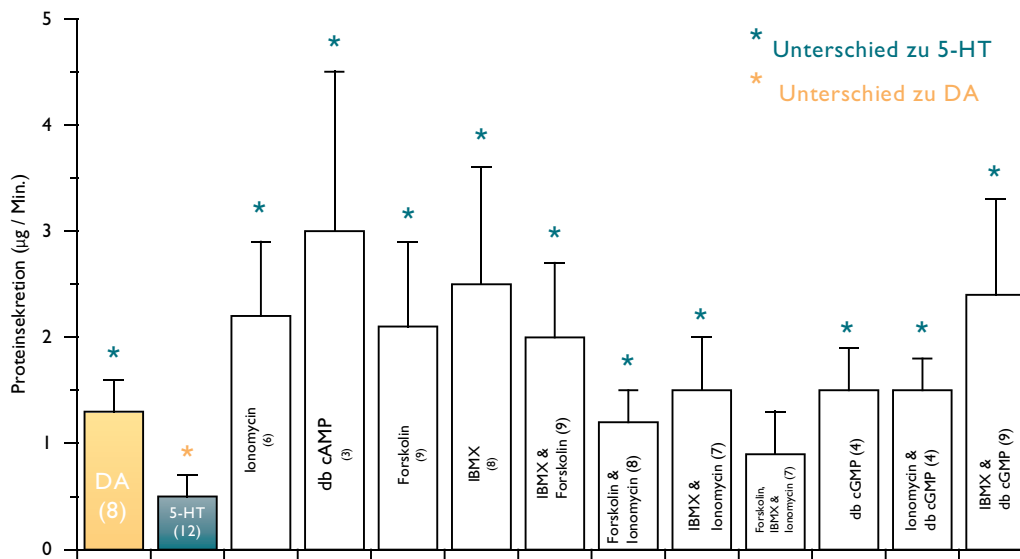
**Abb. 33: Proteinsekretion während der Teststimulierungen der verschiedenen Experimente.** In den Balken sind die für die **Teststimulierung** verwendeten Substanzen angegeben sowie in Klammern die Stichprobengröße (n). Die Unterschiede zur Proteinsekretion nach Teststimulierungen mit 5-HT (türkisfarbener Balken) sind mit einem türkisfarbenen Sternchen markiert. MW ± SD der Proteinsekretion (µg/Min.). Statistische Auswertung: Ein-Wege ANOVA; \* p ≤ 0,05; keine Angabe n.s. p > 0,05. Eine nähere Erläuterung der Ergebnisse befindet sich im Text.

Während der **Kontrollstimulierungen** werden alle Drüsen mit 1  $\mu\text{M}$  5-HT stimuliert. Die dabei aktivierte maximale Proteinsekretion ist in Abb. 34 zusammengefaßt.

Nach der Teststimulierung mit 5-HT (türkisfarbener Balken) wird erwartungsgemäß die niedrigste Proteinsekretion aktiviert. Imitiert wird diese nur durch Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ - und cAMP-Konzentration mittels IBMX, Forskolin & Ionomycin. In allen anderen Experimenten wird eine signifikant höhere Proteinsekretion ausgelöst, die durch 5-HT stimulierte also nicht imitiert (gekennzeichnet durch die grünen Sternchen).

Zusätzlich werden die Ergebnisse der Kontrollstimulierungen daraufhin ausgewertet, ob die Fähigkeit von 5-HT, die Proteinsekretion zu stimulieren, durch die Testsubstanzen des jeweiligen Experiments beeinflusst wird.

Dafür werden die Werte mit der Proteinsekretion eines Experiments verglichen, bei dem vor der Kontrollstimulierung nur DA appliziert wird (gelber Balken in Abb. 34). Diese Stimulierung aktiviert keine meßbare Proteinsekretion. Die in diesem Experiment gemessene maximale Rate der Proteinsekretion ist diejenige, welche 5-HT während der Periode der Kontrollstimulierung aktivieren kann. Diese maximale Proteinsekretion fällt nach einer Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration (allein oder gemeinsam mit der cGMP-Konzentration) zwar höher aus als nach der DA-Stimulierung, doch ist der Unterschied statistisch nicht signifikant. Ein signifikantes Resultat ergibt nur die im Vergleich zu der DA-Stimulierung niedrigere Proteinsekretion nach der Teststimulierung mit 5-HT (gelbes Sternchen).



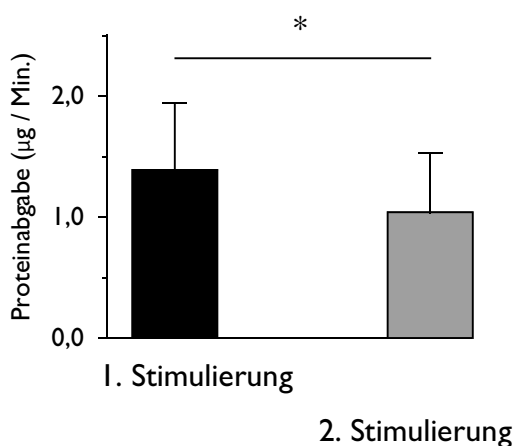
**Abb. 34: Mittlere maximale Proteinsekretion während der Kontrollstimulierungen der verschiedenen Experimente.** In den Balken angegeben sind die in der **Teststimulierung** verwendeten Substanzen sowie in Klammern die Stichprobengröße (n). Die Unterschiede zur Proteinsekretion nach verschiedenen Teststimulierungen sind wie folgt gekennzeichnet: nach DA-Stimulierung (gelber Balken) mit grauen Sternchen und nach 5-HT-Stimulierung (türkiser Balken) mit türkisarbenen Sternchen. Die Werte geben MW  $\pm$  SD der Proteinsekretion ( $\mu\text{g}/\text{Min.}$ ) an. Die statistische Auswertung erfolgt mit einer Ein-Wege ANOVA; \*  $p \leq 0,05$ ; keine Angabe n.s.  $p > 0,05$ . Eine nähere Erläuterung der Ergebnisse befindet sich im Text.

Zusammengefaßt kann gesagt werden, daß nur die gleichzeitige Applikation von IBMX, Forskolin & Ionomycin die durch 5-HT stimulierte Proteinsekretion qualitativ und quantitativ imitiert (s. Abb. 33 & 34). Bezüglich der Qualität und Quantität während der Teststimulierung kann die 5-HT-stimulierte Proteinsekretion auch durch Stimulierung mit IBMX & Ionomycin oder IBMX & Forskolin imitiert werden (s. Abb. 33).

### **3.3.2.4 Beeinflussen eine Protein Kinase C und die Adenylatcyclase die Protein- und Flüssigkeitssekretion?**

Die bisher durchgeführten Experimente lassen vermuten, daß eine 5-HT-induzierte Erhöhung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ - und / oder cAMP-Konzentration ursächlich an der Auslösung der Proteinsekretion beteiligt ist. Die folgenden Experimente sollen zeigen, ob an der  $Ca^{2+}$ -vermittelten Stimulierung der Proteinsekretion eine Protein Kinase C beteiligt ist. Außerdem solle die Bedeutung von cAMP für die Aktivierung der Proteinsekretion weiter untersucht werden. Bislang wird gezeigt, daß eine intrazelluläre Erhöhung der cAMP-Konzentration die Proteinsekretion aktivieren kann. Nun solle getestet werden, ob eine pharmakologische Hemmung der cAMP-Bildung die Proteinsekretion verringert.

Für die Experimente werden die Drüsen zweimal aufeinanderfolgend mit 5-HT stimuliert. Während der zweiten Stimulierung werden Hemmstoffe einer Protein Kinase C oder der Adenylatcyclase appliziert. Um die Wirkung der Hemmstoffe beurteilen zu können, muß zunächst kontrolliert werden, ob sich die Proteinsekretion während der beiden Stimulierungsperioden voneinander unterscheidet. Dazu werden Drüsen in einem Kontrollexperiment zweimal mit  $1 \mu\text{M}$  5-HT stimuliert, ohne daß Hemmstoffe zugegeben werden. Die Ergebnisse dieses Kontrollexperiments sind in Abb. 35 zusammengefaßt. Die Proteinsekretion während der ersten 5-HT-Stimulierung beträgt  $1,4 \pm 0,6 \mu\text{g}/\text{Min}$ . Während der zweiten Stimulierungsperiode ist sie signifikant geringer und beträgt nur  $1,0 \pm 0,5 \mu\text{g}/\text{Min}$ .



**Abb. 35: Maximale Proteinsekretion bei zwei aufeinanderfolgenden 5-HT-Stimulierungen.** Während der zweiten Stimulierung mit  $1 \mu\text{M}$  5-HT wird signifikant weniger Protein abgegeben als bei der ersten Stimulierung. Angegeben sind MW  $\pm$  SD der Proteinsekretion in  $\mu\text{g}/\text{Min}$ .,  $n=8$ , \*  $p \leq 0,05$ , Wilcoxon Matched Pairs Test.

Das bedeutet, daß die Wirkung der Hemmstoffe nur durch einen Vergleich der Proteinsekretion während der zweiten Stimulierungsperiode der verschiedenen Experimente beurteilt werden kann. Da die absoluten Werte der Proteinsekretion der einzelnen Drüsen stark streuen, wird die maximale Proteinsekretion während der zweiten Stimulierungsperiode auf die der ersten Stimulierungsperiode normalisiert. Diese normalisierten Werte werden anschließend miteinander verglichen. Sie sind in Tab. 9 zusammengefaßt

**Tabelle 9: 5-HT-stimulierte Proteinsekretion in Anwesenheit und Abwesenheit von Hemmstoffen einer Protein Kinase C (PKC) und der Adenylatcyclase (AC).** Angegeben sind MW  $\pm$  SD der maximalen Proteinsekretion. Die Werte werden auf die maximale Proteinsekretion während einer vorangegangenen Stimulierung mit 1  $\mu$ M 5-HT normalisiert.

Stimulierung	Proteinsekretion (%)		n
	MW $\pm$ SD	P <sup>1</sup>	
<b>5-HT (1 <math>\mu</math>M, Kontrolle)</b>	<b>76 <math>\pm</math> 19</b>		<b>8</b>
<u>Hemmstoffe der PKC</u>			
Chelerythrin (1 $\mu$ M)	71 $\pm$ 17	n.s.	7
Chelerythrin (10 $\mu$ M)	78 $\pm$ 17	n.s.	8
Bisindolylmaleimid I (10 $\mu$ M)	84 $\pm$ 33	n.s.	8
Bisindolylmaleimid V (10 $\mu$ M)	54 $\pm$ 16	n.s.	8
<u>Hemmstoff der AC</u>			
MDL 12,330A (100 $\mu$ M)	148 $\pm$ 38	★	8
<sup>1</sup> Signifikante Unterschiede der Proteinsekretion zur Stimulierung mit 1 $\mu$ M 5-HT (Kontrollexperiment). n.s.: p > 0,05; ★ p $\leq$ 0,05; Mann-Whitney U-Test.			

### 3.3.2.4.1 Proteinsekretion

Ein mögliches Zielmolekül, über welches Ca<sup>2+</sup> die Proteinsekretion beeinflussen könnte, ist eine Protein Kinase C. Die Stärke der Proteinsekretion wird durch die Protein Kinase C-Hemmstoffe Chelerythrin (Herbert et al., 1990) sowie Bisindolylmaleimid I nicht signifikant beeinflusst (s. Tab. 9). Auch in einer Kontrolle mit der unwirksamen Form Bisindolylmaleimid V wird die Proteinsekretion nicht signifikant beeinflusst.

Es wurde bereits gezeigt, daß ein Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration die Proteinsekretion aktiviert. Das wichtigste cAMP-bildende Enzym in der Zelle ist die Adenylatcyclase, deren Aktivität durch MDL 12,330 A gehemmt werden soll. In Anwesenheit des Hemmstoffs wird jedoch unerwarteterweise die 5-HT stimulierte Proteinsekretion signifikant verstärkt (s. Tab. 9).

### 3.2.2.4.2 Flüssigkeitssekretion

Es wird auch getestet, ob Hemmstoffe einer Protein Kinase C und der Adenylatcyclase die DA- bzw. DA- & 5-HT-stimulierte Flüssigkeitssekretion beeinflussen. Dazu werden die Raten der Flüssigkeitssekretion, welche in Anwesenheit der Hemmstoffe gemessen werden, auf die zuvor bei gleicher Stimulierung (DA oder DA & 5-HT) in Abwesenheit der Hemmstoffe gemessenen Raten normalisiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 10 zusammengefaßt.



**Tabelle 10: DA- und 5-HT-stimulierte Raten der Flüssigkeitssekretion (%) in Anwesenheit und Abwesenheit von Hemmstoffen einer Protein Kinase C (PKC) und der Adenylatcyclase (AC).** Angegeben sind MW  $\pm$  SD der Flüssigkeitssekretion. Für die Beurteilung der Wirkung auf die DA-stimulierte Sekretionsrate werden die Werte auf die mittlere Sekretionsrate bei einer vorangegangenen DA-Stimulierung normalisiert. Für die Stimulierung mit DA & 5-HT werden die Werte auf die mittlere Sekretionsrate bei der ersten Stimulierung mit 1  $\mu$ M 5-HT & 1  $\mu$ M DA normalisiert.

	Flüssigkeitssekretion bei Stimulierung mit				
	DA		5-HT & DA		n
	MW $\pm$ SD	p <sup>1</sup>	MW $\pm$ SD	p <sup>2</sup>	
<b>5-HT (1 <math>\mu</math>M, Kontrolle)</b>	<b>79 <math>\pm</math> 17</b>		<b>130 <math>\pm</math> 51</b>		<b>8</b>
<u>Hemmstoffe der PKC</u>					
Chelerythrin (1 $\mu$ M)	54 $\pm$ 14	n.s.	83 $\pm$ 16	n.s.	7
Chelerythrin (10 $\mu$ M)	74 $\pm$ 18	n.s.	101 $\pm$ 17	n.s.	8
Bisindolylmaleimid I (10 $\mu$ M)	56 $\pm$ 8	n.s.	79 $\pm$ 23	n.s.	8
Bisindolylmaleimid V (10 $\mu$ M)	56 $\pm$ 17	n.s.	83 $\pm$ 28	n.s.	8
<u>Hemmstoff der AC</u>					
MDL 12,330 A (100 $\mu$ M)	39 $\pm$ 6	*	63 $\pm$ 13	n.s.	8
<sup>1</sup> Signifikante Unterschiede in der DA-stimulierten Sekretionsrate in Anwesenheit von Hemmstoffen zu der DA-stimulierten Sekretionsrate ohne Hemmstoffe.					
<sup>2</sup> Signifikante Unterschiede in der 5-HT- und DA-stimulierten Sekretionsrate in Anwesenheit von Hemmstoffen zu der 5-HT- und DA-stimulierten Sekretionsrate ohne Hemmstoffe.					
Statistische Auswertung: Mann-Whitney U-Test, n.s. p > 0,05; * p $\leq$ 0,05.					

Die DA-stimulierte Sekretionsrate wird durch keinen der getesteten Protein Kinase C-Hemmstoffe signifikant beeinflusst. Dagegen ist sie in Anwesenheit des Adenylatcyclase-Hemmstoffs signifikant reduziert. Die durch 5-HT stimulierten Sekretionsraten werden durch keinen der getesteten Hemmstoffe signifikant beeinflusst.

Die Hemmung einer Protein Kinase C beeinflusst weder die Protein- noch die Flüssigkeitssekretion. dagegen wird die Proteinsekretion in Anwesenheit des Adenylatcyclase-Hemmstoffs verstärkt. Die DA-stimulierte Flüssigkeitssekretion wird bei Hemmung der Adenylatcyclase reduziert, während die 5-HT-stimulierte Flüssigkeitssekretion nicht beeinflusst wird.



## 4. Diskussion

Die vorliegende Arbeit hat zum Ziel, grundlegende Prozesse der Bildung und Modifikation des wäßrigen und proteinhaltigen Speichels von *Periplaneta americana* besser zu verstehen. Alle Experimente wurden an isolierten Speicheldrüsen durchgeführt. Es wurden verschiedene Methoden getestet und angewendet: z. B. kapillarelektrophoretische Analysen, mikrofluorometrische Messungen, vitalmikroskopische Beobachtungen der Zellen sowie biochemische Proteinbestimmungen.

In den meisten Experimenten wurde die Speichelsekretion unter "Standardbedingungen" mit 1  $\mu\text{M}$  DA oder 5-HT, das dem Ringer zugegeben wurde, stimuliert. Imitiert diese Stimulierungsmethode die physiologischen Bedingungen?

Die Speichelsekretion kann durch elektrische Stimulierung des Speichelgangnervs angeregt werden (Smith & House, 1977; House & Smith, 1978). Die sekretorische Aktivität unter diesen Bedingungen entspricht quantitativ derjenigen, welche durch Bad-Applikation von DA oder 5-HT aktiviert werden kann (Smith & House, 1977; House & Smith, 1978). Außerdem liegen die in meiner Arbeit verwendeten Konzentrationen (1  $\mu\text{M}$  DA oder 5-HT) im dynamischen Bereich der Dosis-Wirkungskurven der Flüssigkeitssekretion für beide Amine (Just & Walz, 1996). Da die Transmitterkonzentration im synaptischen Spalt mehrere mM betragen kann (z. B. Clements, 1996; Borst & Sakmann, 1999) und in dessen Nähe noch bis zu 200  $\mu\text{M}$  (Dzubay & Jahr, 1999), sind die verwendeten Konzentrationen der Transmitter nicht unphysiologisch hoch. Es ist deshalb anzunehmen, daß die verwendete Methode der Stimulierung den physiologischen Bedingungen weitgehend entspricht.

### **4.1 Elektrolytgehalt im Speichel und Flüssigkeitssekretion**

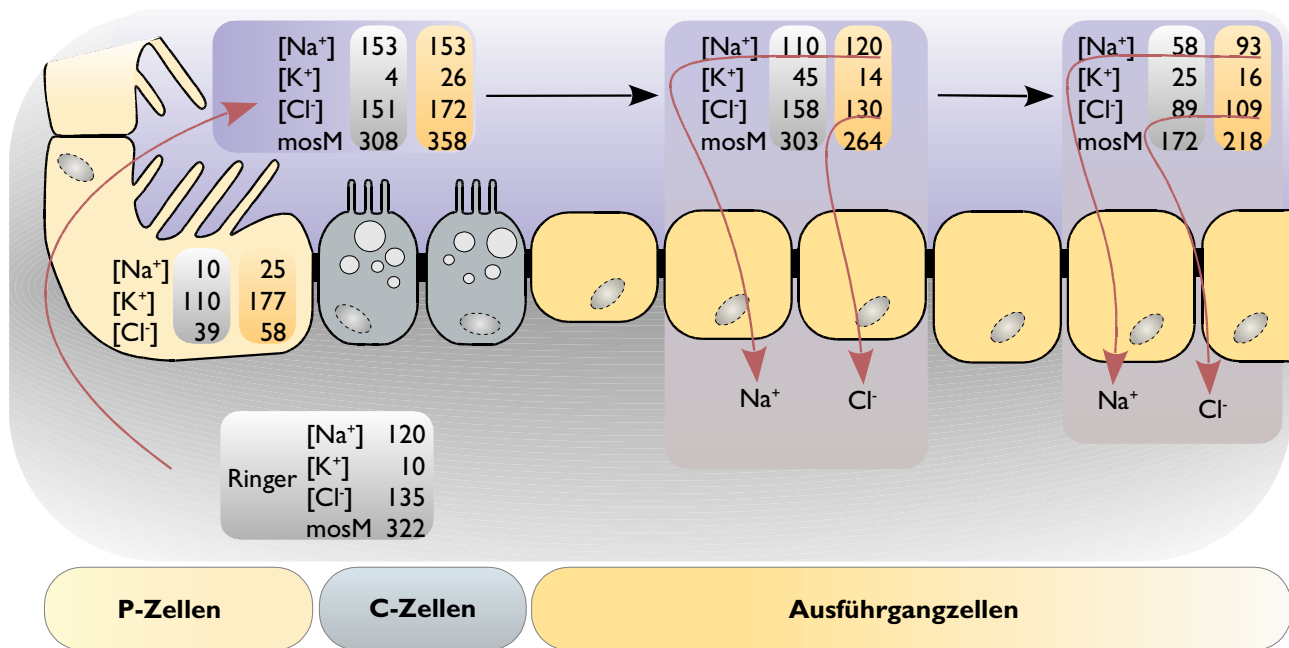
#### **4.1.1 DA- und 5-HT-stimulierte Raten der Flüssigkeitssekretion sowie Elektrolyt- und Flüssigkeitstransport in den Acini**

DA aktiviert eine stärkere Flüssigkeitssekretion als 5-HT (House & Smith, 1978; Just & Walz, 1996). Die gebildeten Speichelqualitäten unterscheiden sich jedoch grundlegend voneinander: DA-stimulierter Speichel enthält keine Proteine, wohingegen 5-HT die Bildung eines proteinhaltigen Speichels stimuliert (Just & Walz, 1996). Ein wichtiges Ergebnis der Analyse des Elektrolytgehalts im Speichel ist, daß beide Speichelqualitäten die gleichen Konzentrationen von  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  und  $\text{Cl}^-$  enthalten. Da angenommen wird, daß der Speichel während seiner Passage des Ausführungssystems modifiziert wird, ist dieses ein aus mehreren Gründen überraschendes Ergebnis: (1) Während der gesamte Acinusbereich der Speicheldrüse durch dopaminerge und serotonerge Fasern innerviert wird, sind die Speichelgänge stromabwärts der Acini nur dopaminerg innerviert (Baumann et al., 2002). (2) DA depolarisiert die Ausführungszellen und löst dramatische Änderungen der intrazellulären  $\text{K}^+$ - und  $\text{Na}^+$ -Konzentrationen sowie eine Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration aus. 5-HT beeinflusst diese Parameter nicht (Lang & Walz, 1999a, 2001). Intuitiv könnte deshalb erwartet werden, daß der Elektrolytgehalt im DA-stimulierten Endspeichel während der Passage des Ausführungssystems stärker modifiziert wird, als der 5-HT-stimulierte Speichel. (3) Mit ionensensitiven Mikroelektroden wurden die  $\text{K}^+$ - und  $\text{Na}^+$ -Konzentrationen im Lumen des Speichelgangs gemessen (Lang & Walz, 2001). Nach Stimulierung mit 1  $\mu\text{M}$  DA betrug die luminale  $\text{Na}^+$ -Konzentra-

tion  $116 \pm 22$  mM, die  $K^+$ -Konzentration  $26 \pm 11$  mM. Diese Konzentrationen sind für  $Na^+$  etwas höher und für  $K^+$  etwas niedriger, insgesamt jedoch denen im hier analysierten Endspeichel sehr ähnlich ( $Na^+$   $95 \pm 18$  mM;  $K^+$   $38 \pm 10$  mM;  $n=61$ ). Wiederum hätte man intuitiv eine stärkere Veränderung des Speichels im Ausführungssystem erwartet. Ermutigend ist, daß Gupta & Hall (1983) in ihrer Elektronenstrahl-Röntgenmikroanalyse der DA-stimulierten Speicheldrüsen eine Verminderung der luminalen  $Na^+$ -Konzentration in etwa gleicher Stärke zum Ende des Ausführungsgangs gefunden haben. Der Vergleich der zitierten Datensätze zur Zusammensetzung des Speichels läßt vermuten, daß die Funktion der Ausführungsgänge komplexer ist als bislang angenommen.

Auf welche Weise sind die Speichelgänge mit ihren dopaminerg innervierten Epithelzellen an der Modifikation des Primärspeichels und der Bildung des Endspeichels beteiligt?

Gupta & Hall (1983) haben mit Hilfe der Elektronenstrahl-Röntgenmikroanalyse die ionale Zusammensetzung (1) des Cytoplasmas der P-Zellen, (2) des Primärspeichels innerhalb des Acinuslumens und (3) des Speichels im Ganglumen in verschiedenen Gangabschnitten jeweils in Ruhe und während einer DA-Stimulierung der Drüse gemessen. Die in dieser Arbeit bestimmten Ionenkonzentrationen und die wichtigsten von Gupta & Hall geforderten Ionentransport-Prozesse sind in Abb. 36 zusammengefaßt. Für eine vollständige quantitative Beschreibung aller Amin-stimulierten Transportprozesse fehlen in der Arbeit leider Messungen nach Stimulierung mit 5-HT sowie Messungen der Ionenkonzentrationen in den Ausführungszellen. Mit den Ergebnissen meiner Arbeit kann das Funktionsmodell von Gupta & Hall (1983) sowie von Lang & Walz (1999a, 2001) modifiziert und erweitert werden.



**Abb. 36: Ionenkonzentrationen in den P-Zellen und verschiedenen Regionen des Ausführungsgangs.** Die dargestellten Konzentrationen und angenommenen Ionentransport-Prozesse entstammen der Arbeit von Gupta & Hall (1983). Diese bestimmten die Ionenkonzentrationen (in mM) mit einer Elektronenstrahl-Röntgenmikroanalyse jeweils in unstimulierten Drüsen (grau unterlegte Werte) und DA-stimulierten Drüsen (gelb unterlegte Werte). Die Autoren gehen von einer  $Na^+$ - und  $Cl^-$ -Absorption aus dem Speichel während der Passage des Gangsystems aus, welche in unstimulierten Drüsen stärker ist als während einer DA-Stimulierung. Die Osmolarität des Speichels (mosM) wurde von mir durch  $([Na^+] + [K^+]) * 2$  berechnet, die des Ringers (mosM) entspricht der Angabe der Autoren.

In unstimulierten P-Zellen haben Gupta & Hall (1983) die folgenden Ionenkonzentrationen gemessen:  $\text{Na}^+$  10 mM,  $\text{K}^+$  110 mM und  $\text{Cl}^-$  39 mM. Die intrazelluläre  $\text{Cl}^-$ -Konzentration ist höher als sie bei rein passiver Verteilung zu erwarten wäre. Da  $\text{Cl}^-$  über die Apikalmembran aus den Zellen heraus transportiert wird, muß ein Mechanismus für den aufwärtsgerichteten  $\text{Cl}^-$ -Import in die P-Zellen existieren (s. auch unten). Nach DA-Stimulierung steigen die intrazellulären Konzentrationen aller drei Ionen an (s. Abb. 36), und es kommt zu einer transienten Hyperpolarisation des basolateralen Membranpotentials der P-Zellen von -55 mV über -100 mV auf -70 mV (House, 1980), welche auf die Aktivierung eines  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen  $\text{K}^+$ -Leitfähigkeit zurückzuführen ist (Ginsborg et al., 1980).

Über welche Wege können  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  und  $\text{Cl}^-$  in die Zellen gelangen, und wie wird die hohe intrazelluläre  $\text{K}^+$ -Konzentration aufrechterhalten?

Gupta & Hall (1983) nehmen an, daß die hohe intrazelluläre  $\text{K}^+$ -Konzentration auf die Aktivität einer basalen  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase und eine  $\text{Na}^+$ -Leitfähigkeit der Basolateralmembran zurückgeht. Außerdem gehen sie davon aus, daß ein basolateraler  $\text{Na}^+$ / $\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher existiert, der eine niedrige intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration aufrechterhält. Dieser Austauscher wurde bereits von House & Ginsborg (1982) postuliert.

In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, daß Bumetanid, ein spezifischer Hemmstoff des NKCC, sowohl die Raten der Flüssigkeitssekretion, als auch die ionale Zusammensetzung und die Osmolarität des Endspeichels nach DA- und 5-HT-Stimulierung stark verringert. Da die Flüssigkeitssekretion vor allem von der Aktivität der P-Zellen in den Acini abhängt, müssen diese einen NKCC in ihrer Basolateralmembran besitzen, welcher für den basalen Eintritt von  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  und  $\text{Cl}^-$  in die P-Zellen und die Flüssigkeitssekretion von zentraler Bedeutung ist.

Welche Ionen werden sezerniert und welche Signalwege sind an der Bildung des Primärspeichels beteiligt?

Bei einer DA-Stimulierung kommt es zu einem Anstieg der  $\text{K}^+$ - und  $\text{Cl}^-$ -Konzentration im Acinuslumen, während die  $\text{Na}^+$ -Konzentration unverändert bleibt, so daß das  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Verhältnis von 40 (unstimuliert) auf 6 (DA-stimuliert) fällt (s. Abb. 36; Gupta & Hall, 1983). Der Primärspeichel besteht hauptsächlich aus einer  $\text{NaCl}$ -Lösung und ist in etwa isoosmotisch mit dem verwendeten Ringer. Die Autoren nehmen an, daß der transepitheliale  $\text{NaCl}$ - und  $\text{H}_2\text{O}$ -Transport über eine apikal lokalisierte  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase angetrieben wird. Eine starke Expression der  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase in den apikalen Mikrovilli haben Just & Walz (1994b) immunocytochemisch nachgewiesen. Sie konnten jedoch keine Immunoreaktivität an der Basolateralmembran der P-Zellen nachweisen. Entweder ist dort die Expression zu gering, oder es kommt eine andere Isoform der  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase vor, welche nicht mit den verwendeten Antikörpern reagiert. Trotzdem wird von einer Expression in beiden Domänen der Plasmamembran, apikal und basolateral, ausgegangen. Einen Hinweis auf eine basolaterale  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase gibt die unerwartete Verstärkung der Flüssigkeitssekretion in Anwesenheit von Ouabain, die ich gemessen habe.

Wie kann diese Verstärkung der Flüssigkeitssekretion erklärt werden?

Ouabain hat von der Badseite aus nur Zugang zur basolateralen Membran; die apikal lokalisierte  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase ist unzugänglich. Es ist zu erwarten, daß die Hemmung der basalen  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase während einer DA-Stimulierung einen verstärkten Anstieg der intrazellulären  $\text{Na}^+$ -Konzentration bewirkt. Daraus resultiert eine stärkere Stimulierung der apikalen  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase, die einen höheren transzellulären  $\text{Na}^+$ - und Flüssigkeitstransport auslöst. Diese Wirkung ist während einer 5-HT-Stimulierung, welche geringere Sekretionsraten aktiviert, deutlicher zu sehen, und der Anstieg der Sekretionsrate ist unter diesen Bedingungen statistisch signifikant. Auch bei der DA-Stimulierung kommt es zu einer leichten Verstärkung der Flüssigkeitssekretion in Anwesenheit von Ouabain, welche jedoch statistisch nicht signifikant ist.

Die apikale Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase transportiert K<sup>+</sup> im Austausch gegen Na<sup>+</sup> aus dem Lumen des Acinus. Das Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-Verhältnis fällt durch den Anstieg der K<sup>+</sup>-Konzentration im Lumen des Acinus während einer DA-Stimulierung von 40 auf 6. Von daher muß die apikale mikrovilliäre Membran der P-Zellen eine K<sup>+</sup>-Leitfähigkeit besitzen, welche K<sup>+</sup> in den Primärspeichel transportiert und das apikale K<sup>+</sup>-Recycling ermöglicht.

#### 4.1.2 Mögliche Funktionen des Ausführungsgangs

Der abgegebene Endspeichel ist hypoosmotisch im Vergleich zum verwendeten Ringer sowie zum Primärspeichel (s. Abb. 36, Gupta & Hall, 1983). Die Ausführungsgänge modifizieren den Primärspeichel also durch eine netto Ionen-Rückresorption. Der Befund, daß die Osmolarität während der Passage des Ausführungsgangsystems abnimmt, läßt eine Wasser-sezernierende Funktion der Ausführungsgänge unwahrscheinlich erscheinen.

Während der Passage des Ausführungsgangsystems verändert sich das Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-Verhältnis im Schabenspeichel. Im Endspeichel beträgt es  $\sim 1/3$  des Verhältnisses im Primärspeichel, ausgelöst durch einen Anstieg der Na<sup>+</sup>-Konzentration sowie eine Verringerung der K<sup>+</sup>-Konzentration. Die Ausführungsgänge scheinen demnach Na<sup>+</sup> zu resorbieren und K<sup>+</sup> zu sezernieren.

Welche Mechanismen sind an der Veränderung des Primärspeichels beteiligt, und wie werden diese Mechanismen durch DA beeinflusst?

Die Annahme, daß vor allem DA die Veränderung des Primärspeichels beeinflusst, beruht auf der ausschließlich dopaminergen Innervierung großer Teile des Ausführungsgangsystems (Baumann et al., 2002). In der Apikalmembran der Gangzellen ist eine V-H<sup>+</sup>-ATPase lokalisiert, außerdem eine Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase in der Basolateralmembran (Just & Walz, 1994b). Im aktuellen Modell der Ionen-transport-Prozesse in den Gangzellen (Lang & Walz, 2001) wird davon ausgegangen, daß K<sup>+</sup> quasi frei über die Basolateralmembran diffundieren kann und aktiv durch eine "funktionelle K<sup>+</sup>-Pumpe" über die Apikalmembran transportiert wird. Die "funktionelle K<sup>+</sup>-Pumpe" könnte aus der V-H<sup>+</sup>-ATPase und einem putativen K<sup>+</sup>/nH<sup>+</sup>-Antiport bestehen (Wieczorek et al., 1991, 1999). Ein passiver Na<sup>+</sup>-Eintritt über die Apikalmembran ist energetisch möglich und eine elektrogene Na<sup>+</sup>-Reabsorption könnte durch die basolaterale Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase angetrieben werden.

Die Ouabain-Sensitivität der Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase in den Gangzellen wurde von Lang & Walz (2001) gezeigt: zwar werden die DA-stimulierten Änderungen der intrazellulären Na<sup>+</sup>- und K<sup>+</sup>-Konzentrationen in den Gangzellen nicht von Ouabain beeinflusst, aber sie sind nach Auswaschen des DA in Anwesenheit von Ouabain irreversibel. In meiner Arbeit wird, daß die Osmolarität des DA-stimulierten Endspeichels  $359 \pm 41$  mosM beträgt, und somit ungefähr isoosmotisch zur Hämolymphe oder dem verwendeten Ringer ist. Die höhere Osmolarität wird durch höhere Na<sup>+</sup>- und Cl<sup>-</sup>-Konzentration bedingt (Na<sup>+</sup>  $149 \pm 17$  mM vs.  $107 \pm 20$ ; Cl<sup>-</sup>  $194 \pm 31$  vs.  $162 \pm 21$  mM), während die K<sup>+</sup>-Konzentration geringer ist ( $30 \pm 6$  vs.  $42 \pm 5$  mM) (s. Tab. 7).

Die in der vorliegenden Arbeit gemessenen Na<sup>+</sup>-, K<sup>+</sup>- und Cl<sup>-</sup>-Konzentrationen im Endspeichel in Anwesenheit von Ouabain stimmen in etwa mit den von Gupta & Hall (1983) beschriebenen Ionenkonzentrationen im Primärspeichel überein. Wie oben beschrieben, bewirkt die Hemmung der Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase in den P-Zellen vermutlich eine Verringerung des basalen Na<sup>+</sup>-Exports, gekoppelt mit einer Verringerung des K<sup>+</sup>-Imports. Daraus resultiert während einer DA-Stimulierung ein stärkerer Anstieg der intrazellulären Na<sup>+</sup>-Konzentration, welcher die apikale Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase stärker stimuliert. Dadurch bedingt ist die Na<sup>+</sup>-Konzentration im Primärspeichel höher und die K<sup>+</sup>-Kon-

zentration geringer. In den Gangzellen scheint die apikale  $\text{Na}^+$ -Reabsorption durch die basolaterale  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase energetisiert zu werden. Gleichzeitig gelangt  $\text{K}^+$  für die apikale Abgabe über diesen Prozeß in die Zellen. Können diese Prozesse in Anwesenheit von Ouabain nicht ablaufen, so erklärt dies die höheren  $\text{Na}^+$ - und geringeren  $\text{K}^+$ -Konzentrationen, die höhere Osmolarität und das veränderte  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Verhältnis im Endspeichel. Zusammengefaßt zeigen diese Ergebnisse meiner Arbeit, daß die basolaterale  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase der Ausführungszellen wichtig für die  $\text{Na}^+$ -Reabsorption und die  $\text{K}^+$ -Sekretion ist, und deshalb auch für die Verringerung der Osmolarität des Speichels während der Passage des DA-stimulierten Ausführungssystems.

Auch wenn die Drüsen in Anwesenheit von Ouabain mit 5-HT stimuliert werden, finde ich eine erhöhte  $\text{Na}^+$ - und eine niedrigere  $\text{K}^+$ -Konzentration im Endspeichel; außerdem sind die Osmolarität und das  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Verhältnis erhöht. Diese Unterschiede sind jedoch statistisch nicht signifikant. Ouabain wird während einer 5-HT-Stimulierung die gleichen Wirkungen in den P-Zellen haben, und die Bildung des Primärspeichels auf die gleiche Weise beeinflussen, wie während einer DA-Stimulierung. Diese Annahme erklärt auch die erhöhte 5-HT-stimulierte Sekretionsrate in Anwesenheit von Ouabain (s. o.). Dagegen werden die Gangzellen nicht durch 5-HT stimuliert (Lang & Walz, 1999a). Die trotzdem gemessene Veränderung der Speichelzusammensetzung bestätigt die Beobachtung von Gupta & Hall (1983), daß die  $\text{Na}^+$ -Reabsorption und die  $\text{K}^+$ -Sekretion auch in den unstimulierten Gängen ablaufen. Diese Annahme wird auch durch die folgenden Ergebnisse meiner Arbeit gestützt: (1) Die  $\text{Na}^+$ - und  $\text{Cl}^-$ -Konzentrationen in Probe #2 waren signifikant niedriger als die in Probe #3. Probe #2 wurde während der ersten 5 Minuten der zweiten Stimulierungsperiode gesammelt und enthielt auch den Speichel, der sich zwischen den Stimulierungen in den Ausführungsgängen befand - welcher also in den unstimulierten Gängen modifiziert werden konnte. (2) Der 5-HT-stimulierte Endspeichel ist hypoosmotisch, wie auch der DA-stimulierte Endspeichel. (3) Nach dem Auswaschen des DA sinkt die luminale  $\text{Na}^+$ -Konzentration unter den Ruhewert (Lang & Walz, 1999a).

In den Speicheldrüsen einer anderen Schabenart fanden Smith & House (1979) eine Korrelation von der  $\text{Na}^+$ -Konzentration im Endspeichel und der Rate der Flüssigkeitssekretion. Eine Abnahme der  $\text{Na}^+$ -Konzentration bei niedrigen Sekretionsraten, bei denen sich der Speichel länger im Ausführungssystem befindet und dort modifiziert werden kann, wurde für Wirbeltiere beschrieben (Brusilow & Cooke, 1959). In der vorliegenden Arbeit wird dagegen keine deutliche Korrelation zwischen den quantifizierten Ionenkonzentrationen und den Sekretionsraten festgestellt (Abb. 14).

Lang & Walz (2001) zeigten, daß in der Basolateralmembran der Ausführungszellen ein NKCC exprimiert ist. Meine Arbeit zeigt indirekt, daß auch in der Basolateralmembran der P-Zellen ein NKCC exprimiert wird und für den Import von  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  und  $\text{Cl}^-$  in die Zellen bedeutend ist. Die ionale Zusammensetzung des Endspeichels und die Sekretionsraten ändern sich bei Hemmung des NKCC dramatisch. Ohne Kenntnis der Zusammensetzung des Primärspeichels während einer Hemmung des NKCC können jedoch leider keine Aussagen darüber gemacht werden, wie dieser Transportmechanismus in den Ausführungsgängen an der Modifikation des Primärspeichels beteiligt ist.

## 4.2 Mikrofluorometrische Messungen der $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und der Autofluoreszenz

### 4.2.1 Änderungen der $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in den Acinuszellen

In mehreren Arbeiten wurde untersucht, welche Wirkungen eine Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in den Acinuszellen der Schabenspeicheldrüsen hat - allerdings wurden die  $\text{Ca}^{2+}$ -Änderungen noch nie direkt gemessen. In den älteren Arbeiten wurden  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophore appliziert, welche zwei Prozesse aktivierten: (1) die Hyperpolarisation des basolateralen Membranpotentials (Ginsborg et al., 1980) und (2) eine Stimulierung der Flüssigkeitssekretion (Gray et al., 1984). Beide Prozesse werden auch durch eine DA-Stimulierung der Drüsen aktiviert. Deshalb wird davon ausgegangen, daß auch die DA-Stimulierung eine Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in den Acinuszellen auslöst.

In der vorliegenden Arbeit sollten  $\text{Ca}^{2+}$ -Änderungen in den P- und C-Zellen der Acini direkt mit Fura-2 gemessen werden. Dabei fand ich keine Hinweise für einen deutlichen Anstieg der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in den P-Zellen während einer DA-Stimulierung. Dies kann mehrere Gründe haben: (1) es finden keine starken, globalen Änderungen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration statt oder (2) methodische Probleme verhindern die erfolgreiche Messung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Änderungen.

Daß ein universaler Botenstoff wie  $\text{Ca}^{2+}$  diverse Reaktionen in einer Zelle aktivieren kann, liegt an einer genauen zeitlichen und räumlichen Koordination der  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale (Berridge et al., 2000; Brownlee, 2000). Erhöhungen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration können auf einen Zellpol beschränkt bleiben und dort lokal wirken. So wird z. B. die Exocytose sekretorischer Vesikel am apikalen Pol von Pankreas-Acinuszellen durch eine lokale Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration aktiviert (Wäsle & Edwardson, 2002). Eine globale Ausbreitung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals kann z. B. durch ein Zusammenspiel des ERs und der Mitochondrien als intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher modifiziert oder sogar verhindert werden (Tinel et al., 1999; Berridge, 2002).

Für die Acinuszellen der Schabenspeicheldrüse wird angenommen, daß die Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration basolaterale  $\text{K}^+$ -Kanäle öffnet und so die Hyperpolarisation des basolateralen Membranpotentials auslöst (Ginsborg et al., 1980). Auch diese Reaktion ist auf einen Zellpol beschränkt, so daß zu ihrer Aktivierung eventuell keine globale Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration nötig ist. Außerdem wird die Beteiligung von  $\text{Ca}^{2+}$  bei der Aktivierung der Flüssigkeitssekretion diskutiert. An diesem Prozeß sind beide Zellpole beteiligt: auf der basolateralen Seite müssen Ionen in die Zellen aufgenommen werden, welche anschließend über die Apikalmembran in das Lumen sezerniert werden. In der Speicheldrüse von *Calliphora* kommt es bei 5-HT-Stimulierung zu einem globalen Anstieg der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, der sich von basolateral nach apikal ausbreitet (Zimmermann, 2000) und einen Anstieg der  $\text{Cl}^-$ -Leitfähigkeit in beiden Membrandomänen aktiviert (Berridge et al., 1975, 1976). Außerdem bewirkt die 5-HT-Stimulierung in diesem Gewebe einen Anstieg der cAMP-Konzentration, welcher einen  $\text{K}^+$ -Transport über die Apikalmembran auslöst (Berridge et al., 1976). In der Schabenspeicheldrüse kann die Flüssigkeitssekretion ebenfalls durch Erhöhung der intrazellulären Konzentrationen von  $\text{Ca}^{2+}$  und cAMP stimuliert werden (Gray et al., 1984). Die nach Applikation eines  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophors aktivierte Flüssigkeitssekretion wird durch Hemmung der Adenylatcyclase reduziert. Gray et al. (1984) schließen daraus, daß die Aktivierung der Adenylatcyclase ein essentielles Signal zur Stimulierung der Flüssigkeitssekretion ist, wohingegen  $\text{Ca}^{2+}$  die Rate der Flüssigkeitssekretion moduliert, diese aber nicht direkt aktiviert. Diese modulierenden Wirkungen von  $\text{Ca}^{2+}$  lassen sich z. B. durch die Expression einer  $\text{Ca}^{2+}$ -stimulierbaren Adenylatcyclase in der Basolateralmembran der P-Zellen erklären. Eine solche Isoform der Adeny-



latcyclase wurde bereits bei *Drosophila* und in Wirbeltieren nachgewiesen (Yovell et al., 1992; Smit & Iyengar, 1998). In diesem Falle würde eine lokale Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in der Nähe der Basolateralmembran ausreichen, um eine Flüssigkeitssekretion zu aktivieren oder die cAMP aktivierte Flüssigkeitssekretion zu verstärken.

Es ist demnach möglich, daß es während der DA-Stimulierung in den P-Zellen nicht zu einer globalen Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration kommt, sondern ausschließlich lokale Erhöhungen an der Basolateralmembran für die beschriebenen Wirkungen des  $\text{Ca}^{2+}$  verantwortlich sind. Diese können mit der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Methode nicht aufgelöst werden.

Ursachen für nicht meßbare Änderungen können jedoch auch immer methodische Probleme sein. Lang & Walz (1999a) haben gezeigt, daß es während einer DA-Stimulierung zu einem globalen Anstieg der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in den Ausführungszellen kommt, der mit Fura-2 gemessen werden kann. Als interne Kontrolle, daß die von mir in den Versuchen verwendeten Drüsenläppchen auch auf eine DA-Stimulierung reagieren, wurden deshalb immer auch die Änderungen der Fluoreszenz über einem Gangabschnitt gemessen. Es werden nur die Experimente ausgewertet, in denen sich die Fluoreszenz in den Zellen der Ausführungsgänge ändert.

Es kann die Frage gestellt werden, ob für erfolgreiche Messungen in den Acinuszellen andere Bedingungen notwendig sind, als für die Messung in den Ausführungszellen. Je nach Zelltyp können sich wichtige Versuchsparameter unterscheiden, z. B. die Dauer der Beladung mit Fura-2 (Lipp et al., 2001). In allen Versuchen war die Intensität der Fluoreszenz in den Acinuszellen geringer als in den Ausführungszellen. Um eine ausreichende Beladung der Acinuszellen zu erreichen, habe ich die Drüse doppelt so lange mit der gleichen Konzentration des Farbstoffs beladen, wie dies in der Arbeit von Lang & Walz (1999a) der Fall war.

Bislang wird immer von einer Beladung der Acinuszellen gesprochen. Das ist insofern nicht korrekt, da das Fluoreszenzsignal ausschließlich von den P-Zellen ausgeht. Die dicht mit Vesikeln gefüllten C-Zellen scheinen keinen oder zumindest nicht genügend Farbstoff aufzunehmen, um ein deutlich meßbares Fluoreszenzsignal zu liefern. Allerdings verhindert eine hohe Vesikeldichte nicht zwangsläufig die Farbstoffaufnahme in die Zellen und Messungen mit Fura-2, wie Almers & Neher (1985) an Mastzellen zeigten. Möglicherweise lassen sich die C-Zellen also nicht mit Fura-2 AM beladen.

Um zu beurteilen, ob die gemessenen Änderungen der "Ratio" echte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale sind, ist eine genaue Auswertung der Rohsignale der bei 340 und 380 nm angeregten Fluoreszenz wichtig. Bei einem echten  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal kommt es zu einer gegenläufigen Änderung beider Rohsignale; bei einer Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zu einem Anstieg des bei 340 nm angeregten und zu einem Abfall des bei 380 nm angeregten Rohsignals. Aufgrund dieser gegenläufigen Änderung steigt die "Ratio" (berechnet aus Rohsignal 340 / 380 nm). Ein Anstieg der "Ratio", der durch annähernd parallele Änderungen der Rohsignale hervorgerufen wird, ist dagegen kein echtes  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal. Vielmehr ist es ein Artefakt, das z. B. durch eine Veränderung des Zellvolumens sowie der Farbstoffkonzentration in der Zelle ausgelöst wird, oder aber die Signale werden durch die Autofluoreszenz der Zellen beeinflusst.

Wie sehen die Änderungen der Rohsignale in den P-Zellen und Ausführungszellen aus?

In den P-Zellen steigen während der DA-Stimulierung beide Rohsignale weitgehend parallel an. Dieser Anstieg könnte durch eine Verringerung des Zellvolumens zustande kommen, wie es von Maxwell (1981) sowie von Gupta & Hall (1983) in diesem Zelltyp beschrieben wurde. Allein eine Veränderung des Zellvolumens sollte beim "ratiometric imaging" jedoch nicht zu einem Anstieg der "Ratio" führen, da sich beide Rohsignale parallel ändern würden. Betrachtet man die Rohsigna-

le genau, so findet man geringe Unterschiede in der Kinetik, mit der sie sich ändern.

Wie kann man die unterschiedliche Kinetik im Anstieg beider Rohsignale erklären?

Zum einen besteht die Möglichkeit, daß sich die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und das Zellvolumen mit unterschiedlicher Kinetik ändern; zum anderen, daß neben dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Indikator noch andere fluoreszierende Moleküle angeregt werden und zum Fluoreszenzsignal beitragen. Die zelluläre Autofluoreszenz wird z.B. durch Strukturproteine (Collagen, Elastin), aromatische Aminosäuren (Tryptophan, Trypsin, Phenylalanin) und durch am Redoxsystem der Zellen beteiligte Coenzyme (NAD(P)H, Flavoproteine) bedingt (Brewer et al., 2002). Ihr Einfluß auf die Ergebnisse des "ratio-metric imaging" sollte durch die beschriebene Hintergrundsubtraktion vor Auswertung der Versuche minimiert werden. Diese Subtraktion eines statischen Bildes verhindert nicht, daß die Meßergebnisse durch Änderungen der Autofluoreszenz während der Versuche beeinflusst werden. Besonders bei geringen Fluoreszenzsignalen ist deshalb eine Kontrolle der Änderungen der Autofluoreszenz während der Stimulierung wichtig (Hofer & Scheenen, 1999). Bei den beschriebenen Quellen der Autofluoreszenz ändern sich die Konzentrationen von NAD(P)H und Flavoproteinen abhängig von der Stoffwechselaktivität der Zelle. NAD(P)H hat sein Absorptionsmaximum, wie Fura-2 nach Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$ , bei einer Anregungswellenlänge von 340 nm. Dagegen ändert sich das bei 380 nm angeregte Rohsignal weniger, da NAD(P)H bei dieser Wellenlänge schwächer angeregt wird. Bei erhöhter Stoffwechselaktivität steigt die NAD(P)H-Fluoreszenz und eventuell die "Ratio", so daß ein Anstieg des bei 340 nm gemessenen Rohsignals nicht unbedingt durch einen Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration begründet ist.

Kontrollmessungen zeigen, daß unter den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Meßbedingungen die DA-stimulierten Änderungen der Autofluoreszenz nur einen kleinen Anteil an der mit Fura-2 gemessenen Änderung der "Ratio" haben. Dabei muß auf einen Punkt hingewiesen werden: für die Aufnahme eines korrekten Bildes der Hintergrundfluoreszenz muß zum unterdrücken (zum "quenchen") der Autofluoreszenz  $\text{Mn}^{2+}$  in die Zellen gelangen. Dies geschieht, wie auch der Transport von  $\text{Ca}^{2+}$ , über zuvor appliziertes Ionomycin (Hofer & Scheenen, 1999). Wie später diskutiert wird, waren die Ergebnisse der Ionomycin-Applikation nicht zufriedenstellend, so daß das aufgenommene Hintergrundbild eventuell nicht die korrekte Autofluoreszenz der Zellen wiedergibt.

Wie sehen die in den Ausführungszellen gemessenen Änderungen der Fluoreszenz aus?

Dort kam es, wie von Lang & Walz (1999a) beschrieben, zu einem deutlichen Anstieg der Fura-2-"Ratio". In diesem Bereich änderten sich die beiden Rohsignale nur anfangs parallel, anschließend kam es zu einer gegenläufigen Änderung und gleichzeitig zu dem deutlichen Anstieg der "Ratio". Lang & Walz (1999a) beschrieben für einige Drüsen einen gleichsinnigen Abfall der Rohsignale und begründeten diesen mit einem Anschwellen der Ausführungszellen zu Beginn der DA-Stimulierung. In den in meiner Arbeit durchgeführten Messungen kommt es z. T. zu dem beschriebenen Abfall der Rohsignale. In allen Drüsen kommt es (anschließend) zu einem parallelen Anstieg der Rohsignale, bevor die gegenläufigen Änderungen beginnen. Die Zellen scheinen also z. T. transient zu schwellen, und (anschließend) ihr Volumen zu verringern. Solche Änderungen im Zellvolumen können dazu dienen, die Aktivität von Transportern zu regulieren, beispielsweise die des NKCC (Greger, 1996).

Eine Quantifizierung der gemessenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Änderungen kann in vitro oder in vivo durchgeführt werden. Die letztgenannte Methode ist aufwendiger, liefert aber genauere Ergebnisse, da Parameter wie z. B. die Ionenstärke in der Zelle oder die Viskosität des Cytoplasmas die Werte einer in vitro-Eichung verfälschen können (Takahashi et al., 1999; Lipp et al., 2001). Für die Eichung muß die Fluoreszenz bei minimaler und maximaler  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in den Zellen gemessen werden, nachdem die Plasmamembran durch Applikation eines  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophors durchlässig für  $\text{Ca}^{2+}$  gemacht wurde. Häufig, wie auch in den von mir durchgeführten Messungen, wird dafür Ionomycin verwendet. Nach Applikation von Ionomycin werden in der vorliegenden Arbeit gegenläufige Änderungen

der beiden Rohsignale gemessen. Allerdings gab es einige Unstimmigkeiten, weshalb eine zuverlässige Quantifizierung mit einer in vivo-Eichung nicht möglich erscheint: Die "Ratio" stieg in vielen Versuchen langsam und kontinuierlich an, ohne einen konstanten Wert zu erreichen, die gemessenen Rohsignale fielen kontinuierlich ab. Die notwendige Bestimmung der minimalen Fluoreszenz bei 380 nm erscheint deshalb unzuverlässig. Da eine Ionomycinkonzentration von 10  $\mu\text{M}$  in den hier durchgeführten Versuchen keinen schnellen Anstieg der "Ratio" auslöste, wurde der Durchfluß der Lösungen gestoppt. Das Ionomycin wurde aus der Stammlösung direkt in das Wännchen pipettiert, so daß die Endkonzentration  $\sim 20 \mu\text{M}$  betrug. Eventuell ist die Wirksamkeit des Ionomycins in einer stehenden Lösung geringer. Folgende Änderungen hätten eventuell die Wirksamkeit des Ionomycins gesteigert und besser abgesicherte Messungen ermöglicht: eine leichte Erhöhung des pH-Werts, eine Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Ringer oder die Applikation eines anderen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophors, z. B. Br-A23187, bzw. eines Gemischs verschiedener  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophore (Williams, 1995; Lipp et al., 2001).

#### **4.2.2 Änderungen der Autofluoreszenz unter Meßbedingungen, welche spezifisch die Fluoreszenz von NAD(P)H und Flavoproteinen anregen**

Von den bereits angeführten Faktoren, die zur zellulären Autofluoreszenz beitragen, ändert sich die Fluoreszenz der an den Redoxsystemen der Zelle beteiligten Coenzyme (NAD(P)H und Flavoproteine) abhängig von der mitochondrialen Aktivität. Diese wiederum kann durch die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration beeinflusst werden (Mc Cormack et al., 1990; Robb-Gaspers et al., 1998).

Bei den Pyridin-Nucleotiden fluoresziert die reduzierte Form (NADH oder NADPH). Ihr Absorptionsmaximum liegt bei 340 nm. Die Stärke der Emission ist kein Maß für die absolute NAD(P)H-Konzentration, sondern zeigt das Verhältnis von NAD(P)H / NAD(P)<sup>+</sup> in der Zelle an. Ein Anstieg der Fluoreszenz zeigt also eine Verschiebung dieses Verhältnisses in Richtung NAD(P)H. Dieses kann zwei Gründe haben: (1) eine Steigerung der Stoffwechselaktivität, z. B. durch Erhöhung der Substratkonzentration in der Zelle, und (2) eine Hemmung der Atmungskette, weshalb die reduzierte Form nicht abgebaut werden kann, und sich die Fluoreszenz auf einem erhöhten Niveau reguliert (Mojet et al., 2001). In den von mir durchgeführten Versuchen werden keine Substanzen appliziert, welche die Zellatmung unterdrücken, und die Versuche werden nicht unter anoxischen Bedingungen durchgeführt. Deshalb gehe ich davon aus, daß eine Steigerung der NAD(P)H-Fluoreszenz durch eine Steigerung der Stoffwechselaktivität hervorgerufen wird.

Anders als bei den Pyridin-Nucleotiden fluoresziert bei den Flavoproteinen die oxidierte Form, z. B.  $\text{FAD}^+$  oder  $\text{FMN}^+$ . Eine Steigerung der Stoffwechselaktivität bedingt hier einen Abfall der Fluoreszenz (Massey, 2000). Absorptions- und Emissionsspektren beider Substanzgruppen befinden sich im Anhang (Abb. A2). Sowohl die reduzierten Pyridin-Nucleotide als auch die Flavoproteine fluoreszieren stärker, wenn sie an die Mitochondrienmembran gebunden sind, als wenn sie im Cytoplasma lokalisiert sind (Mojet et al., 2001). Deshalb kann über ihre Fluoreszenz die mitochondriale Aktivität beurteilt werden.

Nachdem ich in der Schabenspeicheldrüse DA-stimulierte Änderungen in der NAD(P)H-Fluoreszenz fand, soll nun ob sich die Stoffwechselaktivität der Zellen durch selektive Anregung von NAD(P)H und Flavoproteinen darstellen läßt. Als Maß dafür wird, aufgrund der gegenläufigen Änderung der beiden Rohsignale bei einer Steigerung der Stoffwechselaktivität, die "Ratio" aus Rohsignal 340 / 475 nm benutzt.

In den Acinuszellen und Ausführungszellen habe ich eine DA-stimulierte Steigerung der Stoffwechselaktivität gefunden, deren Maximum etwa drei Minuten nach Beginn der DA-Stimulierung erreicht wird (Acinus  $2,9 \pm 0,9$ ; Gang  $3,1 \pm 1,0$  Minuten nach Beginn der DA-Stimulierung). Die Flüssigkeitssekretion setzt in vielen Drüsen bereits innerhalb der ersten Minute nach Beginn der DA-Stimulierung ein, die maximale Sekretionsrate wird etwa drei Minuten nach Einsetzen der DA-Stimulierung erreicht. Als Triebkraft für die Sekretion in den P-Zellen werden vor allem die apikal lokalisierte, aber auch eine basolaterale  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  angenommen. Beide benötigen für ihre Aktivität ATP, das von den Mitochondrien gebildet wird. In den Ausführungszellen wird durch die DA-Stimulierung vermutlich die Aktivität der apikalen  $\text{V-H}^+\text{-ATPase}$  gesteigert (Lang & Walz, 2001). Der gesteigerte ATP-Verbrauch in beiden Zelltypen geht mit der Steigerung des mitochondrialen Stoffwechsels einher, und der Zeitpunkt der maximalen Sekretionsrate und der maximalen Stoffwechselaktivität stimmen in etwa überein. Der in der vorliegenden Arbeit gemessene Anstieg der Stoffwechselaktivität ist transient und erreicht nach Auswaschen des DA wieder den Ruhewert. Anschließend kommt es sowohl in den Acinuszellen als auch in den Ausführungszellen ohne eine erneute Stimulierung häufig wieder zu einem geringen Anstieg der "Ratio" der Autofluoreszenz. Dieser Anstieg der Stoffwechselaktivität in den unstimulierten Ausführungsgängen paßt mit dem Befund von Gupta & Hall (1983) zusammen, daß die unstimulierten Ausführungsgänge die Zusammensetzung des Primärspichels stärker modifizieren als die stimulierten. Die für diese Modifikation benötigte Energie kann durch eine Steigerung der Stoffwechselaktivität zur Verfügung gestellt werden.

Unerwarteterweise habe ich nach 5-HT-Stimulierung nur in zwei der sieben analysierten Präparate ein Anstieg der "Ratio" gemessen, der sowohl in den Acini als auch in den Ausführungsgängen stattfand. Für die Ausführungsgänge erwarte ich nach Applikation von 5-HT keinen Anstieg der Stoffwechselaktivität, da bislang keine Reaktion der Gänge auf 5-HT gemessen wurde (Lang & Walz, 1999a). Allerdings zeigten Baumann et al. (2002) eine serotonerge Innervierung der direkt an die Acini anschließenden Gangstücke. Die wenigen 5-HT-stimulierten Anstiege der "Ratio", die ich gemessen habe, wurden eventuell an solchen serotonerg innervierten Gangabschnitten gemessen. In den Acinuszellen dagegen war der nicht vorhandene Anstieg der Stoffwechselaktivität nach 5-HT-Stimulierung unerwartet. Die P-Zellen sind dopaminerg und serotonerg innerviert, und es wird angenommen das sie sowohl nach DA als auch nach 5-HT-Stimulierung die Speichelflüssigkeit sezernieren. Zwar ist die Sekretionsrate nach 5-HT-Stimulierung geringer als nach DA-Stimulierung (Just & Walz, 1996; Rietdorf et al., 2003), jedoch beruht sie vermutlich auf den gleichen zellulären Mechanismen und sollte deshalb auch mit einer Erhöhung der mitochondrialen Stoffwechselaktivität einhergehen.

Zusammenfassend ergibt sich, daß die mikrofluorometrischen Messungen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in den Acinuszellen mit einer Reihe von Problemen behaftet sind. Volumenänderungen nach Stimulierung der Präparate mit DA oder 5-HT erschweren die quantitative Messung beträchtlich und schließen nicht-ratiometrische Messungen mit "single-wavelength dyes" aus. Änderungen der Autofluoreszenz spielen wahrscheinlich eine geringere Rolle. Sehr enttäuschend ist es, daß sich die C-Zellen nicht mit Ionen-sensitiven Fluoreszenzfarbstoffen beladen lassen. In den P-Zellen habe ich keine Hinweise auf deutliche Änderungen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration während einer DA-Stimulierung gefunden. Aus den genannten Gründen werden mikrofluorometrische Messungen der  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ - und  $\text{Cl}^-$ -Konzentration als noch problematischer eingeschätzt. Deshalb wird in dieser Arbeit die mikrofluorometrische Messung intrazellulärer Ionenkonzentrationen vorerst aufgegeben.

### 4.3 Messungen der Proteinsekretion

Das Wissen über die Bestandteile des Insektspeichels ist groß, vor allem bei krankheitsübertragenden Arten (z. B. Wirtz, 1990; Kerlin & Hughes, 1992; Narasimhan et al., 2002). Welche Signalwege die Abgabe dieser Bestandteile in den Speichel aktivieren, ist dagegen in den meisten Fällen unbekannt. Für die Speicheldrüsen der Schmeißfliege *Calliphora* ist beschrieben, daß die Proteinsekretion nach Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ - und cAMP-Konzentrationen ausgelöst wird (Hansen Bay, 1978a,b). Ansonsten werden Untersuchungen vor allem an Zecken durchgeführt, welche nahe mit Insekten verwandt sind. Bei ihnen aktivieren eine Erhöhung der intrazellulären Konzentrationen von  $\text{PGE}_2$  und cAMP die Proteinsekretion (Qian et al., 1998; Yuan et al., 2000).

Ich habe in der Speicheldrüse von *P. americana* die Signalwege untersucht, welche die Proteinsekretion aktivieren. Bedeutend für die Aktivierung der Proteinsekretion ist eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration. Findet gleichzeitig eine Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration statt, so entspricht die Proteinsekretion qualitativ und quantitativ der 5-HT-stimulierten Proteinsekretion.

Für einen sicheren Nachweis der Beteiligung einzelner Botenstoffe an der Signalübertragung muß diese Beteiligung auf mehreren unabhängigen Wegen gezeigt werden. Dazu sollten Aktivatoren und Hemmstoffe eine entgegengesetzte Wirkung zeigen, die sich im Optimalfall bei gleichzeitiger Applikation aufheben läßt. Außerdem sollte direkt gemessen werden, ob die verwendeten Substanzen im untersuchten Gewebe auch die für sie beschriebene Wirkung haben und spezifisch auf bestimmte Botenstoffe oder andere Zielmoleküle wirken. In den von mir durchgeführten Experimenten gibt es verschiedene methodische Probleme, die diesen sauberen Nachweis verhinderten.

Die mikrofluorometrischen Messungen zeigen einen Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in den P-Zellen und Ausführgangzellen nach Applikation von Ionomycin. Allerdings wird das Ionomycin für die mikrofluorometrischen Messungen als stehende Lösung appliziert, wohingegen die Lösungen in den hier durchgeführten Experimenten ständig getauscht werden. Außerdem kann kein  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal von den für die Proteinsekretion bedeutenden C-Zellen gemessen werden. Der in den mikrofluorometrischen Experimenten gemessene Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ist also streng genommen nicht auf die hier durchgeführten Experimente zur Messung der Proteinsekretion übertragbar.

Gray & House (1982) haben gezeigt, daß in Abwesenheit von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  keine anhaltende DA-stimulierte Flüssigkeitssekretion stattfindet. Eine anhaltende Flüssigkeitssekretion ist jedoch eine Voraussetzung für die biochemische Proteinbestimmung, weshalb die Bedeutung des extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  für die Proteinsekretion von mir nicht untersucht werden konnte.

Die intrazellulären Konzentrationen cyclischer Nucleotide und deren Änderungen sind nur schwierig direkt zu bestimmen (Schwartz, 2001; Zaccolo et al., 2002). In den Schabenspeicheldrüsen hätte die Wirksamkeit der verwendeten Substanzen theoretisch mit dem cAMP-empfindlichen Fluoreszenzfarbstoff FICRhR (Adams et al., 1991; Gorbunova & Spitzer, 2002) verifiziert werden können. Die Anwendung dieses Farbstoffs bereitet vor allem zwei Probleme: er muß durch Mikroinjektion in die Zellen gebracht werden, und es ist einer der weniger verbreiteten "one-excitation dual-emission" Farbstoffe (Adams et al., 1991). In den meisten Fällen wird die intrazelluläre cAMP-Konzentration indirekt am Gewebehomogenat bestimmt (z. B. Heslop & Berridge, 1980; Blenau et al., 2000). Für ein aus verschiedenen Zelltypen aufgebautes Gewebe, wie die Schabenspeicheldrüse,

können jedoch keine Aussagen über die Konzentrationsänderungen in definierten Zelltypen gemacht werden. Deshalb ist diese Methode nicht als Kontrolle für die Wirksamkeit der verwendeten Substanzen geeignet.

Ebenso finden gängige Meßmethoden für die Protein Kinase C- und Protein Kinase A-Aktivität am Gewebehomogenat statt (Müller, 1997; Grünbaum & Müller, 1998). Eine Alternative sind Färbungen mit Antikörpern gegen eine Protein Kinase C, wobei aus der Verlagerung des Moleküls aus dem Cytoplasma (inaktive Form) an die Zellmembran (aktivierte Form) auf dessen Aktivierung geschlossen werden kann (Ali & Sarna, 2002). Ein Problem derartiger Antikörper-Färbungen ist, dass nur eine erfolgreiche Färbung einen eindeutigen Schluß zuläßt, während aus einer nicht-erfolgreichen Färbung nicht auf die Abwesenheit des Antigens dieses Antikörpers geschlossen werden kann.

Die angeführten Methoden sind im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht sinnvoll anwendbar, um die Wirksamkeit der verwendeten Substanzen abzusichern. Deshalb sind die Ergebnisse als erste Hinweise auf die Beteiligung der entsprechenden Signalwege anzusehen, welche die Formulierung einer Arbeitshypothese ermöglichen. Eine Absicherung der Hypothese sollte im Rahmen nachfolgender Versuche erfolgen.

#### **4.3.1 Vitalmikroskopische Analysen der Proteinsekretion**

Ich habe versucht, die Degranulation von Vesikeln vitalmikroskopisch zu charakterisieren. Vorteile dieser Methode sind eine gute zeitliche Auflösung sowie die Möglichkeit (bei Messungen an Gewebestückchen), ohne chemische Substanzen auszukommen, welche die zelluläre Signalübertragung beeinflussen. Das Ergebnis der durchgeführten Messungen ist, daß die Methode an der Schabenspeicheldrüse nicht anwendbar ist.

Das größte Problem der Messungen waren Bewegungs-Artefakte. Die Auswertung der verwendeten Methode basiert auf der Analyse von Helligkeitsänderungen, welche in Differenzbildern auftreten. Diese Differenzbilder werden durch die Subtraktion der aufeinanderfolgend aufgenommenen Einzelbilder berechnet (Terakawa et al., 1991). Neben der Degranulation von Vesikeln führen auch Bewegungs-Artefakte zu einer Helligkeitsänderung in den Differenzbildern. Eine Bewegung des Präparats in der X- und Y-Ebene kann durch einen Vergleich der Einzelbilder erkannt werden. Außerdem kann eine Bewegung in der Z-Ebene stattfinden, die zu einer Änderung der Fokusebene führt. Diese Änderung ist nicht eindeutig über den Vergleich der Einzelbilder zu erkennen und kann deshalb auch bei sorgfältiger Analyse der Einzelbilder nicht als Fehlerquelle ausgeschlossen werden.

Trotz der Bewegungen kann in wenigen Fällen eindeutig die Exocytose einzelner Vesikel beobachtet werden. Allerdings ist (1) die Gesamtzahl an Versuchen, in denen eine Exocytose beobachtet werden kann, und (2) die Häufigkeit der Ereignisse in diesen Versuchen sehr gering. Deshalb ist eine zuverlässige Quantifizierung der Proteinsekretion mit dieser Methode nicht möglich.

Dazu kommt, daß sich die Vesikeldichte in den C-Zellen während einer langandauernden 5-HT-Stimulierung entgegen der Erwartung in den meisten Fällen nicht stark ändert. Nur in einer Kontrollmessung, in der die Drüse in dem für die Sekretionsmessungen verwendeten Aufbau für eine Dauer von 45 Minuten mit 5-HT stimuliert wird, kann eine deutlich geringere Vesikelfüllung in den C-

Zellen beobachtet werden (s. Abb. 22). Im Gegensatz zu der von mir beobachteten anhaltend dichten Vesikelfüllung in den C-Zellen berichten Just & Walz (1996), daß (einzelne) C-Zellen bereits nach einer 20 Minuten dauernden Stimulierung mit  $1 \mu\text{M}$  5-HT keine sekretorischen Vesikel mehr enthielten. Dieser scheinbare Widerspruch kann durch eine unterschiedliche Kompetenz einzelner C-Zellen zur Proteinsekretion erklärt werden: während in einigen (kompetenten) Zellen die sekretorischen Vesikel sehr schnell und nahezu vollständig degranulieren, setzt die Exocytose in anderen (weniger kompetenten) C-Zellen erst spät ein. Auch Bland & House (1971) sowie Day (1951) berichteten bereits von Unterschieden in der Vesikelfüllung einzelner C-Zellen und wiesen auf unterschiedliche Reifungszustände der Zellen hin. Eine solche Variabilität in der Reaktion der Zellen erschwert es, anhand der Messung einzelner Zellen oder kleiner Ausschnitte des Präparats Aussagen über die "übliche" Reaktion der Zellen zu machen.

Es ist möglich, daß aufgrund der relativ geringen Bildaufnahmezeit (4 Bilder pro Sekunde) zwischen den Bildaufnahmen ablaufende Exocytosen nicht zuverlässig beobachtet werden konnten, zumal in exokrinen Drüsen die Exocytose wiederholt an derselben Stelle stattfinden kann (Campos-Toimil et al., 2002). Allerdings handelt es sich bei Zellen von Speicheldrüsen, wie z.B. auch bei Pankreas-Acinuszellen, um langsam sezernierende Gewebe (Fujita-Yoshigaki, 1998), in denen diese Methode auch bereits mit noch geringeren Raten der Bildaufnahme (2 bzw. 3 Bilder pro Sekunde) erfolgreich angewendet wurde (Fujiwara et al., 1999; Nakahari et al., 2000).

Allerdings kann es auch an der enzymatischen Dissoziation der Zellen liegen, daß ich nur wenige Exocytosevorgänge beobachtet habe. Quissell & Tabak (1989) merken an, daß Zellen nach einer solchen Behandlung die Fähigkeit zur normalen Reaktion auf eine Stimulierung verlieren können. Dieses kann zum Beispiel an einer Beschädigung der Rezeptoren auf der Zelloberfläche liegen. In einigen Zellen müssen Zell-Zellkontakte für eine normale Reaktion der Zellen vorhanden sein (Meda, 1996), die bei Versuchen an Einzelzellen nicht mehr vorhanden waren, oder die Zellen müssen nach der Isolierung länger ruhen, bevor sie in einem Versuch wieder reagieren. Momentan kann jedoch nicht beurteilt werden, ob die enzymatische Dissoziation eine Ursache für die fehlende Reaktion der Zellen ist, da ich auch in den Versuchen mit Drüsenläppchen keine deutliche Reaktion der Zellen messe.

Eine Möglichkeit, individuelle Vesikel besser sichtbar zu machen, ist ihre Färbung mit Fluoreszenzfarbstoffen. Anschließend kann ihre Abgabe beobachtet werden (Steyer et al., 1997; Zenisek et al., 2000). Dabei werden häufig nicht alle lichtmikroskopisch sichtbaren Vesikel gefärbt (Campos-Toimil et al., 2002). Das Prinzip der Färbung beruht darauf, daß sich Fluoreszenzfarbstoffe mit einem leicht basischen pH-Wert in sauren Organellen anreichern. Viele reife sekretorische Vesikel haben einen sauren pH-Wert. Allerdings wurde in einigen Zellen auch gezeigt, daß der pH-Wert in den letzten Schritten der Reifung wieder ansteigen kann, so daß die am stärksten gefärbten Vesikel in diesen Zellen nicht die zuerst abgegebenen sind (Thévenod, 2002). Ein anderer methodischer Ansatz, die Sekretion fluoreszierender Vesikel sichtbar zu machen, wäre die Messung der Fluoreszenz über dem Ausführungsgang während einer Stimulierung. Wenn eine genügend große Menge fluoreszierender Vesikel sezerniert wird und durch den Ausführungsgang fließt, könnte in diesem ein Anstieg der Fluoreszenz gemessen werden.

Das Verfahren der lichtmikroskopischen Quantifizierung der Exocytose sekretorischer Vesikel scheint an der Schabenspeicheldrüse aufgrund der Bewegung des Präparats, der unterschiedlichen

Kompetenz einzelner Zellen zur Proteinsekretion sowie der anscheinend geringen Exocytoserate nicht geeignet.

### **4.3.2 Biochemische Proteinbestimmungen**

#### **4.3.2.1 Methodische Aspekte**

Die biochemische Bestimmung des Proteingehalts im Speichel erlaubt es zu vergleichen, wie stark verschiedene Substanzen die Proteinsekretion aktivieren oder modulieren. Dagegen hat diese Methode, verglichen mit mikroskopischen Methoden, ein schlechtes zeitliches Auflösungsvermögen. In den durchgeführten Versuchen habe ich einen Zeitraum von 2,5 Minuten zwischen den Probenahmen gewählt. Dieser Zeitraum ermöglicht es auch, in Versuchen, in denen nur eine geringe Proteinsekretion aktiviert wurde, diese nachzuweisen. Aussagen über die Kinetik der Proteinsekretion sind nur möglich, wenn der Proteingehalt in mehreren aufeinanderfolgenden Proben gemessen werden kann. Um dieses zu gewährleisten, habe ich den lange Zeitraum einer 45 Minuten dauernden Teststimulierung gewählt. Ob diese lange Erhöhung der Konzentration intrazellulärer Botenstoffe die Reaktionen der Zellen eventuell beeinträchtigt, wird in Kapitel 4.3.2.3 zum Einfluß der Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ausführlicher diskutiert.

Sofern möglich, wird die Proteinsekretion auf eine vorangegangene Kontrollstimulierung normalisiert (Dosis-Wirkungskurve und Versuche mit Hemmstoffen). In den Experimenten, mit denen untersucht wurde, welche Signalwege die Proteinsekretion aktivieren, war dies leider nicht möglich. Aus zwei Gründen wird die Stimulierung trotzdem in diesem Ablauf durchgeführt: (1) Versuche, die eine Normalisierung der Daten ermöglichen, hätten zu lange gedauert ( $> 100$  Minuten), (2) die Proteinsekretion ist während einer zweiten 5-HT-Stimulierung geringer (s. Abb. 24). Werden Substanzen appliziert, die nur eine geringe Proteinsekretion aktivieren, so wird diese nur während einer ersten Stimulierungsperiode zuverlässig nachzuweisen sein.

#### **4.3.2.2 Wird die 5-HT stimulierte Proteinsekretion durch DA beeinflusst?**

In allen Experimenten war ein kontinuierlicher Fluß proteinfreien Speichels notwendig, wie er durch Stimulierung mit DA gewährleistet werden kann. Diese Stimulierung soll einen Anstieg der für die Proteinsekretion wichtigen Botenstoffe  $\text{Ca}^{2+}$  und cAMP in den Acinuszellen auslösen (House & Ginsborg, 1985). In mehreren Arbeiten wurde eine Kopplung der Acinuszellen nachgewiesen: eine elektrische Kopplung zeigten Ginsborg et al. (1974) bei *N. cinerea*, eine Farbstoffkopplung wurde 1973 von House ebenfalls für *N. cinerea* und 1999b von Lang & Walz für *P. americana* gezeigt. Auch wenn die C-Zellen selber nicht dopaminerg innerviert sind (Baumann et al., 2002), kann deshalb nicht ausgeschlossen werden, daß eine DA-Stimulierung auch die C-Zellen und so auch die 5-HT-stimulierte Proteinsekretion beeinflusst.

Die vorliegende Arbeit zeigt, daß DA die maximal durch 5-HT stimulierten Raten der Proteinse-



ekretion nicht beeinflusst. Deshalb kann aus den Experimenten, die in Anwesenheit von DA stattfanden, auf die der Proteinsekretion zugrunde liegenden Signalwege zurückgeschlossen werden.

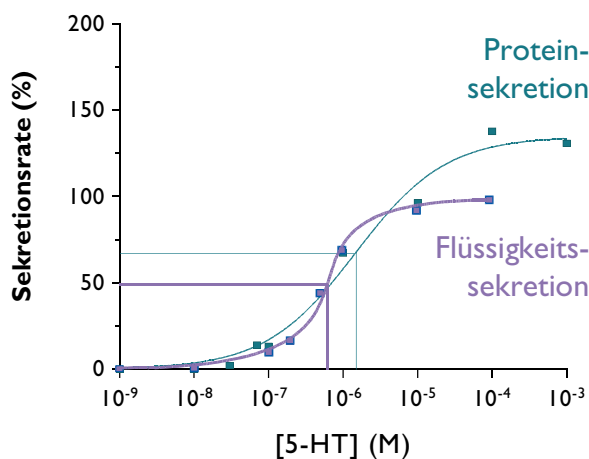
#### 4.3.2.3 der 5-HT-stimulierte Proteinsekretion: Dosis-Wirkungskurve

Sekretionsprozesse können, müssen aber nicht dosisabhängig erfolgen. So findet die 5-HT-stimulierte Flüssigkeitssekretion in der Speicheldrüse von *Calliphora* dosisabhängig statt (Berridge, 1972; Berridge & Prince, 1972), während die Proteinsekretion offenbar unabhängig von der 5-HT-Konzentration ist, mit welcher die Drüsen stimuliert wurden (Hansen Bay, 1978a,b).

In der Schabenspeicheldrüse verlaufen die Flüssigkeits- und die Proteinsekretion dosisabhängig. Abb. 37 stellt die von Just & Walz (1996) publizierte Dosis-Wirkungskurve der 5-HT-stimulierten Flüssigkeitssekretion der im Rahmen dieser Arbeit aufgestellten Dosis-Wirkungskurve der Proteinsekretion gegenüber.

Welchen physiologischen Vorteil hat es, daß 5-HT beide Sekretionsprozesse aktiviert?

Ein Vorteil könnte es sein, daß unabhängig von einer gleichzeitigen DA-Stimulierung bzw. Erregung der dopaminergen Neurone, die sezernierten Proteine aus den Speichelgängen ausgewaschen werden. Um diese Funktion zu gewährleisten, darf der Schwellenwert für die Flüssigkeitssekretion nicht oberhalb des Wertes für die Proteinsekretion liegen, was auch mit den Ergebnissen übereinstimmt. Für beide Prozesse wurde in etwa der gleiche Schwellenwert gefunden. Die beiden Dosis-Wirkungskurven unterscheiden sich in ihrem oberen Bereich: die der Flüssigkeitssekretion sättigt früher als die der Proteinsekretion. Die sezernierte Flüssigkeit genügt anscheinend noch für das vollständige Ausspülen der Proteine.



**Abb. 37: Dosis-Wirkungskurven der 5-HT-stimulierten Protein- und Flüssigkeitssekretion.** Die Dosis-Wirkungskurve der Flüssigkeitssekretion (Just & Walz, 1996) steigt steiler an ( $EC_{50}$ :  $6 \times 10^{-7}$  M 5-HT) und sättigt früher als die der Proteinsekretion ( $EC_{50}$ :  $1,5 \times 10^{-6}$  M 5-HT). Der Schwellenwert für die Aktivierung der Sekretion liegt für beide Kurven zwischen  $10^{-8}$  und  $10^{-7}$  M 5-HT.

Neben den dosisabhängigen Unterschieden in der maximalen Rate der Proteinsekretion finde ich auch Unterschiede in der Kinetik. Je höher die zur Stimulierung verwendete 5-HT-Konzentration ist, desto schneller wird die maximale Rate der Proteinsekretion erreicht. Außerdem ist der Zeitverlauf der Proteinsekretion deutlicher transient. Bei Verwendung einer höheren 5-HT-Konzentration könnte eine größere Anzahl von 5-HT-Rezeptoren aktiviert werden. Dies würde zu einem schnelleren und / oder höheren Anstieg der Botenstoffkonzentration in den C-Zellen führen. Dieses Szenario könnte die schneller einsetzende maximale Proteinsekretion und ihre höhere maximale Rate erklären. Während einer anhaltenden Stimulierung kann es dazu kommen, daß die Zellen desensibilisieren, also unempfindlicher für eine weitere Stimulierung mit der gleichen Substanz

werden. Die Desensibilisierung kann dadurch ausgelöst werden, daß Rezeptoren (1) aus der Zellmembran entfernt oder (2) z. B. durch Phosphorylierungen inaktiviert werden, oder daß (3) ein Mangel an bestimmten Botenstoffen in der Zelle entsteht (Dalton, 1987; Alberts et al., 1994; Pierce et al., 2002). Da die Desensibilisierung von der Anzahl aktivierter Rezeptoren bzw. der Stärke ihrer Aktivierung abhängt, wird sie bei Verwendung niedriger 5-HT-Konzentrationen geringer sein als nach Stimulierung mit hohen 5-HT-Konzentrationen.

#### **4.3.2.4 Aktivieren die Botenstoffe $Ca^{2+}$ , cAMP und / oder cGMP die Proteinsekretion?**

Die Proteinsekretion ist ein Exocytosevorgang. In tierischen Zellen kann die regulierte Exocytose durch die Botenstoffe  $Ca^{2+}$ , cAMP und / oder cGMP ausgelöst und / oder moduliert werden (Kasai, 1999; Tse & Tse, 1999; Wildemann & Bicker, 1999; Zaccolo et al., 2002). Die sehr schnell ablaufende Exocytose synaptischer Vesikel wird durch eine Erhöhung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration ausgelöst. Auch in den meisten anderen Zellen ist die Erhöhung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration das direkte Signal für die Aktivierung der Exocytose. Diese kann durch eine gleichzeitige Erhöhung anderer Botenstoffe moduliert, häufig verstärkt, werden (Hille et al., 1999; Brose & Neher, 2002; Rettig & Neher, 2002). In langsamer sezernierenden Zellen, z. B. den Acinuszellen von Speicheldrüsen, kann cAMP die Proteinsekretion auch direkt auslösen (Quissell & Tabak, 1989; Fujita-Yoshigaki, 1998). Die Erregungs-Sekretions-Kopplung für die Proteinsekretion wird vor allem an Wirbeltiermodellen untersucht. Einen Überblick, welche funktionellen Unterschiede zwischen den Botenstoffen  $Ca^{2+}$  und cAMP an diesen Modellsystemen gezeigt wurden, wird im Anhang (Abb. A1) gegeben.

In einer Reihe pharmakologischer Experimente wird in dieser Arbeit die Proteinsekretion nach Erhöhung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -, cAMP- und / oder cGMP-Konzentration gemessen. Die Ergebnisse dieser Versuche sollen Rückschlüsse auf die an der Erregungs-Sekretions-Kopplung beteiligten Signalwege ermöglichen. Ein wesentliches Ergebnis ist, daß die Proteinsekretion durch eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration stärker aktiviert wird als durch eine Erhöhung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration. Nur wenn die Konzentrationen beider Botenstoffe simultan erhöht wird, entspricht die gemessene Proteinsekretion qualitativ und quantitativ einer durch 5-HT-Stimulierung aktivierten.

#### **4.3.2.4.1 Proteinsekretion nach Erhöhung der intrazellulären $Ca^{2+}$ -Konzentration**

Die intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Konzentration wird durch Applikation von Ionomycin erhöht. Ionomycin ist ein Antibiotikum, das sich als  $Ca^{2+}$ -Ionomycin-Komplex in die Zellmembran einlagert und eine globale Erhöhung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration auslöst (Bennett et al., 1979). Die Applikation von 5  $\mu$ M Ionomycin aktiviert eine sehr langsam einsetzende Proteinsekretion, die nicht mehr als 18 % der 5-HT-stimulierten Proteinsekretion beträgt.

Wie sind diese Ergebnisse zu interpretieren?

(1) Die intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Konzentration wird durch Ionomycin nicht effektiv erhöht, (2) das räumliche und / oder zeitliche Muster der  $Ca^{2+}$ -Erhöhung, welches für eine effektive Stimulierung der Proteinsekretion erforderlich ist, wird durch Ionomycin-Applikation nicht imitiert oder (3)  $Ca^{2+}$  aktiviert die Proteinsekretion nicht direkt.

Ein Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration kann mikrofluorometrisch direkt gemessen werden. Die von mir durchgeführten Versuche zeigen, daß Ionomycin einen Anstieg der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in den Acinuszellen auslöst. Allerdings war dieser Anstieg erst bei Applikation höherer Ionomycin-Konzentrationen meßbar und ist aufgrund methodischer Probleme nicht zu quantifizieren. Außerdem kann mit der mikrofluorometrischen Messung nur die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in den P-Zellen bestimmt werden. Die Messung von Änderungen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in den C-Zellen, welche für die Absicherung dieser Experimente nötig wäre, ist nicht möglich. Deshalb fehlt leider der direkte Nachweis, daß die verwendete Ionomycin-Konzentration ( $5 \mu\text{M}$ ) die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in den C-Zellen effektiv erhöht. Indirekt wird jedoch gezeigt, daß Ionomycin auch bereits kurz nach der Applikation physiologische Wirkungen hat: die gemessene Rate der Flüssigkeitssekretion steigt an (s. Abb. A4, C im Anhang).

Neben dem Betrag der  $\text{Ca}^{2+}$ -Erhöhung ist in vielen Zellen auch das räumliche Muster der  $\text{Ca}^{2+}$ -Erhöhung wichtig (Ashby & Tepikin, 2002). Die Aktivierung membranständiger Rezeptoren oder spannungsgesteuerter  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle führt in vielen Zellen zu einer hoch lokalen Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, welche die globale Erhöhung um ein Vielfaches übersteigt. So wird z. B. in Bipolarzellen des Goldfischs eine globale Steigerung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration auf  $1 \mu\text{M}$  gemessen, während die lokale  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration bis auf  $50 \mu\text{M}$  ansteigt (von Gersdorff & Matthews 1994). In Chromaffinzellen wird ein globaler Anstieg auf  $1 \mu\text{M}$  gemessen, während der lokale Anstieg  $10 - 100 \mu\text{M}$  beträgt (Augustine & Neher, 1992). Ein räumliches Muster der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Erhöhung, welches der durch einen natürlichen Agonisten ausgelösten lokalen Erhöhung nicht entspricht, könnte zum Unterschätzen der physiologischen Wirkungen des  $\text{Ca}^{2+}$  führen. Das zeitliche Muster einer durch Ionomycin oder physiologische Stimulierung aktivierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Erhöhung ist unterschiedlich: da sich Ionomycin erst in die Zellmembran einlagern muß, ist der Anstieg der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration langsamer als nach einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom von außen oder der  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus intrazellulären Speichern (Augustine & Neher, 1992). Sofern  $\text{Ca}^{2+}$  die Proteinsekretion direkt aktiviert, reicht dieser Unterschied jedoch vermutlich nicht aus, um die von mir beobachtete geringe Rate und die starke Verzögerung der Proteinsekretion zu erklären. Die Proteinsekretion setzt erst zehn Minuten nach Applikation des Ionomycins ein, während bereits 2,5 Minuten nach Beginn einer 5-HT-Stimulierung Proteine im Speichel nachweisbar sind.

Zusammengenommen lassen diese Ergebnisse vermuten, daß die Proteinsekretion nicht direkt und/ oder allein durch eine Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration aktiviert wird.

Eine dauerhafte Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration kann Apoptose auslösen (Kroemer et al., 1998) oder zu einer funktionellen Beeinträchtigung der intrazellulären Signalübertragung führen. Von mir durchgeführte Versuche mit anderen Ionomycin-Konzentrationen ( $2$  und  $10 \mu\text{M}$ ) zeigen, daß die gewählte Konzentration ( $5 \mu\text{M}$ ) einen Kompromiß zwischen zu geringer Wirksamkeit und zu starker Schädigung der Zellen darstellt. Zumindest bezogen auf die Proteinsekretion scheinen die Zellen durch die anhaltende Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration nicht physiologisch beeinträchtigt zu sein: die 5-HT-Kontrollstimulierung im Anschluß an die Applikation von Ionomycin bewirkt in allen Präparaten einen Anstieg der Proteinsekretion.

#### 4.3.2.4.2 Proteinsekretion nach Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration

Die intrazelluläre cAMP-Konzentration wurde in der vorliegenden Arbeit auf verschiedene Weise erhöht: (1) durch direkte Applikation von db cAMP im Ringer, (2) durch pharmakologische Stimulierung der Adenylatcyclase mit Forskolin, (3) durch Hemmung der Phosphodiesterasen mit IBMX oder (4) durch gleichzeitige Stimulierung der Adenylatcyclase und Hemmung der Phosphodiesterasen. Alle vier Möglichkeiten stimulieren die Proteinsekretion, welche jedoch qualitativ und quantitativ verschieden ausfällt (s. Abb. 30 und Tab. A7 im Anhang). In den Speicheldrüsen von *Calliphora* wurde nach 5-HT-Stimulierung ein transientser Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration gemessen. Bei gleichzeitiger Hemmung der Phosphodiesterasen kam es zu einem kontinuierlichen Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration. Die am Ende des Versuchs erreichte cAMP-Konzentration in den Zellen war deutlich höher als eine ohne Phosphodiesterase-Hemmstoffe (Heslop & Berridge, 1980). Daß die intrazelluläre cAMP-Konzentration nach Applikation von 5-HT oder nach direkter Stimulierung der Adenylatcyclase mit Forskolin nur transient ansteigt, kann durch eine verzögerte Aktivierung von Phosphodiesterasen erklärt werden. Diese regulieren die intrazelluläre cAMP-Konzentration bei kontinuierlicher Aktivität der Adenylatcyclasen auf ein erhöhtes, aber konstant bleibendes Niveau.

Sofern die Adenylatcyclase der C-Zellen der Speicheldrüse von *P. americana* eine basale Aktivität aufweist, wird die Applikation eines Phosphodiesterase-Hemmstoffs vermutlich zu einem kontinuierlichen Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration führen. Dagegen wird, wie oben beschrieben, die Aktivierung der Adenylatcyclase mit Forskolin vermutlich nur einen transienten Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration auslösen. Diese Unterschiede könnten die geringere Wirksamkeit der Forskolin-Stimulierung im Vergleich mit der IBMX-Stimulierung erklären. Gray et al. (1984) haben bezüglich der Flüssigkeitssekretion der Speicheldrüsen einer anderen Schabenart ebenfalls entsprechende Unterschiede gefunden: die Sekretionsrate nach Stimulierung mit 100  $\mu\text{M}$  IBMX entsprach der durch 1  $\mu\text{M}$  DA ausgelösten, während Stimulierung mit 100  $\mu\text{M}$  Forskolin eine geringere Sekretionsrate aktivierte.

In Versuchen zur Messung der Ionen- und Flüssigkeitssekretion an Malpighischen Gefäßen von *Locusta* und *Teleogryllus* (z. B. Al-Fifi et al., 1998; Xu & Marshall, 2000) wird nur IBMX oder Forskolin appliziert. Die Wirksamkeit der erzielten cAMP-Erhöhung hängt in diesen Versuchen stark davon ab, mit welcher Geschwindigkeit der cAMP-Abbau einsetzt (bei Applikation von Forskolin), oder wie hoch die basale Aktivität der Adenylatcyclase ist (bei Applikation von IBMX). Man kann (vermutlich) einen höheren cAMP-Anstieg auslösen, indem man beide Prozesse gleichzeitig gezielt beeinflusst: die cAMP-Bildung steigert und den cAMP-Abbau hemmt. Entsprechende Befunde haben Ali & Orchard (1994) sowie Heslop & Berridge (1980) veröffentlicht. Die Autoren haben in den Speicheldrüsen von *Locusta* bzw. *Calliphora* die Phosphodiesterasen gehemmt und den Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration in simultaner Anwesenheit oder Abwesenheit von 5-HT gemessen. Wenn zusätzlich zur Hemmung der Phosphodiesterasen auch die Adenylatcyclase mit 5-HT stimuliert wurde, stieg die cAMP-Konzentration stärker an als ohne die gleichzeitige Stimulierung der Adenylatcyclasen.

Entsprechend scheint auch in der Speicheldrüse von *P. americana* die pharmakologische Stimulierung der Adenylatcyclase bei gleichzeitiger Hemmung der Phosphodiesterasen einen stärkeren Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration auszulösen als bei Applikation nur einer der beiden

Substanzen: die maximale Rate der Proteinsekretion wird deutlich gesteigert. Sie ist statistisch nicht signifikant unterschiedlich zu der nach 5-HT-Stimulierung.

Insgesamt zeigen die Experimente, daß eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration die durch Stimulierung mit 5-HT aktivierte Proteinsekretion qualitativ und zum Teil, nämlich während der Teststimulierung, auch quantitativ imitieren kann. Allerdings kann der Proteinsekretion während der Kontrollstimulierung in keinem der Experimente imitiert werden. Deshalb ist es wahrscheinlich, daß cAMP zwar direkt die Proteinsekretion aktiviert, aber noch andere Botenstoffe an der 5-HT-stimulierten Proteinsekretion beteiligt sind.

#### **4.3.2.4.3 Proteinsekretion nach gleichzeitiger Erhöhung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>- und cAMP-Konzentrationen**

Die intrazellulären Konzentrationen von Ca<sup>2+</sup> wird in der vorliegenden Arbeit durch Applikation von Ionomycin erhöht. Dagegen wird die intrazelluläre cAMP-Konzentration auf drei verschiedene Weisen erhöht: durch Applikation von Forskolin, von IBMX oder von Forskolin & IBMX. Applikation von Forskolin zusammen mit dem Ca<sup>2+</sup>-Ionophor Ionomycin verstärkt die maximale Rate der Proteinsekretion additiv gegenüber der Proteinsekretion nach Applikation von entweder Forskolin oder Ionomycin. Nach simultaner Applikation von IBMX & Ionomycin wurde sie sogar potenziert. Außerdem wurde die Kinetik der Proteinsekretion durch die gleichzeitige Applikation von Forskolin & Ionomycin oder IBMX & Ionomycin beeinflusst: die Proteinsekretion zeigte einen transienten Verlauf, wobei ihr Maximum schneller erreicht wurde als nach Stimulierung nur mit Ionomycin, Forskolin oder IBMX.

Die Interpretation dieser Ergebnisse hängt kritisch davon ab, wie stark und wie schnell die verwendeten Substanzen die intrazellulären Ca<sup>2+</sup>- oder cAMP-Konzentrationen erhöhen. Direkte Messungen, die diese Frage beantworten könnten, liegen nicht vor. Bezüglich des Zeitverlaufs der Ionomycin-induzierten Ca<sup>2+</sup>-Erhöhung gibt die vorliegende Arbeit jedoch indirekte Hinweise: Applikation von Ionomycin stimuliert die Flüssigkeitssekretion innerhalb von 2,5 Minuten (s. Abb. A3 im Anhang, vgl. C und A). Also scheint Ionomycin sehr schnell nach der Applikation einen Anstieg der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration auszulösen. Dieser Anstieg der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration aktiviert jedoch nicht sofort eine Proteinsekretion. Diese setzt erst zehn Minuten nach Applikation des Ionomycins ein und steigt über die nächsten 30 Minuten langsam auf einen Betrag, der nur 18% der durch 5-HT aktivierten Proteinsekretion entspricht. Dagegen setzt die Proteinsekretion bereits fünf Minuten nach Applikation von Forskolin oder IBMX ein - also zu einem Zeitpunkt, zu dem Ionomycin zwar eine Flüssigkeitssekretion stimuliert, aber noch keine nennenswerte Proteinsekretion. Außerdem kann nach Applikation von IBMX eine deutlich höhere Proteinsekretion aktiviert werden, die etwa 27% der durch 5-HT stimulierten Proteinsekretion betrug. Diese Beobachtungen machen es sehr wahrscheinlich, daß die Proteinsekretion ursächlich durch cAMP stimuliert wird, und quantitativ durch die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration moduliert, nämlich verstärkt wird. Eine derartige cAMP-stimulierte und Ca<sup>2+</sup>-modulierte Aktivierung der Proteinsekretion ist z. B. in der Parotisdrüse von Säugern beschrieben (Yoshimura & Nezu, 1992; Fujita-Yoshigaki et al., 1998).

Welche am cAMP-Metabolismus der Zelle beteiligten Moleküle könnten in ihrer Aktivität im oben beschriebenen Szenario durch Ca<sup>2+</sup> moduliert werden?

Sowohl bei Säugetieren als auch bei *Drosophila* sind durch Ca<sup>2+</sup>-aktivierte Isoformen der Adeny-

latcyclase beschrieben (Yovell et al., 1992; Smit & Iyengar, 1998). Auch Ergebnisse von Berridge & Heslop (1980) unterstützen die Annahme einer  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiven Adenylatcyclase in Speicheldrüsen von Insekten. Diese Autoren fanden in der Speicheldrüse von *Calliphora*, daß während einer Hemmung der Phosphodiesterasen die intrazelluläre cAMP-Konzentration in Anwesenheit von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  stärker Anstieg als ohne extrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$ .

Postuliert man eine solche  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierte Isoform der Adenylatcyclase in den C-Zellen der Speicheldrüse von *P. americana*, so sollte die Adenylatcyclase bei gleichzeitiger Applikation von Forskolin & Ionomycin stärker aktiviert werden als allein durch Forskolin. Dadurch würde man eine höhere Rate der Proteinsekretion erwarten, wie sie auch in den Experimenten gefunden wird. Die maximale Rate der Proteinsekretion beträgt bei gleichzeitiger Applikation von Ionomycin & Forskolin ca. 41 % der durch 5-HT stimulierten, während sie bei Applikation von entweder Ionomycin oder Forskolin nur 18 % dieses Wertes betrug. Die nicht in ihrer Aktivität beeinflussten Phosphodiesterasen verhindern in diesem Experiment einen anhaltenden Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration, so daß die Proteinsekretion geringer ist als in dem Experiment, in dem die Phosphodiesterasen mit IBMX gehemmt wurden und gleichzeitig Ionomycin appliziert wurde. Bei Applikation von IBMX & Ionomycin kann man einen noch stärkeren Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration erwarten. Die Adenylatcyclase-Aktivität würde durch die erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration verstärkt werden und aufgrund der anhaltenden Hemmung der Phosphodiesterasen sollte die intrazelluläre cAMP-Konzentration kontinuierlich ansteigen. Diese Erwartung scheint sich durch folgende Beobachtung zu bestätigen: die maximale Rate der Proteinsekretion beträgt nach Applikation von IBMX & Ionomycin 77 % der Rate, die maximal durch 5-HT-Stimulierung erzielt wird. Es kommt also zu einer Potenzierung der maximalen Rate der Proteinsekretion.

In einem dritten Typ von Experiment habe ich durch simultane Applikation von Forskolin, IBMX & Ionomycin die Adenylatcyclase stimuliert, die Phosphodiesterasen gehemmt und die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration erhöht. Unter diesen Bedingungen beträgt die maximale Proteinsekretion 72% derjenigen, die durch 5-HT stimuliert wurde. Demnach ist die Proteinsekretion bei Applikation von IBMX, Forskolin & Ionomycin etwa 9 % stärker als ohne die gleichzeitige Applikation des  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophors Ionomycin. Nach simultaner Applikation von Forskolin & IBMX kann angenommen werden, daß bereits ohne die  $\text{Ca}^{2+}$ -Erhöhung eine effektive und schnelle Steigerung der intrazellulären cAMP-Konzentration erfolgt, so daß die zusätzliche Aktivierung der Adenylatcyclase durch die Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration nicht zu einer deutlichen Steigerung der maximalen Rate der Proteinsekretion führt.

Die cAMP-Konzentration in einer Zelle ergibt sich zu jedem Zeitpunkt aus der Adenylatcyclase-katalysierten cAMP-Bildung und dem Phosphodiesterase-katalysierten cAMP-Abbau (Fimia & Sassone-Corsi, 2001). Ein Teil der Ergebnisse könnte auch durch eine  $\text{Ca}^{2+}$ -gehemmte Phosphodiesterase erklärt werden. Nimmt man eine solche Isoform der Phosphodiesterase an, so würde bei Applikation von Forskolin & Ionomycin die intrazelluläre cAMP-Konzentration kontinuierlich ansteigen, und die gemessene Proteinsekretion sollte verstärkt werden. Dieses habe ich auch in den Experimenten gefunden. Dagegen könnte die Verstärkung der Proteinsekretion im Experiment mit IBMX & Ionomycin nur erklärt werden, wenn die erhöhte intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration die Hemmung der Phosphodiesterasen deutlich verstärken würde. Dagegen sprechen die Ergebnisse eines Experiments, in welchem ich gleichzeitig Forskolin & IBMX applizierte. In diesem Experiment wurden anscheinend auch ohne eine simultane Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration die Phosphodiesterasen durch IBMX effektiv gehemmt, so daß die gemessene maximale Rate der Proteinsekretion deutlich gegenüber der Applikation von Forskolin allein anstieg. Gegen eine  $\text{Ca}^{2+}$ -ge-

hemmte Phosphodiesterase als Erklärung für die durch  $\text{Ca}^{2+}$ -verstärkte Proteinsekretion spricht auch, daß bislang keine derartige Isoform der Phosphodiesterase beschrieben ist. Von den elf bekannten Phosphodiesterase-Familien ist nur die PDE I  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiv; sie wird allerdings durch  $\text{Ca}^{2+}$  aktiviert (Imai et al., 1999; Kakkar et al., 1999; Soderling & Beavo, 2000).

Die Frage, ob die C-Zellen eine  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierte Isoform der Adenylatcyclase haben oder eine  $\text{Ca}^{2+}$ -gehemmte Isoform der Phosphodiesterase, läßt sich nur in biochemischen Experimenten überprüfen. Leider würde der Nachweis entsprechender Enzymaktivitäten in Gewebehomogenaten keine Entscheidung darüber ermöglichen, wie hoch die Enzymaktivität in einem einzelnen Zelltyp ist.

#### **4.3.2.4.4 Proteinsekretion nach Erhöhung der intrazellulären cGMP-Konzentration, allein oder simultan mit der intrazellulären $\text{Ca}^{2+}$ - oder der cAMP-Konzentration**

Ein weiterer Botenstoff, welcher Exocytosen aktivieren kann, ist cGMP. Der Botenstoff cGMP wird durch membranständige oder lösliche Guanylatcyclasen gebildet. Die Aktivität der löslichen Guanylatcyclasen wird durch NO aktiviert, weshalb die Botenstoffe NO und cGMP zusammen wirken und häufig gemeinsam untersucht werden (z. B. Reviews von Davies, 2000; Yago et al., 2001). Zielproteine für cGMP sind z. B. Phosphodiesterasen, cyclisch Nucleotid-gesteuerte Ionenkanäle, eine Protein Kinase G oder die Adenylatcyclase (Imai et al., 1999; Kaupp & Seifert, 2002; Klein, 2002; Looms et al., 2003). Eine Beteiligung des NO- / cGMP-Signalwegs an der Regulierung der Exocytose wurde sowohl für Wirbeltiere als auch für Insekten nachgewiesen. Wildemann & Bicker zeigten 1999, daß nach Erhöhung der intrazellulären NO- und / oder cGMP-Konzentrationen Vesikel aus Synapsen der neuromuskulären Endplatte von *Drosophila* freigesetzt werden. In Wirbeltiersystemen wurde z. B. gezeigt, daß eine Erhöhung der intrazellulären NO- und / oder cGMP-Konzentration die Exocytoserate in Chromaffinzellen reduziert (Machado et al., 2000), die Insulinsekretion in Pankreas-beta-Zellen moduliert (Smukler et al., 2002) und an der Amylasesekretion in Parotisdrüsen beteiligt ist. In der Parotisdrüse von Mäusen zeigten Watson et al. (1985) eine Steigerung der Forskolin-stimulierten Amylasesekretion durch Erhöhung der intrazellulären cGMP-Konzentration. Bei allen Arbeiten, in denen NO-Donoren zur Erhöhung der NO-Konzentration verwendet werden, muß deutlich zwischen zwei Wirkungen unterschieden werden: einerseits der direkten Wirkung durch Erhöhung der intrazellulären NO- / cGMP-Konzentration sowie andererseits indirekten Wirkungen, welche durch eine Modulierung der Transmitterfreisetzung aus im Präparat befindlichen Nerven ausgelöst werden. In der Parotisdrüse von Mäusen z. B. unterscheiden sich die direkten und indirekten Wirkungen einer Erhöhung der NO-Konzentration erheblich voneinander (Yago et al., 2002; Tsunoda et al., 2003).

In der Speicheldrüse von *P. americana* habe ich durch Applikation des membrangängigen cGMP-Analogons db cGMP keine Proteinsekretion aktivieren können. In diesem Gewebe scheint cGMP also die Proteinsekretion nicht direkt oder indirekt, z. B. durch Verstärkung der Adenylatcyclase-Aktivität, auslösen zu können. Wiederum kann nicht durch direkte Messungen belegt werden, daß die Applikation von db cGMP die intrazelluläre cGMP-Konzentration auch effektiv erhöht. Indirekt wird dies jedoch in dem Experiment gezeigt, in welchem simultan Ionomycin & db cGMP appliziert wird. Allein die Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration durch Applikation von Ionomycin aktivierte in allen Versuchen eine Proteinsekretion. Dagegen wird bei simultaner Applikation von Ionomycin & db cGMP keine Proteinsekretion gemessen. Die Erhöhung der intrazellulären cGMP-

Konzentration scheint also die durch  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierte Proteinsekretion zu unterdrücken. Als Arbeitshypothese aus den bereits diskutierten Experimenten wurde ein Szenario entworfen, in dem  $\text{Ca}^{2+}$  die Proteinsekretion nur indirekt stimuliert, eventuell durch eine Aktivierung der Adenylatcyclase. Duhe et al. (1994) haben gefunden, daß NO, welches die cGMP-Bildung stimuliert, die aktivierende Wirkung von  $\text{Ca}^{2+}$  auf die Typ I Adenylatcyclase hemmen kann. Eine derartige Wirkung könnte die Unterdrückung der  $\text{Ca}^{2+}$ -stimulierten Proteinsekretion in Anwesenheit von cGMP erklären. An dieser Stelle muß angemerkt werden, daß sich diese Diskussion auf die Ergebnisse eines Experiments mit einem sehr geringen Stichprobenumfang ( $n=4$ ) bezieht.

Wie bereits in den Experimenten mit cAMP gezeigt wurde, reicht die Applikation eines cyclischen Nucleotids allein nicht unbedingt aus, um dessen intrazelluläre Konzentration wirksam zu erhöhen. Deshalb wird in einem weiteren Experiment während der Applikation von db cGMP die Aktivität der cAMP- und cGMP-abbauenden Phosphodiesterasen mit IBMX gehemmt. In diesem Experiment wird neben dem Anstieg der intrazellulären cGMP-Konzentration auch ein Anstieg der cAMP-Konzentration postuliert. Die gemessene maximale Rate der Proteinsekretion unterschied sich jedoch nicht von der, welche allein durch Applikation von IBMX aktiviert wird. Auch eine vermutlich stärkere Erhöhung der intrazellulären cGMP-Konzentration gegenüber der Applikation von nur db cGMP scheint demnach die Proteinsekretion nicht zu steigern. Die Adenylatcyclase-Isoform in den C-Zellen der Schabenspeicheldrüse wird demnach vermutlich nicht durch cGMP aktiviert. Dagegen kann ihre  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität möglicherweise durch cGMP gehemmt werden.

Neben der Wirkung auf die Proteinsekretion ist der NO- / cGMP-Signalweg auch an der Regulation der Flüssigkeitssekretion in Malpighischen Gefäßen von Insekten beteiligt. In den Malpighischen Gefäßen von *Drosophila* kommt es nach Stimulierung mit  $\text{CAP}_{2b}$  zu einer Steigerung der intrazellulären NO- und cGMP-Konzentration. Diese aktiviert die apikale V- $\text{H}^+$ -ATPase, wodurch ein Kationentransport über die Apikalmembran sowie die Flüssigkeitssekretion stimuliert werden (Dow et al., 1994; O'Donnell et al., 1996). Die Flüssigkeitssekretion in der Speicheldrüse von *P. americana* scheint ebenfalls durch NO beeinflusst zu werden. Von mir durchgeführte Vorversuche zeigen, daß sowohl die DA- als auch die 5-HT-stimulierte Speichelsekretion durch den NO-Donor SNP reversibel unterdrückt werden (s. Abb. A5 & A6 im Anhang). Mögliche Zielmoleküle, über welche diese Hemmung bewirkt werden könnte, sind die  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase oder der NKCC in den P-Zellen. Die  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase aktiviert den Flüssigkeitstransport durch den Transport von  $\text{Na}^+$  ins Lumen des Acinus, während der NKCC für den Aufwärtstransport von  $\text{Cl}^-$  (und eventuell auch für den  $\text{Na}^+$ -Transport) in die P-Zellen bedeutend ist. An verschiedenen Wirbeltiergeweben wurde eine Hemmung dieser beiden Moleküle durch NO und cGMP gezeigt (z. B. Ortiz et al., 2001; Ortiz & Garvin, 2002; He et al., 2003; Tipsmark & Madsen, 2003).

Es gibt keinen Hinweis auf eine Beteiligung von cGMP an der Proteinsekretion in Speicheldrüsen von *P. americana*. Ob die in der Schabenspeicheldrüse beobachtete Wirkung des SNP auf die Flüssigkeitssekretion wirklich durch NO vermittelt wird, läßt sich zur Zeit noch nicht sagen. Eine weitere Untersuchung der Beteiligung der bislang an der Speicheldrüse nicht untersuchten Botenstoffe NO und cGMP erscheint attraktiv.



#### 4.3.2.5 Wirkungen einer Erhöhung der Botenstoffe $Ca^{2+}$ , cAMP und / oder cGMP auf die 5-HT-stimulierte Proteinsekretion während der Kontrollstimulierung

In dieser Arbeit schließt sich an jede pharmakologische Erhöhung der  $Ca^{2+}$ -, cAMP- und / oder cGMP-Konzentration eine Kontrollstimulierung mit 5-HT an. Es soll getestet werden, ob die vorangegangene Erhöhung der intrazellulären Botenstoff-Konzentrationen die 5-HT-stimulierte Proteinsekretion quantitativ beeinflusst. Dafür wird die maximale 5-HT-stimulierte Proteinsekretion mit der eines Experiments verglichen, in welchem während der Teststimulierung nur DA appliziert wird.

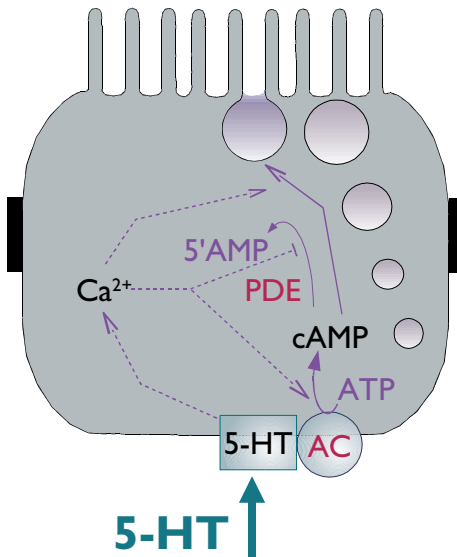
Durch welche Mechanismen könnte eine solche Beeinflussung ausgelöst werden?

Nach einer Erhöhung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration können, z. B. durch eine Protein Kinase C vermittelt, verschiedene Proteine phosphoryliert werden, welche an der Erregungs-Sekretions-Kopplung beteiligt sind. Beispiele hierfür sind Experimente, in denen eine Beeinflussung der Fusionsbereitschaft von Vesikeln oder der Anzahl fusionsbereiter Vesikel durch eine Protein Kinase C gezeigt wurde (Yang et al., 2002; Zhu et al., 2002). Ähnliche Wirkungen sind auch nach einer Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration gefunden worden: es kann sowohl die Anzahl fusionsbereiter Vesikel in der Parotisdrüse von Säugern, als auch ihre Empfindlichkeit für eine Erhöhung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration gesteigert werden (Yoshimura et al., 1998; Fujita-Yoshigaki, 2000). Das Zielprotein, über welches cAMP wirkt, ist meist eine Protein Kinase A, es können jedoch auch cyclisch Nucleotid-gesteuerte Kanäle oder GTP-Austauschproteine (EPAC) sein (Fimia & Sassone-Corsi, 2001). Diese Zielproteine wiederum können die Erregungs-Sekretions-Kopplung direkt oder indirekt beeinflussen (s.o.) und so z. B. die maximalen Raten der Proteinsekretion verstärken.

In der vorliegenden Arbeit habe ich jedoch in keinem Fall nach pharmakologischen Erhöhungen der intrazellulären Konzentrationen von  $Ca^{2+}$ , cAMP und / oder cGMP eine Verstärkung der 5-HT-stimulierten Proteinsekretion gemessen, im Vergleich mit der Proteinsekretion nach einer Teststimulierung mit DA. Allerdings fällt auf, daß in allen Experimenten, in denen während der Teststimulierung nur die intrazelluläre cAMP-Konzentration gesteigert wird, die anschließend durch 5-HT stimulierte Proteinsekretion stärker ist als in den anderen Experimenten (s. Abb. 34). Diese Unterschiede sind jedoch statistisch nicht signifikant.

Außerdem wird die maximale Rate der Proteinsekretion nach pharmakologischer Erhöhung der  $Ca^{2+}$ -, cAMP und / oder cGMP-Konzentrationen mit derjenigen verglichen, die nach einer Teststimulierung mit 5-HT gemessen wird. Nachdem bereits während der Teststimulierung 5-HT appliziert wird, ist die Proteinsekretion während der Phase der Kontrollstimulierung nur sehr gering. Imitiert wird diese geringe Proteinsekretion während der Kontrollstimulierung nur durch die simultane Applikation von Forskolin, IBMX & Ionomycin. Nur diese Stimulierung imitiert die 5-HT-stimulierte Proteinsekretion in allen betrachteten Aspekten (qualitativ sowie quantitativ während der Phasen der Test- und Kontrollstimulierung). Diese Beobachtung unterstreicht die Annahme, daß die Proteinsekretion nach Stimulierung mit 5-HT durch eine Erhöhung von  $Ca^{2+}$  und cAMP vermittelt wird.

Als Arbeitshypothese für weitere Experimente bietet sich aufgrund der diskutierten Ergebnisse das folgende Szenario an, welches in Abb. 38 illustriert ist: 5-HT führt zu einer Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration, welche die Proteinsekretion direkt aktiviert. Eine gleichzeitige Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration verstärkt die cAMP-induzierte Proteinsekretion. Mögliches Zielprotein für die modulierende Wirkung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration könnte eine  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierbare Adenylatcyclase sein.



**Abb. 38: Arbeitshypothese, welche die Signalwege darstellt, die nach einer 5-HT-Stimulierung in den C-Zellen aktiviert werden.** Der in den C-Zellen exprimierte 5-HT-Rezeptor stimuliert vermutlich eine Adenylatcyclase, so daß nach 5-HT-Stimulierung der C-Zellen die intrazelluläre cAMP-Konzentration ansteigt. Außerdem steigt vermutlich die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration an. Eventuell wird die Adenylatcyclase durch diesen Anstieg der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zusätzlich aktiviert, weshalb die Proteinsekretion bei gleichzeitiger Erhöhung beider Botenstoffe stärker ist, als nach alleiniger Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ - oder der cAMP-Konzentration.

#### 4.3.3 Welche Signalwege vermitteln die Effekte von $\text{Ca}^{2+}$ und cAMP auf die Proteinsekretion?

Da die Proteinsekretion in der Speicheldrüse von *P. americana* nur bei gleichzeitiger Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ - und cAMP-Konzentration sowohl qualitativ als auch quantitativ der durch 5-HT stimulierten Proteinsekretion entspricht, geht meine Arbeitshypothese (Abb. 38) davon aus, daß 5-HT in den C-Zellen die Konzentration beider Botenstoffe erhöht.

cAMP wird von membranständigen Adenylatcyclasen gebildet, deren Aktivität durch G-Proteine reguliert sowie durch die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und Protein Kinase C-abhängige Phosphorylierung moduliert werden kann (Cooper et al., 1995; Iourgenko & Levin, 2000). Zielmoleküle von cAMP sind in der Regel die Protein Kinase A sowie cyclisch Nucleotid-gesteuerte Ionenkanäle und GTP-Austauschproteine (Fimia & Sassone-Corsi, 2001).

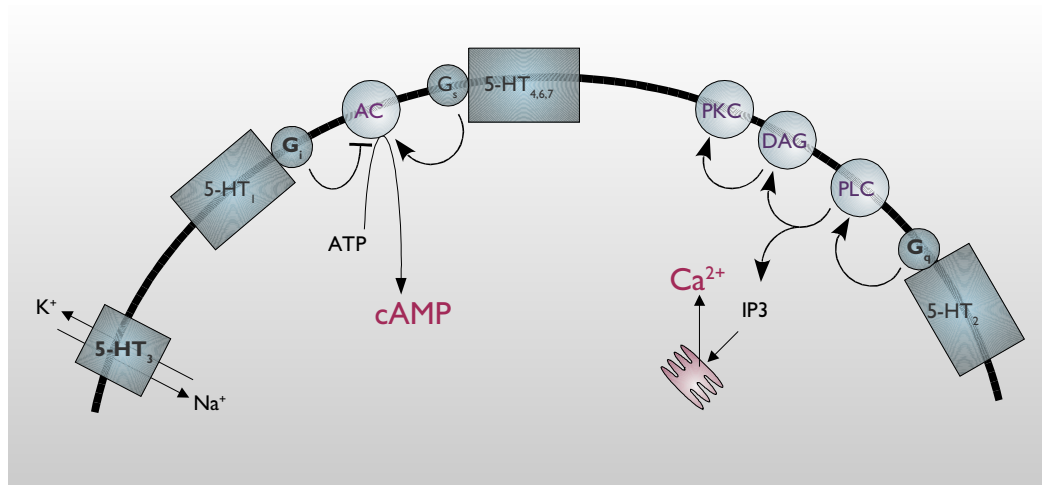
Es sind verschiedene Familien von 5-HT-Rezeptoren beschrieben, von denen eine Familie nach ihrer Aktivierung einen Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration auslöst (s. Abb. 39). 5-HT-Rezeptoren aus dieser Rezeptorfamilie wurden sowohl bei Wirbeltieren (Reviews z. B. in Saudou & Hen, 1994; Gerhardt & Van Heerikhuizen, 1997) als auch bei Insekten und anderen Wirbellosen (Reviews z. B. in Blenau & Baumann, 2001 und Tierney, 2001) beschrieben.

In der Speicheldrüse von *Calliphora* werden zwei verschiedene 5-HT-Rezeptoren exprimiert (Berridge & Heslop, 1981), von denen einer einen Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und der andere einen Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration auslöst. Ob der postulierte Anstieg der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in den Acinuszellen der Schabenspeicheldrüse ebenfalls durch einen eigenen 5-HT-Rezeptor aktiviert wird, ist unbekannt. Ebenso wissen wir nicht, über welches Zielmolekül die Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wirkt. Es kann sich z.B. um eine Beeinflussung der Phosphoinositidkaskade, um die Protein Kinase C oder um Calmodulin handeln

(Hancock, 1997). Folgende Argumente sprechen dafür, daß möglicherweise eine Protein Kinase C an der Proteinsekretion beteiligt ist: (1) die beschriebenen 5-HT-Rezeptoren, welche die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration erhöhen, wirken über  $\text{IP}_3$  und eine Protein Kinase C (Blenau & Baumann, 2001), (2) die Aktivität der Adenylatcyclase kann durch eine Protein Kinase C moduliert werden (Cooper et al., 1995; Selbie & Hill 1998), und (3) wurde für eine Protein Kinase C gezeigt, daß sie die  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität der Gruppe fusionsbereiter Vesikel erhöht (Zhu et al., 2002) oder diese Gruppe vergrößern kann (Yang et al., 2002). Deshalb wird in dieser Arbeit versucht, die Bedeutung einer Protein Kinase C als Zielmolekül einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Erhöhung zu untersuchen.

Außerdem soll die Beteiligung der Adenylatcyclase an der 5-HT-stimulierten Proteinsekretion abgesichert werden. Für diese Experimente werden beide Enzyme in den Schabenspeicheldrüse pharmakologisch gehemmt und die 5-HT-stimulierte Proteinsekretion in Anwesenheit und Abwesenheit der Hemmstoffe miteinander verglichen.

Da weder die 5-HT-stimulierte Proteinsekretion, noch die DA- oder 5-HT-stimulierte Flüssigkeitssekretion durch die in meiner Arbeit getesteten Hemmstoffe der Protein Kinase C beeinflusst werden, ist diese vermutlich an der Aktivierung beider Sekretionsprozesse nicht direkt beteiligt. Die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen demnach gegen eine Protein Kinase C-modulierte Adenylatcyclase sowie gegen einen über  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{IP}_3$ -PKC wirkenden 5-HT-Rezeptor in der Schabenspeicheldrüse.



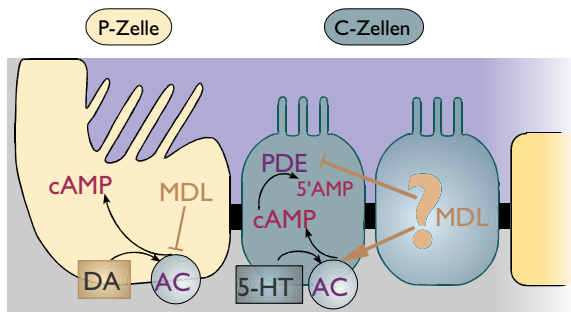
**Abb. 39: Schema der durch 5-HT-Rezeptoren aktivierten Signalwege.** Die Rezeptoren sind nach der Klassifizierung für Wirbeltiere benannt. Die entsprechende Klassifizierung für Insekten befindet sich z.B. in Blenau & Baumann, 2001. Rezeptoren aus der 5-HT<sub>1</sub>-Familie hemmen die Adenylatcyclase und verringern somit die intrazelluläre cAMP-Konzentration, wohingegen Rezeptoren aus Familien 5-HT<sub>4/6/7</sub> die cAMP Bildung durch die Adenylatcyclase verstärken. Rezeptoren aus der 5-HT<sub>2</sub>-Familie erhöhen die intrazelluläre Konzentration von  $\text{IP}_3$  und aktivieren eine Protein Kinase C, wirken also über einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalweg. Rezeptoren mit entsprechenden Wirkungen auf cAMP und  $\text{Ca}^{2+}$  sind auch für Insekten beschrieben. Die oben beschriebenen Rezeptoren gehören alle zu den G-Protein gekoppelten Rezeptoren. Innerhalb der 5-HT-Rezeptoren sind die einzige Ausnahme davon die Mitglieder der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorfamilie, bei denen es sich um ligandengesteuerte Ionenkanäle handelt. Mitglieder dieser Familie sind für Insekten bislang nicht beschrieben. Abbildung nach Saudou & Hen (1994).

Allerdings setzt diese Aussage die pharmakologische Wirksamkeit der verwendeten Hemmstoffe voraus. In DUM-Neuronen von *P. americana* zeigte Wicher (2001) die Wirksamkeit von Chelerythrin sowie von Hemmstoffen aus der Familie der Bisindolylmaleimide. In Speicheldrüsen wurde diese Wirksamkeit bislang nicht gezeigt. Deshalb kann nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden, daß die Protein Kinase C doch an der Steuerung der Sekretionsprozesse beteiligt ist.

Die Adenylatcyclase kann durch MDL 12,330 A gehemmt werden. Dieser Adenylatcyclase-Hemmstoff reduziert in der Speicheldrüse von *Calliphora* effektiv den 5-HT-stimulierten Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration sowie die Flüssigkeitssekretion (Heslop & Berridge, 1980). Gray et al. (1984) zeigten an den Speicheldrüsen der Schabe *N. cinerea*, daß die Flüssigkeitssekretion nach DA-Stimulierung oder Erhöhung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration durch MDL 12,330 A reduziert wird, die Substanz aber keine Wirkung auf die elektrischen Antworten der Acinuszellen nach DA- oder elektrischer Stimulierung hat. Bezüglich der Wirkung auf die DA-stimulierte Flüssigkeitssekretion konnte ich die Befunde von Gray et al. (1984) bestätigen. Im Gegensatz zur DA-stimulierten Flüssigkeitssekretion wird die 5-HT-stimulierte anscheinend nicht beeinflusst, wobei dieser Befund noch durch einen kürzeren Versuch in Abwesenheit von DA bestätigt werden sollte. Da die Aktivierung der Adenylatcyclase in der Schabenspeicheldrüse eine Proteinsekretion auslöst, sollte ihre Hemmung die Proteinsekretion reduzieren. Überraschenderweise wurde die 5-HT-stimulierte Proteinsekretion jedoch in Anwesenheit von MDL 12,330 A verstärkt.

Wie können diese anscheinend widersprüchlichen Wirkungen des verwendeten Adenylatcyclase-Hemmstoffs erklärt werden?

Eine mögliche Erklärung wäre, daß in den P- und C-Zellen unterschiedliche Isoformen der Adenylatcyclase exprimiert werden, die unterschiedlich sensitiv für den verwendeten Hemmstoff sind. Ferretti et al. (1996) haben gezeigt, daß es in der Schnecke *Planorbarius corneus* sowohl eine Isoform der Adenylatcyclase gibt, welche durch MDL 12,330 A gehemmt wird, als auch eine Isoform, welche durch MDL 12,330 A aktiviert wird. Neben der Adenylatcyclase können durch MDL 12,330 A auch Phosphodiesterasen gehemmt werden, wie von Biondi et al. (1990) in segmentalen Ganglien von *Hirudo medicinalis* sowie von Hunt & Evans (1980) an verschiedenen Wirbeltiergeweben gezeigt wurde.



**Abb. 40: Hypothese zur Wirkung des Adenylatcyclase-Hemmstoffs MDL 12,330 A auf die cAMP-Bildung in den Acinuszellen.** In den P-Zellen hemmt die Substanz die Adenylatcyclase (AC). Aufgrund der verringerten cAMP-Bildung ist die Rate der Flüssigkeitssekretion reduziert. Dagegen bewirkt die Substanz in den C-Zellen anscheinend eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration, da die Proteinsekretion in Anwesenheit von MDL 12,330A verstärkt wird. Dies ist auf zwei Wegen möglich: die Substanz könnte die Adenylatcyclase der C-Zellen stimulieren und / oder die Aktivität der Phosphodiesterasen (PDE) hemmen.

Die schematisch in Abb. 40 dargestellte Hypothese könnte die Wirkungen von MDL 12,330A in der Schabenspeicheldrüse erklären: (1) In den P-Zellen ist eine DA-stimulierte Adenylatcyclase an der Aktivierung der Flüssigkeitssekretion beteiligt. Diese Adenylatcyclase wird durch MDL 12,330A gehemmt, so daß die DA-stimulierte Flüssigkeitssekretion in Anwesenheit des Hemmstoffs reduziert ist. (2) In den C-Zellen ist eine 5-HT-stimulierte Adenylatcyclase exprimiert, deren Aktivität nicht durch MDL 12,330 A gehemmt wird. Die Aktivierung dieser Adenylatcyclase stimuliert die Proteinsekretion. Auf zwei Wegen könnte MDL 12,330A die cAMP-Bildung in den C-Zellen verstärken: entweder ist die exprimierte Isoform der Adenylatcyclase in den C-Zellen durch MDL 12,330 A aktivierbar (Ferretti et al., 1996), oder die Aktivität der Phosphodiesterasen in den C-Zellen wird durch MDL 12,330A effektiv gehemmt (Biondi et al., 1990).

#### 4.4 Gesamtbild: An der Flüssigkeits- und Proteinsekretion beteiligte Signalwege

An dieser Stelle sollen die aus der Literatur bekannten Daten zur Erregungs-Sekretions-Kopplung in der Schabenspeicheldrüse und die Ergebnisse dieser Arbeit zusammengefaßt werden. Zur Illustration dieser Prozesse dient Abb. 41.

In der Schabenspeicheldrüse gibt es drei transportaktive aktive Zelltypen: die P- und C-Zellen der Acini und die Ausführungszellen. Die Flüssigkeitssekretion wird durch DA und 5-HT stimuliert (z. B. House, 1973; Whitehead, 1973; Ginsborg et al., 1976; Just & Walz, 1996). Beide Neurotransmitter unterscheiden sich in zwei wichtigen Punkten: (1) sie stimulieren unterschiedliche Zellen und (2) sie aktivieren die Bildung eines proteinfreien bzw. eines proteinhaltigen Speichels.

**Abb. 41 (folgendes Blatt): Schematische Darstellung der bekannten und postulierten Signalwege, die an der Erregungs-Sekretions-Kopplung in der Speicheldrüse von *P. americana* beteiligt sind.** In schwarz sind die Transporter, Ionenkanäle und Botenstoffe dargestellt, deren Existenz durch Versuchsergebnisse meiner oder vorangegangener Arbeiten direkt oder indirekt gezeigt wurde. In blau sind Transporter oder Ionenkanäle dargestellt, deren Existenz postuliert wurde, aber für die es noch keine näheren Hinweise gibt. Gestrichelte Linien geben mögliche Wirkungen der Botenstoffe an. Das abgebildete Modell der Erregungs-Sekretions-Kopplung wird im Text erläutert.

##### 4.4.1 Dopaminerge Innervierung

Die Innervierung der Speicheldrüse von *P. americana* wurde kürzlich von Baumann et al. (2002) intensiv untersucht. Die dopaminerge Innervierung geht vom SNI-Neuron des Suboesophagalganglions aus, von dem aus ein dickes Axon im Speichelgangnerv zur Speicheldrüse zieht. Dieses Muster der dopaminergen Innervierung entspricht dem der ebenfalls acinösen Speicheldrüsen von Heuschrecken (Ali, 1997). Die dopaminergen Fasern bilden an der Oberfläche der Acini der Schabenspeicheldrüse ein lockeres Netz. Freisetzungsstellen für DA werden sowohl zwischen den Acini als auch in der Nähe der P-Zellen gefunden. Auf der Oberfläche der Ausführungsgänge befindet sich ebenfalls ein Netz dopaminerg Fasern, im Unterschied zu den Acini ziehen hier jedoch Ausläufer tief zwischen die einzelnen Epithelzellen. Nicht alle Ausführungszellen stehen in direktem Kontakt mit den dopaminergen Fasern (Baumann et al., 2002). Eine Weiterleitung der Erregung kann über Zell-Zellkontakte zwischen den Ausführungszellen erfolgen, über welche sich nach einer DA-Stimulierung auch  $Ca^{2+}$ -Wellen ausbreiten (Lang & Walz, 1999a).

##### 4.4.2 DA-stimulierte Flüssigkeitssekretion: Prozesse in den P-Zellen

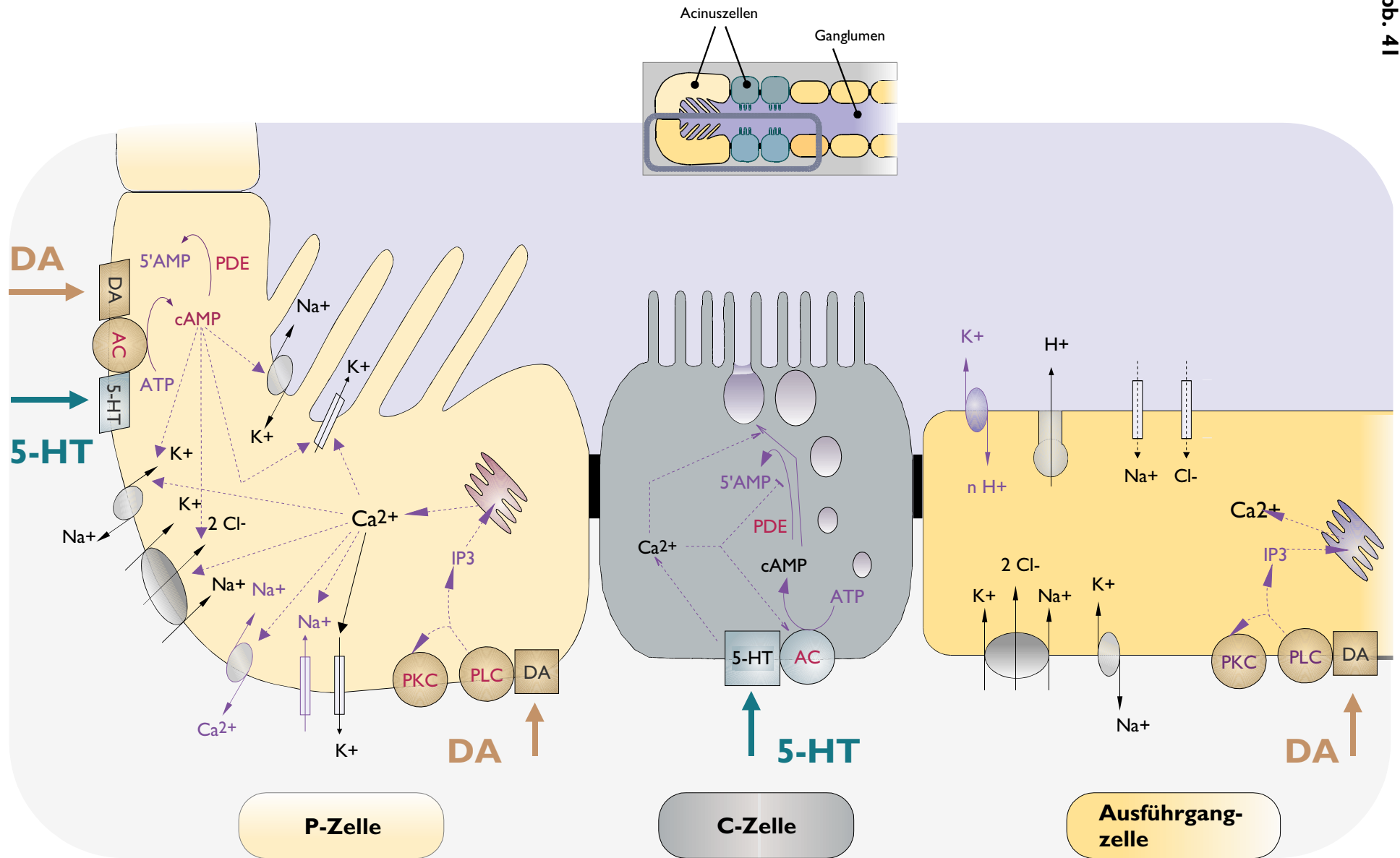
Nach einer DA-Stimulierung kommt es zur Hyperpolarisation der basolateralen Membran der P-Zellen. Das Ruhe-Membranpotential liegt zwischen - 40 bis - 55 mV. Die Hyperpolarisation verläuft transient mit einem minimalen Wert von ca. - 100 mV (z. B. House 1973; Ginsborg et al., 1974; Ginsborg & House 1976; Mitchell & Martin, 1980; House & Ginsborg, 1985). Sie wird durch die Öffnung von basolateralen  $Ca^{2+}$ -gesteuerten  $K^{+}$ -Kanälen ausgelöst (Ginsborg et al., 1974). Da-

für spricht auch der Umstand, daß die elektrische Antwort mit einer Verzögerung von ca. 500 ms nach der elektrischen Stimulierung des Speichelangnervs erfolgt und ihre Stärke temperaturabhängig ist (Blackmann et al., 1979a,b).

Für die Aktivierung der Flüssigkeitssekretion ist die Anwesenheit von  $\text{Na}^+$  im Ringer essentiell. Die zur Aktivierung der Flüssigkeitssekretion ablaufenden Prozesse können nicht alternativ mit  $\text{K}^+$  oder  $\text{Na}^+$  betrieben werden, wie dies in der Speicheldrüse von *Calliphora* der Fall ist (Berridge et al., 1976). In der Schabenspeicheldrüse beruht die Aktivierung der Flüssigkeitssekretion vermutlich auf einem Anstieg der intrazellulären  $\text{Na}^+$ -Konzentration. Dieser aktiviert eine bereits von Smith & House (1979) sowie Gupta & Hall (1983) postulierte und 1994b von Just & Walz immunocytochemisch nachgewiesene  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase in der Apikalmembran der P-Zellen, welche  $\text{Na}^+$  in das Lumen des Acinus transportiert. Der dafür nötige basale  $\text{Na}^+$ -Einstrom kann über die folgenden Wege stattfinden: (1) über einen NKCC, dessen Existenz in der Basolateralmembran in der vorliegenden Arbeit indirekt gezeigt wurde (Rietdorf et al., 2003); (2) über eine Erhöhung der  $\text{Na}^+$ -Leitfähigkeit der Basolateralmembran, wie sie von mehreren Autoren postuliert wurde (z. B. Smith & House, 1979; Gray & House, 1982; Gupta & Hall, 1983) oder (3) über einen  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher in der Basolateralmembran, dessen Existenz ebenfalls von mehreren Autoren postuliert wurde (z. B. Smith & House, 1979; Gray & House, 1982; Gupta & Hall, 1983). Da der Primärspeichel im Acinulumen auch  $\text{K}^+$  enthält (s. Abb. 36), muß durch die DA-Stimulierung auch eine  $\text{K}^+$ -Leitfähigkeit in der Apikalmembran aktiviert werden. Der  $\text{K}^+$ -Einstrom kann ebenfalls durch den NKCC erfolgen. Anscheinend ist auch eine basolateral lokalisierte  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase an der Aufrechterhaltung einer ausreichenden  $\text{K}^+$ -Konzentration in den P-Zellen beteiligt, wie ich ebenfalls indirekt gezeigt habe. Dem derartig aufgebauten  $\text{Na}^+$ -Gradienten sollen  $\text{Cl}^-$  und  $\text{H}_2\text{O}$  trans- oder parazellulär folgen (z. B. Smith & House, 1979, Gupta & Hall, 1983).

Welche Botenstoffe sind an der Aktivierung dieser Prozesse beteiligt?

Von den drei Prozessen, welche die Erhöhung der intrazellulären  $\text{Na}^+$ -Konzentration vermitteln können, ist nur der  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher direkt  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit habe ich keine Hinweise auf einen meßbaren globalen Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in den P-Zellen während einer DA-Stimulierung gefunden. Mitchell & Martin (1980) haben bei Applikation des  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophors A 23187 eine Hyperpolarisation des basolateralen Membranpotentials an der Speicheldrüse der Schabe *N. cinerea* gemessen, ähnlich wie nach einer DA-Stimulierung. Da diese Hyperpolarisation durch die Öffnung  $\text{Ca}^{2+}$ -gesteuerter  $\text{K}^+$ -Kanäle verursacht wird, muß es zumindest lokal zu einer Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration kommen. Dieser Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration könnte über die Phosphoinositidkaskade vermittelt werden, da Evans et al. (1991) einen DA-stimulierten Anstieg der  $\text{IP}_3$ -Konzentration in der Speicheldrüse der Schabe *N. cinerea* zeigten. Diese Messungen am Gewebehomogenat durchgeführt, deshalb kann nicht zugeordnet werden in welchem Zelltyp dieser Anstieg der  $\text{IP}_3$ -Konzentration stattfand. Die Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wirkt jedoch nicht nur auf das Membranpotential. Sie aktiviert auch eine Flüssigkeitssekretion, welche der DA-stimulierten entspricht, wie Gray et al. (1984) ebenfalls durch Applikation von A 23187 an der Speicheldrüse







von *N. cinerea* zeigten. Allerdings war für die Stimulierung der Flüssigkeitssekretion die Aktivität einer Adenylatcyclase essentiell, was eine Beteiligung von cAMP an der Aktivierung der Flüssigkeitssekretion nahelegt.

Die Ergebnisse der Experimente, welche die Bedeutung von cAMP für die Aktivierung der Flüssigkeitssekretion in der Speicheldrüse von *N. cinerea* klären sollten, sind jedoch sehr widersprüchlich: House & Ginsborg (1982) konnten durch Stimulierung mit bis zu 1 mM cAMP keine Flüssigkeitssekretion auslösen. In der Untersuchung von Gray et al. (1984) konnte eine Flüssigkeitssekretion nur aktiviert werden, wenn das Na<sup>+</sup>-Salz von cAMP zum Ansetzen der Lösungen benutzt wurde, nicht jedoch, wenn dazu die freie Säure von cAMP verwendet wurde. Wie diese Befunde zu erklären sind, bleibt unklar. Doch auch wenn die Wirkungen nach einer direkten Applikation von cAMP nicht eindeutig sind, unterstützen andere Experimente der Arbeit von Gray et al. (1984) die Annahme, daß die Flüssigkeitssekretion direkt durch cAMP aktiviert wird: durch Hemmung der Phosphodiesterasen konnte eine Flüssigkeitssekretion stimuliert werden, wohingegen die DA-stimulierte Flüssigkeitssekretion durch Hemmung der Adenylatcyclase verringert wurde. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte nach Applikation von 10 mM cAMP keine oder nur eine sehr geringe Flüssigkeitssekretion aktiviert werden. Im Gegensatz zu den widersprüchlichen Wirkungen auf die Flüssigkeitssekretion gibt es keinen Zweifel daran, daß eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration das Potential der Basolateralmembran nicht beeinflußt (Gray et al. 1984).

Als Konsequenz der Experimente von Gray et al. (1984) sowie weiterer pharmakologischer Untersuchungen von Evans & Green (1990, 1991) wurde die Expression zweier verschiedener DA-Rezeptoren in den Acinuszellen gefordert, von denen einer über eine Erhöhung der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration die elektrische Antwort der Zellen vermittelt, der andere durch Erhöhung der cAMP-Konzentration die Flüssigkeitssekretion aktiviert.

#### **4.4.3 DA-stimulierte Flüssigkeitssekretion: Prozesse in den Ausführungszellen**

Im Gegensatz zu den Acinuszellen wird nach Applikation von DA in den Ausführungszellen eine Depolarisation des basolateralen Membranpotentials vom Ruhewert  $-67 \pm 1$  mV auf  $-41 \pm 2$  mV gemessen, und es kommt zu einem deutlichen Anstieg der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration (Lang & Walz, 1999a). Außerdem kommt es zu dramatischen Änderungen der Na<sup>+</sup>- und K<sup>+</sup>-Konzentrationen (Lang & Walz, 2001). Die Aktivität der basolateralen Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase, welche von Just & Walz (1994b) immunocytochemisch nachgewiesen wurde, ist für die Änderung der Ionenkonzentrationen ohne Bedeutung. Dagegen ist sie für die Rückkehr der Ionenkonzentrationen auf den Ruhewert wichtig: In Anwesenheit des Hemmstoffs Ouabain sind die Na<sup>+</sup>- und K<sup>+</sup>-Änderungen irreversibel (Lang & Walz, 2001). Außerdem habe ich gezeigt, daß die Aktivität der Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase für die Modifikation des DA-stimulierten Speichels wichtig ist: während einer Hemmung dieser Ionenpumpe können netto keine Ionen aus dem Primärspeichel reabsorbiert werden, so daß der Endspeichel isoosmotisch zum verwendeten Ringer ist.

Messungen der luminalen Änderungen der Na<sup>+</sup>- und K<sup>+</sup>-Konzentrationen während einer DA-Stimulierung, die in einer relativ acinusnahen Region stattfanden, ergaben kein eindeutiges Bild der Ionenbewegungen über die Apikalmembran der Ausführungszellen. Aufgrund der berechneten Triebkräfte für die einzelnen Ionen wird eine Na<sup>+</sup>-Resorption und eventuell eine K<sup>+</sup>-Sekretion angenommen (Lang & Walz, 2001). Die K<sup>+</sup>-Sekretion könnte an die Aktivität der von Just & Walz (1994b) nachgewiesenen V-H<sup>+</sup>-ATPase gekoppelt sein. Die Aussagen über physiologische Vorgänge während einer DA-Stimulierung werden dadurch erschwert, daß Just & Walz (1994c) eine Carboanhydraseaktivität in den Ausführungszellen nachgewiesen haben, der verwendete Ringer jedoch in kei-

ner Arbeit eine definierte  $\text{HCO}_3^-$ -Konzentration enthielt.

Es wird angenommen, daß die Ausführungszellen den Primärspeichel modifizieren, während er durch die Ausführungsgänge fließt. Unerwarteterweise ist diese Modifikation stärker, wenn die Ausführungszellen nicht stimuliert werden (Gupta & Hall, 1983). Dieser Befund wird auch durch einige Ergebnisse meiner Arbeit unterstrichen: Proben, die Speichel enthielten, der zwischen zwei DA-Stimulierungsperioden in den Ausführungsgängen stand, enthielten eine geringere  $\text{Na}^+$ - und  $\text{Cl}^-$ -Konzentration als solche, die durch die DA-stimulierten Ausführungsgänge flossen. Ein weiterer Hinweis auf die Transportaktivität der unstimulierten Ausführungszellen habe ich bei den Messungen der Autofluoreszenz gefunden. Dort kommt es nach einer DA-Stimulierung in den unstimulierten Ausführungszellen zu einer geringfügigen Steigerung der Stoffwechselaktivität.

Die Frage, ob und in welche Richtung die Ausführungszellen Wasser transportieren, konnte bislang noch nicht geklärt werden. Ein netto-Wassertransport ins Lumen hinein ist unwahrscheinlich. Über die Länge des Ausführungsgangs verändern die Zellen ihre Struktur (Gupta & Hall, 1983), eventuell unterscheidet sich auch die Funktion der Zellen in den verschiedenen Bereichen. Die Funktion der Ausführungsgänge ist deutlich komplexer als zunächst angenommen und noch nicht vollständig aufgeklärt.

#### **4.4.4. Serotonerge Innervierung der Speicheldrüse von *P. americana***

Das Muster der serotonergen Innervierung unterscheidet sich deutlich von dem der dopaminergen Innervierung: (1) Es gibt nicht nur ein Axon, welches die einzige Quelle der serotonergen Fasern ist. Die serotonerge Innervierung geht einerseits vom Suboesophagalganglion aus, von dem aus zahlreiche feine Fasern in den Speichelgangsnerv ziehen; andererseits ist auch das stomatogastrische Nervensystem eine Quelle serotonerger Fasern. Im Unterschied dazu erfolgt die serotonerge Innervierung der acinösen Speicheldrüse von Heuschrecken über das dicke Axon des SN2, welches im Speichelgangsnerv verläuft (Ali, 1997). (2) Auf den Acini befindet sich ein dichtes Netz serotonerger Fasern, dessen Ausläufer tief zwischen die einzelnen Zellen ziehen und Kontakt zu den P- und C-Zellen haben. (3) Nur die an die Acini grenzenden Bereiche der Ausführungsgänge haben auch eine serotonerge Innervierung, der Großteil der Ausführungsgänge ist rein dopaminerg innerviert.

#### **4.4.5. 5-HT-stimulierte Flüssigkeits- und Proteinsekretion**

Obwohl 5-HT der erste Agonist war, mit dem eine Flüssigkeitssekretion in der Schabenspeicheldrüse aktiviert werden konnte (Whitehead, 1973 an *P. americana* und House, 1973 an *N. cinerea*), wurde diese Substanz nicht als physiologischer Transmitter erkannt und ihre Wirkungen wurden während der intensiven Forschung an der Schabenspeicheldrüse in den 70er und 80er Jahren kaum untersucht. Damals wurde DA als physiologischer Transmitter identifiziert (Ginsborg et al., 1976), dessen Wirkungen charakterisiert und mit der einer elektrischen Stimulierung der Drüsen verglichen (zusammengefaßt in House, 1980). Nur in wenigen Arbeiten wurden die Wirkungen der Applikation von 5-HT untersucht. 5-HT aktivierte in den Acinuszellen eine geringere Hyperpolarisation des basolateralen Membranpotentials als die gleiche DA-Konzentration. Auch die 5-HT-stimulierte Flüssigkeitssekretion war niedriger als die DA-stimulierte (Bowser-Riley & House, 1976; Bowser-Riley et al., 1978; House & Smith, 1978). Es wurde angenommen, daß es von DA-Rezepto-

ren unabhängige 5-HT-Rezeptoren geben müßte (House & Smith, 1978), was jedoch nicht weiter untersucht wurde.

Bereits 1971 postulierten Bland & House, daß die Sekretion von Proteinen ausschließlich durch die C-Zellen stattfindet. Erst 1996 wurde von Just & Walz festgestellt, daß die Proteinsekretion durch 5-HT aktiviert wird. In der vorliegenden Arbeit wird eine Beteiligung der Botenstoffe  $Ca^{2+}$  und cAMP an der Aktivierung der Proteinsekretion gezeigt. Vermutlich stimuliert cAMP die Proteinsekretion direkt, während  $Ca^{2+}$  modulatorisch wirkt und die Proteinsekretion verstärkt. Von daher ist es wahrscheinlich, daß in den C-Zellen ein 5-HT-Rezeptor exprimiert wird, welcher die Adenylatcyclase aktiviert (z. B. ein 5-HT<sub>4/6/7</sub> Rezeptor). Die postulierte Erhöhung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Erhöhung in den C-Zellen konnte aus methodischen Gründen nicht direkt mikrofluorometrisch gemessen werden. Ob sie durch einen separaten 5-HT-Rezeptor vermittelt wird, wie es in der Speicheldrüse von *Calliphora* der Fall ist (Berridge & Heslop, 1981), ist deshalb unbekannt.

Die Aktivität der Ausführungszellen wird, zumindest in den bislang untersuchten Regionen, durch Applikation von 5-HT nicht beeinflusst. Trotzdem scheinen auch die unstimulierten Ausführungszellen den Primärspeichel zu modifizieren. Da angenommen wird, daß in den P-Zellen während einer 5-HT-Stimulierung die gleichen Transportprozesse aktiviert werden wie durch eine DA-Stimulierung, wird der gebildete Primärspeichel ebenfalls isoosmotisch sein. Während der Passage der Ausführungsgänge müssen Ionen reabsorbiert werden, da der sezernierte Endspeichel hypoosmotisch ist und sich in seiner Zusammensetzung nicht von dem DA-stimulierten unterscheidet, wie ich in dieser Arbeit gezeigt habe.

#### **4.4.6. Können noch weitere Botenstoffe an der Erregungs-Sekretions-Kopplung in der Schabenspeicheldrüse beteiligt sein?**

Vorversuche mit NO-Donoren an der Schabenspeicheldrüse haben auf eine Beteiligung von NO an der Flüssigkeitssekretion hingewiesen: Applikation von NO-Donoren bewirkte eine reversible Hemmung der DA- und 5-HT-stimulierten Flüssigkeitssekretion. Diese Wirkung kann eventuell auf eine Hemmung der Adenylatcyclase durch NO zurückgeführt werden, wie sie Watson et al. (2001) in Acinuszellen der Speicheldrüsen von Mäusen zeigten. Nach Applikation von cGMP wurde die Flüssigkeitssekretion in der Schabenspeicheldrüse ebenfalls beeinflusst, allerdings leicht gesteigert. Die Stichprobengrößen der mit cGMP / NO durchgeführten Versuche sind allerdings noch zu gering (jeweils n=4 - 6), um endgültige Aussagen der bislang widersprüchlichen Wirkungen von cGMP auf die Flüssigkeitssekretion zu machen.

Neben den biogenen Aminen gibt es jedoch noch andere Stoffklassen, die in sekretorisch aktiven Insektengeweben die Flüssigkeitssekretion beeinflussen. Dazu zählen z. B. verschiedene Peptide, welche Flüssigkeitssekretion z. B. in Speicheldrüsen von *Calliphora* entweder aktivieren oder modulieren können (Duve et al., 1992). In Malpighischen Gefäßen von *Rhodnius*, *Locusta* und *Drosophila* sind neben biogenen Aminen wie 5-HT auch Peptide wie z. B. CAP<sub>2b</sub> als Agonisten bekannt, welche die Flüssigkeitssekretion aktivieren (Morgan & Mordue, 1984; O'Donnell & Maddrell, 1984; Dow et al., 1994; O'Donnell et al., 1996). Weiterhin wurde beschrieben, daß z. B. die Aminosäuren Glutamin und Methionin die Flüssigkeitssekretion in den Malpighischen Gefäßen von *Drosophila* verstärken können (Hazel et al., 2003).

Eine Beteiligung von Peptiden oder Aminosäuren an der Erregungs-Sekretions-Kopplung in der Schabenspeicheldrüse wurde bislang nicht untersucht. Allerdings ist in diesem System mindestens ein unbekannter Transmitter vorhanden, da eines der Axone im Speichelgangnerv, welches vom SN2-Neuron ausgeht, weder dopaminerg noch serotonerg ist (Baumann et al., 2002).

## 5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit sollten wichtige Teilmechanismen der Erregungs-Sekretions-Kopplung in der Speicheldrüse von *Periplaneta americana* mit verschiedenen Methoden aufgeklärt werden. Diese Drüse ist dopaminerg und serotonerg innerviert. Sie besitzt drei verschiedene transportaktive Zelltypen. In den Acini befinden sich die sekretorisch aktiven P- und C-Zellen, außerdem sind die Zellen der Ausführungsgänge transportaktiv. Die beiden fundamental unterschiedlichen Prozesse der Speichelbildung, nämlich einerseits die Sekretion von Ionen und Wasser und andererseits die Proteinsekretion, sind auf zwei verschiedene Zelltypen verteilt, und sie können durch unterschiedliche Neurotransmitter aktiviert werden. Nach einer Stimulierung mit DA produzieren die P-Zellen der Acini einen proteinfreien Speichel. Dagegen werden durch 5-HT vermutlich beide sekretorisch aktiven Zelltypen in den Acini stimuliert: die P-Zellen sezernieren einen wäßrigen Primärspeichel, und die C-Zellen sezernieren Proteine in den Speichel. Die Ausführungszellen werden nur durch DA stimuliert. Ihre Funktion ist vermutlich die Modifikation des Primärspeichels.

Es wurden Experimente mit isolierten Speicheldrüsen bzw. an isolierten Zellen der Drüse durchgeführt, um verschiedene Themenkomplexe der Erregungs-Sekretions-Kopplung genauer zu untersuchen.

### 5.1 Elektrolytgehalt im Speichel und Flüssigkeitssekretion

Durch Messung der Raten der Flüssigkeitssekretion und kapillarelektrophoretische Analysen der Ionenkonzentrationen im Endspeichel sollten die folgenden Fragen beantwortet werden:

- (1) Welche Transporter sind an der Sekretion des Primärspeichels und an dessen Modifikation beteiligt?
- (2) Welche funktionelle Rolle spielen die transportaktiven Epithelzellen der Ausführungsgänge für die Modifikation des Primärspeichels?

Die Funktion der Ausführungszellen für die Modifikation des Primärspeichels sollte indirekt durch Vergleich der Ionenkonzentrationen im DA- und 5-HT-stimulierten Endspeichel geklärt werden. Die  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  und  $\text{Cl}^-$ -Konzentrationen nach DA- und 5-HT-Stimulierung unterscheiden sich nicht signifikant. Beide Speichelqualitäten sind hypoosmotisch zum verwendeten Ringer. Ich gehe davon aus, daß nach beiden Stimulierungen ein isoosmotischer Primärspeichel mit in etwa gleicher Zusammensetzung gebildet wird. Deshalb müssen sowohl die DA-stimulierten als auch die während einer 5-HT-Stimulierung der Drüse unstimulierten Ausführungszellen den Primärspeichel durch eine netto-Ionenreabsorption modifizieren. Dieses Ergebnis wird durch die Befunde der Elektronenstrahl-Röntgenmikroanalyse von Gupta & Hall (1983) unterstützt.

Die Aktivität der  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase ist von fundamentaler Bedeutung für die Modifikation des DA-stimulierten Speichels. Während einer Hemmung der  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase fällt die  $\text{K}^+$ -Konzentration im Endspeichel, während die  $\text{Na}^+$ -Konzentration ansteigt. Der sezernierte Speichel ist in etwa isoosmotisch zum verwendeten Ringer. Dagegen beeinflußt die Aktivität der  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase die DA-stimulierten Raten der Flüssigkeitssekretion nicht.

Die Wirkungen einer Hemmung der  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase während einer 5-HT-Stimulierung sind quasi umgekehrt: die Ionenkonzentrationen im Endspeichel werden nicht signifikant beeinflußt, dafür ist die Rate der Flüssigkeitssekretion gesteigert. Dies zeigt, daß die Aktivität der  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase für die Modifikation des Primärspeichels durch die unstimulierten Ausführungszellen von geringer Be-

deutung ist. Die Steigerung der Sekretionsrate zeigt indirekt, daß eine  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  in der Basolateralmembran der P-Zellen lokalisiert sein muß.

Die Aktivität des NKCC ist für die Prozesse der Ionen- und Flüssigkeitssekretion während beider Stimulierungen von großer Bedeutung. Die Raten der Flüssigkeitssekretion sind in Gegenwart des NKCC-Hemmstoffs Bumetanid nach DA- und 5-HT-Stimulierung dramatisch reduziert ( $8 \pm 7\%$  bzw.  $15 \pm 4\%$  der Kontrolle bei DA- bzw. 5-HT-Stimulierung). Außerdem sinken die Ionenkonzentrationen im Endspeichel: nach DA-Stimulierung nur die  $\text{Na}^+$ -Konzentration reduziert, während nach 5-HT-Stimulierung die  $\text{Na}^+$ -,  $\text{K}^+$ - und die  $\text{Cl}^-$ -Konzentration verringert ist. Der Befund, daß die 5-HT-stimulierte Flüssigkeitssekretion durch Hemmung des NKCC reduziert wird, zeigt indirekt eine Expression dieses Cotransporters in der Basolateralmembran der P-Zellen.

Die Funktion der Ausführungszellen ist komplexer als bislang angenommen. Unter anderem ist die Richtung des Wassertransports noch nicht geklärt. Um die Funktion des NKCC erklären zu können, werden weitere Informationen benötigt, z. B. sein Einfluß auf die Ionenänderungen in den Acinuszellen sowie die Zusammensetzung des Primärspeichels nach seiner Hemmung.

## **5.2 Änderung intrazellulärer Ionenkonzentrationen in den Acinuszellen**

Mit mikrofluorometrischen Messungen ("ratiometric imaging") sollten die Änderungen der Ionenkonzentrationen in den Acinuszellen während einer Stimulierung der Drüsen gemessen werden.

Die Messungen mit dem  $\text{Ca}^{2+}$ -empfindlichen Farbstoff Fura-2 ergaben keine Hinweise auf eine deutliche Erhöhung der globalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in den P-Zellen. Die C-Zellen lieferten kein meßbares Fluoreszenzsignal. Es ist sehr wahrscheinlich, daß es zumindest lokale Erhöhungen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in den P-Zellen gibt, da diese in ihrer Basolateralmembran  $\text{Ca}^{2+}$ -gesteuerte  $\text{K}^+$ -Kanäle exprimieren. Solche lokalen Erhöhungen konnten mit der angewandten Methode nicht aufgelöst werden. Es bleibt allerdings weiterhin die Möglichkeit bestehen, daß methodische Probleme die Messung globaler  $\text{Ca}^{2+}$ -Änderungen verhinderten.

Methodische Probleme bestanden z. B. in der schlechten Beladung der Zellen, einer starken und sich während einer DA-Stimulierung ändernden Autofluoreszenz sowie in Änderungen des Zellvolumens. Geplante Messungen der Änderungen intrazellulärer  $\text{Na}^+$ - und  $\text{K}^+$ -Konzentrationen wurden aufgrund dieser Probleme nicht durchgeführt.

Außerdem wurde die Fluoreszenz der am Stoffwechsel der Zelle beteiligten Enzyme NAD(P)H sowie der Flavoproteine gemessen. Die Messungen zeigten, daß die Stoffwechselaktivität der Zellen während einer DA-Stimulierung transient ansteigt. Außerdem wurde ein Anstieg der Stoffwechselaktivität gefunden, nachdem sie nach Absetzen des DA wieder auf den Ruhewert zurückging. Dieser Anstieg der Stoffwechselaktivität könnte in den Zellen der Ausführungsgänge in Zusammenhang damit stehen, daß auch die unstimulierten Gangzellen den Primärspeichel modifizieren.

## **5.3 Proteinsekretion**

Die Signalkaskaden, die zwischen einer 5-HT-Stimulierung und der Proteinsekretion vermitteln, sollten charakterisiert werden. Dazu wurden zwei methodische Ansätze verfolgt: eine direkte Registrierung der Exocytose mit videoverstärkter DIK-Mikroskopie und eine biochemische Analyse des Proteingehalts im Endspeichel.

Die direkte Beobachtung der Degranulation von Vesikeln in isolierten C-Zellen oder kleinen Drüsenläppchen mit Hilfe videoverstärkter DIK-Mikroskopie war an diesem Gewebe aufgrund von Bewegungs-Artefakten und einer zu geringen Stärke der Degranulation nach einer 5-HT-Stimulierung nicht möglich.

Deshalb wurde leider nur die biochemische Bestimmung des Proteingehalts im Endspeichel angewandt. Dieser Ansatz hat ein schlechtes zeitliches Auflösungsvermögen, und er benötigt eine relativ hohe Konzentration abgegebener Proteine. Außerdem konnte, aufgrund methodischer Probleme, die Wirksamkeit der verwendeten Substanzen zur Erhöhung der intrazellulären Konzentrationen von  $\text{Ca}^{2+}$ , cAMP und / oder cGMP nicht überprüft werden. Deshalb sind die Ergebnisse dieser Arbeit nur als erste Hinweise auf die beteiligten Signalwege zu sehen, welche durch weitere Experimente abgesichert werden sollten.

Zunächst wurde eine Dosis-Wirkungskurve für die 5-HT-stimulierte Proteinsekretion erstellt. Die Proteinsekretion erfolgt dosisabhängig, der Schwellenwert liegt bei ca.  $3 \times 10^{-8}$  M, die Sättigung bei  $10^{-4}$  M. Diese Dosis-Wirkungskurve stimmt gut mit der von Just & Walz (1996) publizierten Dosis-Wirkungskurve für die 5-HT-stimulierte Flüssigkeitssekretion überein.

In einer Reihe von Experimenten wurden pharmakologisch die intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -, cAMP- und / oder cGMP-Konzentrationen erhöht. Die Ergebnisse legen nahe, daß  $\text{Ca}^{2+}$  die Proteinsekretion in der Schabenspeicheldrüse nicht direkt aktiviert. Dagegen scheint diese durch eine Erhöhung der cAMP-Konzentration direkt aktiviert und durch eine gleichzeitige  $\text{Ca}^{2+}$ -Erhöhung verstärkt zu werden. cGMP aktiviert keine Proteinsekretion. Allerdings wird durch eine Erhöhung der intrazellulären cGMP-Konzentration die durch  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierte Proteinsekretion unterdrückt. Vorversuche zeigten, daß der NO-/cGMP-Signalweg auch an der Flüssigkeitssekretion beteiligt ist. Aufgrund meiner Ergebnisse postuliere ich in den C-Zellen die Existenz eines 5-HT-Rezeptor, welcher die Adenylatcyclase aktiviert. Die Adenylatcyclase wird eventuell durch  $\text{Ca}^{2+}$  stimuliert.





## 6. Literatur

- Abenavoli, A., Montagna, M. & Malgaroli, A. (2001): Calcium: the common theme in vesicular cycling. *Nature Neuroscience* 4 (2): 117-118
- Adams, S.R., Harootunian, A.T., Buechler, Y.J., Taylor, S.S. & Tsien, R.Y. (1991): Fluorescence ratio imaging of cyclic AMP in single cells. *Nature* 349 (6311): 694-697
- Agrawal, O.P. & Bahadur, J. (1978): Role of salivary glands in the maintenance of midgut amylase activity in *Periplaneta americana* L. *Experientia* 34 (12): 1552
- Agrawal, O.P. & Bahadur, J. (1981): Control of midgut invertase activity in *Periplaneta americana*: The possible role of the salivary glands. *Journal of Insect Physiology* 27 (5): 293-295
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Roberts, K. & Watson, J.D. (Ed.) (1994): Molecular Biology of the cell. Garland Publishing, New York: 3-1294
- Albillos, A., Dernick, G., Horstmann, H., Almers, W., Alvarez de Toledo, G. & Lindau, M. (1997): The exocytotic event in chromaffin cells revealed by patch amperometry. *Nature* 389 (6650): 509-512
- Al-Fifi, Z.I.A., Anstee, J.H. & Bowler, K. (1998): The action of inhibitors of protein kinases on fluid and ion secretion by Malpighian tubules of *Locusta migratoria*, L. *Journal of Insect Physiology* 44: 973-980
- Ali, D.W. (1997): The aminergic and peptidergic innervation of insect salivary glands. *Journal of Experimental Biology* 200 (Pt 14): 1941-1949
- Ali, D.W. & Orchard, I. (1994): Characterization of dopamine and serotonin receptors on the salivary glands of the locust, *Locusta migratoria*. *Biogenic Amines* 10 (3): 195-212
- Ali, I. & Sarna, S.K. (2002) Selective modulation of PKC isozymes by inflammation in canine colonic circular muscle cells. *Gastroenterology* 122 (2): 483-494
- Almers, W. & Neher, E. (1985): The Ca signal from fura-2 loaded mast cells depends strongly on the method of dye-loading. *FEBS Letters* 192 (1): 13-18
- Artalejo, C.R., Elhamdani, A. & Palfrey, H.C. (1996): Calmodulin is the divalent cation receptor for rapid endocytosis, but not exocytosis, in adrenal chromaffin cells. *Neuron* 16 (1): 195-205
- Ashby, M.C. & Tepikin, A.V. (2002): Polarized calcium and calmodulin signaling in secretory epithelia. *Physiological Reviews* 82 (3): 701-734
- Augustine, G.J. & Neher, E. (1992): Calcium requirements for secretion in bovine chromaffin cells. *Journal of Physiology* 450: 247-271
- Baumann, O., Dames, P., Kühnel, D. & Walz, B. (2002): Distribution of serotonergic and dopaminergic nerve fibers in the salivary gland complex of the cockroach *Periplaneta americana*. *BMC Physiology* 2 (9): <http://www.biomedcentral.com/1472-6793/2/9>
- Bennett, J.P., Cockcroft, S. & Gomperts, B.D. (1979): Ionomycin stimulates mast cell histamine secretion by forming a lipid-soluble calcium complex. *Nature* 282 (5741): 851-853.
- Berridge, M.J. (1972): The mode of action of 5-hydroxytryptamine. *Journal of Experimental Biology* 53 (1): 171-186
- Berridge, M.J. (2002): The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle. *Cell Calcium* 32(5-6): 235-249

- Berridge, M.J. & Heslop, J.P. (1981): Separate 5-hydroxytryptamine receptors on the salivary gland of the bowfly are linked to the generation of either cyclic adenosine cyclic adenosine 3',5'-monophosphate or calcium signals. *British Journal of Pharmacology* 73 (3): 729-738
- Berridge, M.J., Lindley, B.D. & Prince, W.T. (1975): Membrane permeability changes during stimulation of isolated salivary glands of *Calliphora* by 5-hydroxytryptamine. *Journal of Physiology* 244 (3): 549-567
- Berridge, M.J., Lindley, B.D. & Prince, W.T. (1976): Studies on the mechanism of fluid secretion by isolated salivary glands of *Calliphora*. *Journal of Experimental Biology* 64 (2): 311-322
- Berridge, M.J. & Prince, W.T. (1972): The role of cyclic AMP and calcium in hormone action. In: Treherne, J.E., Berridge, M.J. & Wigglesworth, V.B. (Ed.): *Advances in Insect Physiology*. Academic Press, London: 1-49
- Betz, W.J. & Angleson, J.K. (1998): The synaptic vesicle cycle. *Annual Review of Physiology* 60: 347-363
- Betz, W.J. & Bewick, G.S. (1992): Optical analysis of synaptic vesicle recycling at the frog neuromuscular junction. *Science* 255 (5041): 200-203
- Beyenbach, K.W. (2001): Energizing epithelial transport with the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase. *News in Physiological Sciences* 16: 145-151
- Biondi, C., Campi, A.L., Pareschi, M.C., Portolan, A. & Ferretti, M.E. (1990): RMI 12330A, an inhibitor of adenylate cyclase and cyclic AMP-phosphodiesterase activities in the segmental ganglia of the leech *Hirudo medicinalis*. *Neuroscience Letters* 113 (3): 322-327
- Blackman, J.G., Ginsborg, B.L. & House, C.R. (1979a): On the effect of ionophoretically applied dopamine on salivary gland cells of *Nauphoeta cinerea*. *Journal of Physiology* 287: 67-80
- Blackman, J.G., Ginsborg, B.L. & House, C.R. (1979b): On the time course of the electrical response of salivary gland cells of *Nauphoeta cinerea* to ionophoretically applied dopamine. *Journal of Physiology* 287: 81-92
- Bland, K.P. & House, C.R. (1971): Function of the salivary glands of the cockroach, *Nauphoeta cinerea*. *Journal of Insect Physiology* 17: 2069-2084
- Blenau, W., Balfanz, S. & Baumann, A. (2000): Amtyr I: characterization of a gene from honeybee (*Apis mellifera*) brain encoding a functional tyramine receptor. *Journal of Neurochemistry* 74 (3): 900-908
- Blenau, W. & Baumann, A. (2001): Molecular and pharmacological properties of insect biogenic amine receptors: lessons from *Drosophila melanogaster* and *Apis mellifera*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 48 (1): 13-38
- Borst, J. G. G. & Sakmann, B. (1999): Depletion of calcium in the synaptic cleft of a calyx type synapse in the rat brainstem. *Journal of Physiology* 521 (1): 123-133
- Bowser-Riley, F. (1978): The salivary glands of the cockroach *Nauphoeta cinerea* (Olivier). A study of its innervation by light and scanning electron microscopy. *Cell and Tissue Research* 187 (3): 525-534
- Bowser-Riley, F. & House, C.R. (1976): The actions of some putative neurotransmitters on the cockroach salivary gland. *Journal of Experimental Biology* 64 (3): 665-676
- Bowser-Riley, F., House, C.R. & Smith, R.K. (1978): Competitive antagonism by phentolamine of responses to biogenic amines and the transmitter at a neuroglandular junction *Journal of Physiology* 279: 473-489
- Bradford, M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254
- Brewer, M., Utzinger, U., Li, Y., Atkinson, E.N., Satterfield, W., Richards-Kortum, R., Follen, M. & Bast, R. (2002): Fluorescence spectroscopy as a biomarker in a cell culture and in a nonhuman primate model for ovarian cancer chemopreventive agents. *Journal of Biomedical Optics* 7 (1): 20-26

- Brose, N. & Neher, E. (2002): Specificity emerges in the dissection of diacylglycerol- and protein kinase C-mediated signalling pathways. *PNAS* 99 (26): 16522-16523
- Brownlee, C. (2000): Cellular calcium imaging: so, what's new? *Trends in Cell Biology* 10: 451-457
- Brusilow, S.W. & Cooke, R.E. (1959): Role of parotid ducts in secretion of hypotonic saliva. *American Journal of Physiology* 196: 831-839
- Campos-Toimil, M., Edwardson, M. & Thomas, P. (2000): Real-time studies of zymogen granule exocytosis in intact rat pancreatic acinar cells. *Journal of Physiology* 582 (2): 317-326
- Campos-Toimil, M., Bagrij, T., Edwardson, J.M. & Thomas, P. (2002): Two modes of secretion in pancreatic acinar cells: involvement of phosphatidylinositol 3-kinase and regulation by capacitative  $Ca^{2+}$  entry. *Current Biology* 12 (3): 211-215
- Campos-Toimil, M., Edwardson, J.M. & Thomas, P. (2002): Acetylcholine-induced zymogen granule exocytosis: comparison between acini and single pancreatic acinar cells. *Pancreas* 24 (2): 179-183
- Carpenter, G.H., Proctor, G.B., Anderson, L.C., Zhang, X.S. & Garrett, J.R. (2000): Immunoglobulin A secretion into saliva during dual sympathetic and parasympatric nerve stimulation in rat submandibular glands. *Experimental Physiology* 85 (3): 281-286
- Chiu, D.T., Lillard, S.J., Scheller, R.H., Zare, R.N., Rodriguez-Cruz, S.E., Williams, E.R., Orwar, O., Sandberg, M. & Lundqvist, J.A. (1998): Probing single secretory vesicles with capillary electrophoresis. *Science* 279 (5354): 1190-1193
- Cho, S.J., Cho, J. & Jena, B.P. (2002): The number of secretory vesicles remains unchanged following exocytosis. *Cell Biology International* 26 (1): 29-33
- Clements, J.D. (1996): Transmitter timecourse in the synaptic cleft: its role in central synaptic function. *Trends in Neurosciences* 19: 163-171
- Coast, G.M. (1995): Synergism between diuretic peptides controlling ion and fluid transport in insect malpighian tubules. *Regulatory Peptides* 57 (3): 283-296
- Cooper, D.M.F., Mons, N. & Karpen, J.W. (1995): Adenylyl cyclases and the interaction between calcium and cAMP signalling. *Nature* 374: 421-424
- Dalton, T. (1987): Receptor turnover and the action of 5-Hydroxytryptamine on the salivary glands of the bowfly *Calliphora erythrocephala*, the housefly *Musca domestica* and the frog skin epithelium. *Comparative Biochemistry and Physiology* 88 (2): 233-239
- Davies, S.-A. (2000): Nitric oxide signalling in insects. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 30: 1123-1138
- Day, M.F. (1951): The mechanism of secretion by the salivary gland of the cockroach *Periplaneta americana* (L.). *Australian Journal of Scientific Research*, B 4 (2): 137-143
- Dettner, K. (1999): Insekten als Nahrungsquelle, Abwehrmechanismen. In: Dettner, K. & Peters, W. (Ed.): *Lehrbuch der Entomologie*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart: 569-614
- Dow, J.A.T., Maddrell, S.H.P., Davies, S.A., Skaer, N.J.V. & Kaiser, K. (1994): A novel role for the nitric oxide-cGMP signaling pathway: the control of epithelial function in *Drosophila*. *American Journal of Physiology* 266 (5 Pt 2): R1716-R1719
- Dow, J.A.T., Maddrell, S.H.P., Görtz, A., Skaer, N.J.V., Brogan, S. & Kaiser, K. (1994): The malpighian tubules of *Drosophila melanogaster*: a novel phenotype for studies of fluid secretion and its control. *Journal of Experimental Biology* 197: 421-428

- Duhe, R.J., Nielsen, M.D., Dittman, A.H., Villacres, E.C., Choi, E.J. & Storm, D.R. (1994): Oxidation of critical cysteine residues of type I adenylyl cyclase by o-iodosobenzoate or nitric oxide reversibly inhibits stimulation by calcium and calmodulin. *Journal of Biological Chemistry* 269 (10): 7290-7296
- Duve, H., Johnsen, A.H., Sewell, J.C., Scott, A.G., Orchard, I., Rehfeld, J.F. & Thorpe, A. (1992) Isolation, structure, and activity of -Phe-Met-Arg-Phe-NH<sub>2</sub> neuropeptides (designated calliFMRFamides) from the blowfly *Calliphora vomitoria*. *PNAS* 89 (6): 2326-2330
- Dzubay, J. A. & Jahr, C. E. (1999): The Concentration of Synaptically Released Glutamate Outside of the Climbing Fiber Purkinje Cell Synaptic Cleft. *The Journal of Neuroscience* 19 (13): 5265-5274
- Eisenbeis, G. & Wichard, W. (1999): Wasserregulation, Osmo- und Ionenregulation sowie Exkretion. In: Dettner, K. & Peters, W. (Ed.): *Lehrbuch der Entomologie*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart: 129-170
- Eisner, T., Aneshansley, D.J., Eisner, M., Attygalle, A.B., Alsop, D.W. & Meinwald, J. (2000): Spray mechanism of the most primitive bombardier beetle (*Metrius contractus*). *Journal of Experimental Biology* 203 (Pt 8): 1265-1275
- Evans, A.M. & Green, K.L. (1990): Characterization of the dopamine receptor mediating the hyperpolarization of cockroach salivary gland acinar cells in vitro. *British Journal of Pharmacology* 101: 103-108
- Evans, A.M. & Green, K.L. (1991): Effects of selective D1 and D2 dopamine agonists on cockroach salivary gland acinar cells in vitro. *British Journal of Pharmacology* 104: 787-792
- Evans, A.M., MacEwan, D.J. & Palmer, S. (1991): The D1-like dopamine receptor of the cockroach salivary gland is coupled to phospholipase C in addition to adenylyl cyclase. *British Journal of Pharmacology* 102: 212P
- Faulde, M., Fuchs, M.E.A. & Nagl, W. (1990a): Sex-, stadium- and stress-specific analysis of the salivary proteins of the german cockroach, *Blattella germanica* L. *Journal of Insect Physiology* 36: 41-50
- Faulde, M., Fuchs, M. & Nagl, W. (1990b): Further characterization of a dispersion-inducing contact pheromone in the saliva of the german cockroach, *Blattella germanica* L. (Blattodea: Blattellidae). *Journal of Insect Physiology* 36 (5): 353-359
- Ferretti, M.E., Sonetti, D., Pareschi, M.C., Buzzi, M., Colamussi, M.L. & Biondi, C. (1996): MDL 12330A inhibits the non-neuronal adenylyl cyclase from the freshwater snail *Planorbarius corneus*, but the neuronal enzyme is activated by this compound. *Neuroscience Letters* 207 (3): 191-194
- Fimia, G.M. & Sassone-Corsi, P. (2001): Cyclic AMP signalling. *Journal of Cell Science* 11: 1971-1972
- Fisher, T.E., Marszalek, P.E., Oberhauser, A.F., Carrion-Vazquez, M. & Fernandez, J.M. (1999): The micro-mechanics of single molecules studied with atomic force microscopy. *Journal of Physiology* 520 (Pt 1): 5-14
- Fujita-Yoshigaki, J. (1998): Divergence and convergence in regulated exocytosis: the characteristics of cAMP-dependent enzyme secretion of parotid salivary acinar cells. *Cellular Signalling* 10 (6): 371-375
- Fujiwara, S., Shimamoto, C., Katsu, K., Imai, Y. & Nakahari, T. (1999): Isoosmotic modulation of Ca<sup>2+</sup>-regulated exocytosis in guinea-pig antral mucous cells: role of cell volume. *Journal of Physiology* 516 (1): 85-100
- Gerhardt, C. & Van Heerikhuizen, H. (1997): Functional characteristics of heterologously expressed 5-HT receptors. *European Journal of Pharmacology* 334: 1-23
- Gilbert, L.I., Rybczynski, R. & Warren, J.T. (2002): Control and biochemical nature of the ecdysteroidogenic pathway. *Annual Review of Entomology* 47: 883-916
- Ginsborg, B.L. & House, C.R. (1976): The responses to nerve stimulation of the salivary gland of *Nauphoeta cinerea* (Olivier). *Journal of Physiology* 262: 477-487
- Ginsborg, B.L., House, C.R. & Mitchell, M.R. (1976): On the role of calcium in the electrical responses of cockroach salivary gland cells to dopamine. *Journal of Physiology* 303: 325-335

- Ginsborg, B.L., House, C.R. & Mitchell, M.R. (1980): A calcium-readmission response recorded from *Nauphoeta salivary gland acinar cells*. *Journal of Physiology* 304: 437-447
- Ginsborg, B.L., House, C.R. & Silinsky, E.M. (1974): Conductance changes associated with the secretory potential in the cockroach salivary gland. *Journal of Physiology* 236: 723-731
- Ginsborg, B.L., House, C.R. & Silinsky, E.M. (1976): On the receptors which mediate the hyperpolarization of salivary gland cells of *Nauphoeta cinerea* (Olivier). *Journal of Physiology* 262: 489-500
- Golenda, C.F., Burge, R. & Schneider, I. (1992): *Plasmodium falciparum* and *P. berghei*: detection of sporozoites and the circumsporozoite proteins in the saliva of *Anopheles stephensi* mosquitoes. *Parasitological Research* 78 (7): 563-569
- Golenda, C.F., Hall, T., Schneider, I. & Wirtz, R.A. (1992): Immunoenzymatic labeling of multiple plasmodial salivary gland sporozoites in a single test *American Journal of Tropical Medicine Hygiene* 46 (3): 314-319
- González, E., Becerra, A. & Laserna, J.J. (1996): Direct determination of diuretic drugs in urine by capillary zone electrophoresis using fluorescence detection. *Journal of Chromatography B* 687 (1): 145-150.
- Gorbunova, Y.V. & Spitzer, N.C. (2002): Dynamic interactions of cyclic AMP transients and spontaneous  $Ca^{2+}$  spikes. *Nature* 418 (6893): 93-96
- Gray, D.C., Ginsborg, B.L. & House, C.R. (1984): Cyclic AMP as a possible mediator of dopamine stimulation of cockroach gland cells. *Quarterly Journal of Experimental Physiology* 69: 171-186
- Gray, D.C. & House, C.R. (1982): The influence of calcium on the control of fluid secretion in the cockroach salivary gland. *Quarterly Journal of Experimental Physiology* 67: 639-654
- Greger, R. (1996): The membrane transporters regulating epithelial NaCl secretion *Pflügers Archiv* 432: 579-588
- Grospietsch, T., Sitnikova, T.Y. & Zerbst-Boroffka, I. (1996): Comparison of calcium storage between a Balkian gastropod and holarctic relatives. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 125: 273-283
- Gross, J., Podsiadlowski, L. & Hilker, M. (2002): Antimicrobial activity of exocrine glandular secretion of *Chrysomela* larvae. *Journal of Chemical Ecology* 28 (2): 317-331
- Grünbaum, L. & Müller, U. (1998): Induction of a specific olfactory memory leads to a long-lasting activation of protein kinase C in the antennal lobe of the honeybee. *Journal of Neuroscience* 18 (11): 4384-4392
- Gryniewicz, G., Poenie, M. & Tsien, R.Y. (1985): A new generation of  $Ca^{2+}$  indicators with greatly improved fluorescence properties. *The Journal of Biological Chemistry* 260 (6): 3440-3450.
- Gu, X., Quilic, D., Juarez, P., Blomquist, G.J. & Schal, C. (2000): Biosynthesis of Hydrocarbons and Contact Sex Pheromone and their Transport by Lipophorin in Females of the German Cockroach (*Blattella germanica*). *Journal of Insect Physiology* 41 (3): 257-267
- Guatimosim, C. & von Gersdorff, H. (2002): Optical monitoring of synaptic vesicle trafficking in ribbon synapses. *Neurochemistry International* 41: 307-312
- Gupta, B.L. & Hall, T.A. (1983): Ionic distribution in dopamine-stimulated NaCl fluid-secreting cockroach salivary glands. *American Journal of Physiology* 244 (13): R176-R186
- Haller, T., Ortmayr, J., Friedrich, F., Völkl, H. & Dietl, P. (1998): Dynamics of surfactant release in alveolar type II cells. *PNAS* 95 (4): 1579-1584
- Hancock, J.T. (Ed.) (1997): *Cell Signalling*. Addison Wesley Longman, Essex: 1-210
- Hansen Bay, C.M. (1978a): The control of enzyme secretion from fly salivary glands. *Journal of Physiology* 274: 421-435

- Hansen Bay, C.M. (1978b): The secretion and action of the digestive enzymes of the salivary glands of the blowfly *Calliphora*. *Journal of Insect Physiology* 24: 141-149
- Hazel, M.H., Ianowski, J.P., Christensen, R.J., Maddrell, S.H. & O'Donnell, M.J. (2003): Amino acids modulate ion transport and fluid secretion by insect Malpighian tubules. *The Journal of Experimental Biology* 206 (Pt 1): 79-91
- He, H., Podymow, T., Zimpelmann, J. & Burns, K.D. (2003): Nitric oxide inhibits  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$  Cotransport via a Cytochrome P450-Dependent Pathway in a Renal Epithelial Cell Line (MMDD1). *American Journal of Physiology*: F [epub ahead of print]
- Herbert, J.M., Augereau, J.M., Gleye, J. & Maffrand, J.P. (1990): Chelerythrine is a potent and specific inhibitor of protein kinase C. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 172 (3): 993-999
- Heslop, J.P. & Berridge, M.J. (1980): Changes in cyclic AMP and cyclic GMP concentrations during the action of 5-hydroxytryptamine on an insect salivary gland. *Biochemical Journal* 192 (1): 247-255
- Hille, B., Billiard, J., Babcock, D.F., Nguyen, T. & Koh, D.-S. (1999): Stimulation of exocytosis without a calcium signal. *Journal of Physiology* 520 (1): 23-31
- Hofer, A. M. & Scheenen, W.J.J.M. (1999): Imaging Calcium in the cytoplasm and in organelles with fluorescent dyes: general principles. In: Rizzuto, R. & Fasolato, C. (Ed.): *Imaging living cells*. Springer Verlag, Berlin: 53-91
- Hölldobler, B. & Wilson, E.O. (1990): *The ants*. Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge: 1-736
- Holroyd, P., Lang, T., Wenzel, D., De Camilli, P. & Jahn, R. (2002): Imaging direct, dynamin-dependent recapture of fusing secretory granules on plasma membrane lawns from PC12 cells. *PNAS* 99 (26): 16806-16811
- Hopkin, R., Anstee, J.H. & Bowler, K. (2001): An investigation into the effects of inhibitors of fluid production by *Locusta* malpighian tubule type I cells on their secretion and elemental composition. *Journal of Insect Physiology* 47: 359-367
- House, C.R. (1973): An electrophysiological study of neuroglandular transmission in the isolated salivary glands of the cockroach. *Journal of Experimental Biology* 58: 29-43
- House, C.R. (1980): Physiology of invertebrate salivary glands. *Biological Reviews* 55: 417-473
- House, C.R. & Ginsborg, B.L. (1982): Properties of dopamine receptors at a neuroglandular synapse. In: Evedred, D., O'Connor, M. & Wehlan, J. (Ed.): *Neuropharmacology of insects*. Pitman, London: 32-47.
- House, C.R. & Ginsborg, B.L. (1985): Salivary Gland. In: Kerkut, G.A. & Gilbert, L.I. (Ed.): *Comprehensive Insect Physiology and Pharmacology*. Pergamon Press, Oxford: 195-224
- House, C.R. & Smith, R.K. (1978): On the receptors involved in the nervous control of salivary secretion by *Nauphoeta cinerea* (Olivier). *Journal of Physiology* 279: 457-471
- Hunt, N.H. & Evans, T. (1980): RMI 12330A, an inhibitor of cyclic nucleotide phosphodiesterases and adenylate cyclase in kidney preparations. *Biochimica et Biophysica Acta* 613: 499-506
- Imai, A. (1999): Comparison of phosphodiesterase isozymes in rodent parotid glands. *Comparative Biochemistry and Physiology B* 124 (4): 397-403
- Iourgenko, V. & Levin, L.R. (2000): A calcium-inhibited *Drosophila* adenylyl cyclase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1495: 125-139

- Ishihara, Y., Sakurai, T., Habara, Y., Busik, J.V., Kanno, T. & Terakawa, S. (2000): Exocytosis in the dissociated pancreatic acinar cells of the guinea pig directly visualized by VEC-DIC microscopy. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 277: 134-137
- Ishihara, Y., Sakurai, T., Kimura, T. & Terakawa, S. (2000): Exocytosis and movement of zymogen granules observed by VEC-DIC microscopy in the pancreatic tissues en bloc. *American Journal of Physiology* 279: C1177-C1188
- Just, F. & Walz, B. (1994a): Salivary glands of the cockroach, *Periplaneta americana*: New data from light and electron microscopy. *Journal of Morphology* 220: 35-46
- Just, F. Walz, B. (1994b): Immunocytochemical localization of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase and V-H<sup>+</sup>-ATPase in the salivary gland of the cockroach, *Periplaneta americana*. *Cell and Tissue Research* 278: 161-170
- Just, F. & Walz, B. (1994c): Localization of carbonic anhydrase in the salivary glands of the cockroach, *Periplaneta americana*. *Histochemistry* 102: 271-277
- Just, F. & Walz, B. (1996): The effects of serotonin and dopamine on salivary secretion by isolated cockroach salivary glands. *Journal of Experimental Biology* 199: 407-413
- Kakkar, R., Raju, R.V. & Sharma, R.K. (1999): Calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE1). *Cellular and Molecular Life Sciences* 55 (8-9): 1164-1186
- Kasai, H. (1999): Comparative biology of Ca<sup>2+</sup>-dependent exocytosis: implications of kinetic diversity for secretory function. *Trends in Neurosciences* 22: 88-93
- Kaupp, U. B. & Seifert, R. (2002): Cyclic nucleotide-gated ion channels. *Physiological Reviews* 82 (3): 769-824
- Kerlin, R.L. & Hughes, S. (1992): Enzymes in saliva from four parasitic arthropods. *Medical and veterinary entomology* 6 (2): 121-126
- Kjaerulff, O., Verstreken, P. & Bellen, H.J. (2002): Synaptic vesicle retrieval: still time for a kiss. *Nature Cell Biology* 4 (11): E245-E248
- Klein, C. (2002): Nitric oxide and the other cyclic nucleotide. *Cellular Signalling* 6: 493-498
- Koh, D.-S., Moody, M.W., Nguyen, T.D. & Hille, B. (2000): Regulation of exocytosis by protein kinases and Ca<sup>2+</sup> in pancreatic duct epithelial cells. *Journal of General Physiology* 116: 507-519
- Kroemer, G., Dallaporta, B. & Resche-Rigon, M. (1998): The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annual Review of Physiology* 60: 619-642
- Kuromi, H. & Kidokoro, Y. (2002): Selective replenishment of two vesicle pools depends on the source of Ca<sup>2+</sup> at the *Drosophila* synapse. *Neuron* 35 (2): 333-343
- Laird, T.B., Winston, P.W. & Braukman, M. (1972): Water storage in the cockroach *Leucophaea madrae* F. *Naturwissenschaften* 59 (11): 515-516
- Lang, I. & Walz, B. (1999a): Dopamine stimulates salivary duct cells in the cockroach, *Periplaneta americana*. *Journal of Experimental Biology* 202 (6): 729-738
- Lang, I. & Walz, B. (1999b): Dye-coupling between cells of the salivary glands in the cockroach *Periplaneta americana*. *Cell and Tissue Research* 298: 357-360
- Lang, I. & Walz, B. (2001): Dopamine-induced epithelial K<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> movements in the salivary ducts of *Periplaneta americana*. *Journal of Insect Physiology* 47: 465-474
- Lehane, M.J. (1998): The Foregut. In: Harrison, F.W. & Locke, M. (Ed.): *Microscopic Anatomy of Invertebrates*. Wiley-Liss, New York: 713-724

- Leszczyszyn, D.J., Jankowski, J.A., Viveros, O.H., Diliberto, E.J.J., Near, J.A. & Wightman, R.M. (1990): Nicotinic receptor-mediated catecholamine secretion from individual chromaffin cells. Chemical evidence for exocytosis. *The Journal of Biological Chemistry* 25 (5): 14736-14737
- Leszczyszyn, D.J., Jankowski, J.A., Viveros, O.H., Diliberto, E.J.J., Near, J.A. & Wightman, R.M. (1991): Secretion of catecholamines from individual adrenal medullary chromaffin cells. *Journal of Neurochemistry* 56 (6): 1855-1863
- Lin, R.C. & Scheller, R.H. (2000): Mechanisms of synaptic vesicle exocytosis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 16: 19-49
- Linhardt, R.J. & Toida, T. (2002): Capillary electrophoresis. Ultra-high resolution separation comes of age. *Science* 298 (5597): 1441-1442
- Linton, S.M. & O'Donnell, M.J. (1999): Contributions of  $K^+Cl^-$  cotransport and  $Na^+/K^+$ -ATPase to basolateral ion transport in malpighian tubules of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Experimental Biology* 202: 1561-1570
- Lipp, P., Bootman, M.D. & Collins, T. (2001): Photometry, video imaging, confocal and multi-photon microscopy approaches in calcium signalling studies. In: Tepikin, A. (Ed.): *Calcium signalling: A practical approach*. Oxford University Press, Oxford: 17-44
- Looms, D., Tritsarlis, K., Pedersen, A.M., Nauntofte, B. & Dissing, S. (2002): Nitric oxide signalling in salivary glands. *Journal of Oral Pathology and Medicine* 31 (10): 569-584
- Machado, J.D., Segura, F., Brioso, M.A. & Borges, R. (2000): Nitric oxide modulates a late step of exocytosis. *Journal of Biological Chemistry* 275 (27): 20274-20279
- Massey, V. (2000): The chemical and biological versatility of riboflavin. *Biochemical Society Transactions* 28 (4): 283-296
- Matthews, G.M., Neher, E. & Penner, R. (1989): Second messenger-activated calcium influx in rat peritoneal mast cells. *Journal of Physiology* 418: 105-130
- Matsuo, R., Garrett, J.R., Proctor, G.B. & Carpenter, G.H. (2000): Reflex secretion of proteins into submandibular saliva in conscious rats before and after preganglionic sympathectomy. *Journal of Physiology* 527 (1): 175-184
- Maxwell, D.J. (1981): Morphological changes in gland cells and axons resulting from stimulation of the salivary nerves of the cockroach, *Nauphoeta cinerea*. *Tissue & Cell* 13 (1): 141-151
- McCormack, J.G., Halestrap, A.P. & Denton, R.M. (1990): Role of calcium ions in regulation of mammalian intramitochondrial metabolism. *Physiological Reviews* 70 (2): 391-425
- Meda, P. (1996): The role of gap junction membrane channels in secretion and hormonal action. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 28 (4): 369-377
- Mitchell, M.R. & Martin, A.R. (1980): An electrophysiological study of the effects of ionophore A23187 on *Nauphoeta* salivary glands. *Quarterly Journal of Experimental Physiology* 65: 309-320
- Mojet, M.H., Jacobson, D.J., Keelan, J., Vergun, O. & Duchon, M.R. (2001): Monitoring mitochondrial function in single cells. In: Tepikin, A. (Ed.): *Calcium signalling. A practical approach*. Oxford University Press, Oxford: 79-110.
- Morgan, P.J. & Mordue, W. (1984): 5-Hydroxytryptamine stimulates fluid secretion in locust malpighian tubules independently of cAMP. *Comparative Biochemistry and Physiology* 79 (2): C305-C310
- Müller, U. (1997): Neuronal cAMP-dependent protein kinase type II is concentrated in mushroom bodies of *Drosophila melanogaster* and the honeybee *Apis mellifera*. *Journal of Neurobiology* 33: 33-44



- Musser, R.O. (2002): Herbivory: caterpillar saliva beats plant defences. *Nature* 416 (6881): 599-600
- Nakahari, T., Fujiwara, S. & Shimamoto, C. (2000):  $[Na^+]_i$ ,  $[K^+]_i$  and  $[Cl^-]_i$  regulation of exocytosis in guinea-pig antral mucous cells. *Journal of Korean Medical Science* 15: S36-S37
- Nakahari, T., Ito, S., Yoshida, H., Furuya, E. & Imai, Y. (2000): Accumulation of cAMP evoked by acetylcholine stimulation in rat submandibular acinar cells: observation of exocytosis, fluid secretion and  $[Ca^{2+}]_i$ . *Experimental Physiology* 85 (2): 159-169
- Narasimhan, S., Koski, R.A., Beaulieu, B., Anderson, J.F., Ramamoorthi, N., Kantor, F., Cappello, M. & Fikrig, E. (2002): A novel family of anticoagulants from the saliva of *Ixodes scapularis*. *Insect Molecular Biology* 11 (6): 641-650
- Neher, E. (1988): The influence of intracellular calcium concentration on degranulation of dialysed mast cells from rat peritoneum. *Journal of Physiology* 395: 193-214
- Neher, E. (1998): Vesicle pools and  $Ca^{2+}$  microdomains: new tools for understanding their roles in neurotransmitter release. *Neuron* 20 (3): 389-399
- Neher, E. & Marty, A. (1982): Discrete changes of cell membrane capacitance observed under conditions of enhanced secretion in bovine adrenal chromaffin cells. *PNAS* 79 (21): 6712-6716
- Ninomiya, Y., Kishimoto, T., Yamazawa, T., Ikeda, H., Miyashita, Y. & Kasai, H. (1997): Kinetic diversity in the fusion of exocytotic vesicles. *The EMBO Journal* 16 (5): 929-934
- O'Donnell, M.J., Dow, J.A.T., Huesmann, G.R., Tublitz, N.J. & Maddrell, S.H.P. (1996): Separate control of anion and cation transport in malpighian tubules of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Experimental Biology* 199: 1163-1175
- O'Donnell, M.J. & Maddrell, S.H.P. (1984): Secretion by the Malpighian tubules of *Rhodnius prolixus* Stal: Electrical events. *Journal of Experimental Biology* 110: 275-290
- Ortiz, P.A. & Garvin, J.L. (2002): Role of nitric oxide in the regulation of nephron transport. *American Journal of Physiology* 282 (5): F777-784
- Ortiz, P.A., Hong, N.J. & Garvin, J.L. (2001): NO decreases thick ascending limb chloride absorption by reducing  $Na^+-K^+-2Cl^-$  cotransporter activity. *American Journal of Physiology* 281 (5): F819-825
- Pannabecker, T.L. (1995): Physiology of the malpighian tubule. *Annual Review of Entomology* 40: 493-510
- Penner, R. & Neher, E. (1989): The patch-clamp technique in the study of secretion. *Trends in Neuroscience* 12 (4): 159-163
- Peters, W. (1999): Medizinische Entomologie. In: Dettner, K. & Peters, W. (Ed.): *Lehrbuch der Entomologie*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart: 669-708
- Pierce, K.L., Premont, R.T. & Lefkowitz, R.J. (2002): Seven-Transmembrane Receptors. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 3: 639-650
- Qian, Y., Yuan, J., Essenberg, R.C., Bowman, A.S., Shook, A.L., Dillwith, J.W. & Sauer, J.R. (1998): Prostaglandin E2 in the salivary glands of the female tick, *Amblyomma americanum* (L.): calcium mobilization and exocytosis. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 28: 221-228
- Quissell, D.O. & Tabak, L.A. (1989): Salivary mucin secretion. In: Schultz, S.G., Forte, J.G. & Rauner, B.B. (Ed.): *Handbook of Physiology. Section 6: The Gastrointestinal System. Volume III: Salivary, Gastric, Pancreatic, and Hepatobiliary Secretion*. Oxford University Press, Oxford: 79-91
- Raychaudhuri, D.N. & Gosh, S.K. (1964): Study on the histophysiology of the salivary apparatus of *Periplaneta americana* Linn. *Zoologischer Anzeiger* 173: 227-237

- Rettig, J. & Neher, E. (2002): Emerging roles of presynaptic proteins in  $\text{Ca}^{++}$ -triggered exocytosis. *Science* 298 (5594): 781-785
- Ribeiro, J.M.C. (1995): Insect saliva: Function, Biochemistry, and Physiology. In: Chapman, R.F. & De Boer, G. (Ed.): *Regulatory mechanisms in insect feeding*. Chapman & Hall, New York: 74-97.
- Richmond, J.E. & Broadie, K.S. (2002): The synaptic vesicle cycle: exocytosis and endocytosis in *Drosophila* and *C. elegans*. *Current Opinion in Neurobiology* 12 (5): 499-507
- Riekkola, M.-L. & Jumppanen, J.H. (1996): Capillary electrophoresis of diuretics. *Journal of Chromatography A* 735: 151-164
- Rietdorf, K., Lang, I. & Walz, B. (2003): Saliva secretion and ionic composition of saliva in the cockroach *Periplaneta americana* after serotonin and dopamine stimulation, and effects of ouabain and bumetamide. *Journal of Insect Physiology* 49: 205-215
- Robb-Gaspers, L.D., Burnett, P., Rutter, G.A., Denton, R.M., Rizzuto, R. & Thomas, A.P. (1998): Integrating cytosolic calcium signals into mitochondrial metabolic responses. *The EMBO Journal* 17 (17): 4987-5000
- Saudou, F. & Hen, R. (1994): 5-Hydroxytryptamine receptor subtypes in vertebrates and invertebrates. *Neurochemistry International* 25 (6): 503-532
- Schildknecht, H., Maschwitz, E. & Maschwitz, U. (1968): Über Arthropodenabwehrstoffe. Die Explosionschemie der Bombardierkäfer (Coleoptera, Carabidae). 3. Isolierung und Charakterisierung der Explosionskatalysatoren. *Zeitschrift für Naturforschung B* 1968 23 (9): 1213-1218
- Schneider, S.W., Sritharan, K.C., Geibel, J.P., Oberleithner, H. & Jena, B.P. (1997): Surface dynamics in living acinar cells imaged by atomic force microscopy: identification of plasma membrane structures involved in exocytosis. *PNAS* 94 (1): 316-321
- Schnepf, E., Wenneis, W. & Schildknecht, H. (1969): Über Arthropoden-Abwehrstoffe. XLI. Zur Explosionschemie der Bombardierkäfer (Coleoptera, Carabidae). IV. Zur Feinstruktur der Pygidialwehrrüden des Bombardierkäfers (*Brachynus crepitans* L.). *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie* 96 (4): 582-599
- Schwartz, J.H. (2001): The many dimensions of cAMP signalling. *PNAS* 98 (24): 13482-13484
- Segawa, A., Terakawa, S., Yamashina, S. & Hopkins, C.R. (1991): Exocytosis in living salivary glands: direct visualization by video-enhanced microscopy and confocal laser microscopy. *European Journal of Cell Biology* 54: 322-330
- Selbie, L.A. & Hill, S.J. (1998): G protein-coupled-receptor cross-talk: the fine-tuning of multiple receptor-signalling pathways. *Trends in Pharmacological Science* 19: 87-93
- Smit, M.J. & Iyengar, R. (1998): Mammalian adenylyl cyclases. In: Cooper, D.M.F. (Ed.) *Advances in second messenger and phosphoprotein research* (32): *Adenylyl cyclases*. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia: 1-21
- Smith, R.K. & House, C.R. (1977): Fluid secretion by isolated cockroach salivary glands. *Experientia* 33 (9): 1182-1184
- Smith, R.K. & House, C.R. (1979): Ion and water transport by isolated cockroach salivary glands. *Journal of Membrane Biology* 51: 325-346
- Smukler, S. R., Tang, L., Wheeler, M. B. & Salapatek, A. M. (2002): Exogenous nitric oxide and endogenous glucose-stimulated beta-cell nitric oxide augment insulin release. *Diabetes* 51 (12): 3450-3460
- Soderling, S.H. & Beavo, J.A. (2000): Regulation of cAMP and cGMP signaling: new phosphodiesterases and new functions. *Current Opinion in Cell Biology* 2: 174-179

- Steyer, J.A., Horstmann, H. & Almers, W. (1997): Transport, docking and exocytosis of single secretory granules in live chromaffin cells. *Nature* 388 (6641): 474-478
- Sutherland, D.J. & Chillseyzn, J.M. (1968): Function and operation of the cockroach salivary gland reservoir. *Journal of Insect Physiology* 14: 21-31
- Tagliaro, F., Manetto, G., Crivellente, F. & Smith, F.P. (1998): A brief introduction into capillary electrophoresis. *Forensic Science International*, 92: 75-88
- Takahashi, A., Camacho, P., Lechleiter, J.D. & Herman, B. (1999): Measurement of intracellular calcium. *Physiological Reviews* 79 (4): 1089-1125
- Terakawa, S., Fan, J.-H., Kumakura, K. & Ohara-Imaizumi, M. (1991): Quantitative analysis of exocytosis directly visualized in living chromaffin cells. *Neuroscience Letters* 123: 82-86
- Thévenod, F. (2002): Ion channels in secretory granules of the pancreas and their role in exocytosis and release of secretory proteins. *American Journal of Physiology* 283 (3): C651-C672
- Thomas, D., Tovey, S.C., Collins, T.J., Bootman, M.D., Berridge, M.J. & Lipp, P. (2000): A comparison of fluorescent  $\text{Ca}^{2+}$  indicator properties and their use in measuring elementary and global  $\text{Ca}^{2+}$  signals. *Cell Calcium* 28 (4): 213-223
- Tinel, H., Cancela, J.M., Mogami, H., Gerasimenko, J.V., Gerasimenko, O.V., Tepikin, A.V. & Petersen, O.H. (1999): Active mitochondria surrounding the pancreatic acinar granule region prevent spreading of inositol trisphosphate-evoked local cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  signals. *The EMBO Journal* 18 (18): 4999-5008
- Tierney, A.J. (2001): Structure and function of invertebrate 5-HT receptors: a review. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 128: 791-804
- Tipsmark, C.K. & Madsen, S.S. (2003): Regulation of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase activity by nitric oxide in the kidney and gill of the brown trout (*Salmo trutta*). *Journal of Experimental Biology* 206 (Pt 9): 1503-1510
- Tse, F.W. & Tse, A. (1999): Regulation of exocytosis via release of  $\text{Ca}^{2+}$  from intracellular stores. *BioEssays* 21 (10): 861-865
- Tsunoda, S., Michikawa, H., Furuyama, S. & Sugiya, H. (2003): Evidence that nitric oxide does not directly contribute to methacholine-induced amylase secretion in rabbit parotid acinar cells. *Pflügers Archiv* [epub ahead of print]
- Turlings, T.C., Loughrin, J.H., McCall, P.J., Rose, U.S., Lewis, W.J. & Tumlinson, J.H. (1995): How caterpillar-damaged plants protect themselves by attracting parasitic wasps. *PNAS* 92 (10): 4169-4174.
- Van Den Brink, G.R., Bloemers, S.M., Van Den Blink, B., Tertoolen, L.G., Van Deventer, S.J. & Peppelenbosch, M.P. (1999): Study of calcium signaling in non-excitable cells. *Microscopy Research and Technique* 46 (6): 418-433
- von Gersdorff, H. & Matthews, G. (1994): Dynamics of synaptic vesicle fusion and membrane retrieval in synaptic terminals. *Nature* 367 (6465): 735-739
- von Gersdorff, H. & Matthews, G. (1999): Electrophysiology of synaptic vesicle cycling. *Annual Review of Physiology* 61: 725-752
- Wäsle, B. & Edwardson, J.M. (2002): The regulation of exocytosis in the pancreatic acinar cell. *Cellular Signalling* 3: 191-197
- Watson, E.L., Singh, J.C. & Jacobson, K.L. (1985): Augmentation of cholinergic-mediated amylase release by forskolin in mouse parotid gland. *Life sciences* 37 (26): 2531-2537
- Watson, E.L., Singh, J.C., Jacobson, K.L. & Ott, S.M. (2001): Nitric oxide inhibition of cAMP synthesis in parotid acini: regulation of type 5/6 adenylyl cyclase. *Cellular Signalling* 13 (10): 755-763

- Whitehead, A.T. (1973): Innervation of the american cockroach salivary gland: Neurophysiological and pharmacological investigations. *Journal of Insect Physiology* 19: 1961-1970
- Wicher, D. (2001): Peptidergic modulation of an insect Na<sup>(+)</sup> current: role of protein kinase A and protein kinase C. *Journal of Neurophysiology* 85 (1): 374-383
- Wieczorek, H., Brown, D., Grinstein, S., Ehrenfeld, J. & Harvey, W.R. (1999): Animal plasma membrane energization by protein-motive V-ATPases. *BioEssays* 21 (8): 637-648
- Wildemann, B. & Bicker, G. (1999): Nitric oxide and cyclic GMP induce vesicle release at *Drosophila* neuromuscular junction. *Journal of Neurobiology* 39 (3): 337-346
- Williams, D.A. (1995): Fluorescence imaging of cytosolic calcium: An introduction to basic experimental principles. In: Kraicer, J. & Dixon, S.J. (Ed.): *Methods in Neurosciences: Measurement and manipulation of intracellular ions*. Academic Press, San Diego: 69-80
- Wirtz, H.P. (1990): Bioamines and proteins in the saliva and salivary glands of Palaearctic blackflies (Diptera: Simuliidae) *Tropical medicine and parasitology* 41 (1): 59-64
- Xu, W. & Marshall, A.T. (1999): X-ray microanalysis of the Malpighian tubules of the black field cricket *Teleogryllus oceanicus*: the roles of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase and the Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup>-cotransporter. *Journal of Insect Physiology* 45 (10): 885-893
- Xu, W. & Marshall, A.T. (2000): Control of ion and fluid transport by putative second messengers in different segments of the Malpighian tubules of the black field cricket *Teleogryllus oceanicus*. *Journal of Insect Physiology* 46 (1): 21-31
- Yago, M.D., Manas, M., Ember, Z. & Singh, J. (2001): Nitric oxide and the pancreas: morphological base and role in the control of the exocrine pancreatic secretion. *Molecular and Cellular Biochemistry* 219: 107-120
- Yago, M.D., Tapia, J.A., Salido, G.M., Adeghate, E., Juma, L.M., Martinez-Victoria, E., Manas, M. & Singh, J. (2002): Effect of sodium nitroprusside and 8-bromo cyclic GMP on nerve-mediated and acetylcholine-evoked secretory responses in the rat pancreas. *British Journal of Pharmacology* 136 (1): 49-56
- Yang, Y., Udayasankar, S., Dunning, J., Chen, P. & Gillis, K.D. (2002): A highly Ca<sup>2+</sup>-sensitive pool of vesicles is regulated by protein kinase C in adrenal chromaffin cells. *PNAS* 99 (26): 17060-17065
- Yeung, E.S. (1999): Study of single cells by using capillary electrophoresis and native fluorescence detection. *Journal of Chromatography A* 830 (2): 243-262
- Yoshimura, K., Fujita-Yoshigaki, J., Murakami, M. & Segawa, A. (2002): Cyclic AMP has distinct effects from Ca<sup>2+</sup> in evoking priming and fusion/exocytosis in parotid amylase secretion. *Pflügers Archiv* 444 (5): 586-596
- Yoshimura, K., Hiramatsu, Y. & Murakami, M. (1998): Cyclic AMP potentiates substance P-induced amylase secretion by augmenting the effect of calcium in the rat parotid acinar cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1402 (2): 171-187
- Yoshimura, K. & Nezu, E. (1991): Dynamic changes in the rate of amylase release induced by various secretagogues examined in isolated rat parotid cells by using column perfusion. *Japanese Journal of Physiology* 41 (3): 443-459
- Yoshimura, K. & Nezu, E. (1992): Interaction between the calcium and cyclic AMP messenger systems in perfused rat parotid acinar cells. Possible mechanism for potentiation of amylase secretion. *Biochemical Pharmacology* 43 (5): 1031-1041
- Yovell, Y., Kandel, E.R., Dudai, Y. & Abrams, T.W. (1992): A quantitative study of the Ca<sup>2+</sup>/calmodulin sensitivity of adenylyl cyclase in *Aplysia*, *Drosophila*, and rat. *Journal of Neurochemistry* 59 (5): 1736-1744

- Yuan, J., Bowman, A.S., Aljamali, M., Payne, M.R., Tucker, J.S., Dillwith, J.W., Essenberg, R.C. & Sauer, J.R. (2000): Prostaglandin E<sub>2</sub>-stimulated secretion of protein in the salivary glands of lone star tick via a phosphoinositide signaling pathway. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 30: 1099-1106
- Zaccolo, M., Magalhaes, P. & Pozzan, T. (2002): Compartmentalisation of cAMP and Ca<sup>2+</sup> signals. *Current Opinion in Cell Biology* 14 (2): 160-166
- Zenisek, D., Steyer, J.A. & Almers, W. (2000): Transport, capture and exocytosis of single synaptic vesicles at active zones. *Nature* 406 (6798): 849-854
- Zhu, H., Hille, B. & Xu, T. (2002): Sensitization of regulated exocytosis by protein kinase C. *PNAS* 99 (26): 17055-17059
- Ziegler, A. & Scholz, F.H.E. (1997): The ionic hemolymph composition of the terrestrial isopod *Porcellio scaber* Latr. during molt. *Comparative Biochemistry and Physiology B* 167: 536-542
- Zimmermann, B. (2000): Subcellular organization of agonist-evoked Ca<sup>2+</sup>-waves in the blowfly salivary gland. *Cell Calcium* 27 (5): 297-307
- Zimmermann, B. (2000): Control of InsP<sub>3</sub>-induced Ca<sup>2+</sup> oscillations in permeabilized blowfly salivary gland cells: contribution of mitochondria. *Journal of Physiology* 525 (3): 707-719
- Zucker, R.S. (1996): Exocytosis: a molecular and physiological perspective. *Neuron* 17 (6): 1049-1055



## 7. Danksagung

Am Ende dieser arbeitsreichen Jahre danke ich:

Herrn Prof. Walz für die spontane und freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe Zoophysiologie an der Universität Potsdam. Er war immer ansprechbar für Fragen und Probleme, hat mir gelegentliche Fehler nicht übel genommen, sondern die Möglichkeit gegeben, sie auszubaden und daraus zu lernen. Unter seiner wissenschaftlichen Begleitung konnte ich selbstständig arbeiten. Seine enorme Geduld, mit mir zusammen an meinen "Textentwürfen" zu feilen, hat mir gut getan.

Herrn Dr. Ingo Lang für die Einführung ins Labor: in physiologisches Arbeiten und "Denken".

Herrn Dr. Wolfgang Blenau für Gespräche, die über die eigentliche Arbeit hinaus bis in die Zeit nach der Dissertation reichten.

Allen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für das angenehme Arbeitsklima und gut organisierte Labor.

Außerdem Frau Rudolf für ihre sehr hilfreichen bibliothekarischen Dienste.

Frau Prof. Zerbst für die uneingeschränkte Möglichkeit, die CE-Analysen im Labor ihrer Arbeitsgruppe Stoffwechsel- und Systemphysiologie an der FU Berlin durchzuführen. Für die interessierte Anteilnahme bei gemeinsamen Tagungsbesuchen und für die Übernahme eines Gutachtens dieser Dissertation.

Herrn Dr. Torsten Grospietsch für die geduldige Einführung in die CE, Frau Anita Johannsen für die Unterstützung bei den Messungen und Herrn Dr. Jürgen Gross für intensive Diskussionen im Zusammenhang mit dieser Arbeit, die auch über die fachliche Ebene hinausgingen.

Herrn Prof. Hannes Steidle und Herrn Dr. Torsten Meiners für die Hilfe bei der statistischen Auswertung meiner Experimente.

Den Mitgliedern des Graduiertenkollegs "Signalketten in lebenden Systemen" für meine Aufnahme und die fröhliche Gemeinschaft. Der DFG für das Stipendium im Rahmen des Graduiertenkollegs.

Herrn Dr. Iglisch vom Umweltbundesamt Berlin für die Überlassung von Schaben, als es Probleme mit der Zucht gab.

Meiner Mutter für ihre unablässige Fürsorge und Anteilnahme; Gerti und vor allem Lutz für all ihre Unterstützung.





## 8. Anhang

### 8.1 Liste der verwendeten Abkürzungen

Tab. A1: Liste der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Abkürzungen

5-HT	Serotonin, 5-Hydroxytryptamin
18-Kronen-6-Ether	(2R,3R,11R,12R)-1,4,7,10,13,16-Hexaoxacyclooctadecane-2,3,11,12-tetracarboxylicacid
AC	Adenylatcyclase
$\alpha$ -HIBA	2-Hydroxybuttersäure
AM-Ester	Acetoxymethyl-Ester
ATP	Adenosin 5'-Triphosphat
BSA	Bovine Serum Albumin
cAMP	Adenosin 3':5'- cyclisches Monophosphat
cGMP	Guanosin 3':5'- cyclisches Monophosphat
CAP <sub>2b</sub>	Cardioacceleratory Peptide 2b
CCD-Kamera	charged coupled device Kamera
CE	Kapillarelektrophoretische Analyse
C-Zellen	Zentrale Zellen (in der Speicheldrüse von <i>P. americana</i> )
DA	Dopamin, 3-Hydroxytyramin
db cAMP	Dibutyryl cAMP
db cGMP	Dibutyryl cAMP
DIK	Differentieller Interferenzkontrast
DMSO	Dimethylsulfoxid
DUM-Neurone	Dorsal Unpaired Median-Neurone
ER	Endoplasmatisches Reticulum
EtOH	Ethanol
FAD <sup>+</sup>	Oxydiertes Flavin-Adenin-Nucleotid
FICRhR	Fluorescein-labeled Catalytic and Rhodamine labeled Regulatory subunit - cAMP-sensitiver Fluoreszenzfarbstoff
FMN <sup>+</sup>	Oxydiertes Flavin-Mono-Nucleotid
IP <sub>3</sub>	Inositol Trisphosphat
IBMX	3-Isobutyl-1-Methylxanthin
MW	Mittelwert
MDL 12,330 A (= RMI 12,330 A)	cis-N-(2-Phenylcyclopentyl)azacyclotridec-1-en-2-amin
MQ H <sub>2</sub> O	Doppelt destilliertes Wasser
n.A.	numerische Apertur
NAD(P)H	Reduziertes Nicotin-Adenin-Dinucleotid-(Phosphat)
NKCC	Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -2Cl <sup>-</sup> -Cotransporter

NO	Stickstoffmonoxid
NSZ	Neurosekretorische Zellen
OFM-Anion-BT	Osmotic Flow Modifier
p.A.	pars analysi
PDE	Phosphodiesterase
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E2
PKC / PKA	Protein Kinase C / Protein Kinase A
P-Zellen	Periphere Zellen (in der Speicheldrüse von <i>P. americana</i> )
SD	Standardabweichung
SE	Standardfehler
SNP	Sodium Nitroprussid
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

## **8.2 Liste der Händler, bei denen Chemikalien und Laborwaren bezogen wurden**

**Tab. A2: Liste der Händler, bei denen Chemikalien und Laborwaren bezogen wurden.**

<b>Händler</b>	<b>Ort</b>	<b>Land</b>	<b>Bezug von</b>
Aldrich	Taufkirchen	Deutschland	Chemikalien für CE-Puffer
Alexis	Grünberg	Deutschland	div. Chemikalien
Becton & Dickinson	Heidelberg	Deutschland	Cell-Tak Gewebeklebstoff
Biotium	Hayward, CA	USA	FURA-2 AM
Diagnostic products corporation	Los Angeles, CA	USA	Mikrotiterplatten Lesegerät
Drawin Vertriebs-GmbH	Ottobrunn / Riemerling	Deutschland	Sylgard
GROM Analytik + HPLC GmbH	Rottenburg-Hailfingen	Deutschland	Kapillaren für CE
Hamamatsu	Herrsching	Deutschland	Bildbearbeitungssystem
Leitz	Wetzlar	Deutschland	Optische Geräte
Millipore	Eschborn / Milford, MA	Deutschland / USA	Filter für CE
Molecular Probes	Eugene, OR	USA	FURA-2 AM
Princeton Instruments Inc.	Trenton, NJ	USA	CCD Kamera
Roth	Karlsruhe	Deutschland	Mikrotiterplatten, Roti-Nanoquant Reagenz, Albumin perletiert, div. Chemikalien
Satorius	Göttingen	Deutschland	Feinwaage
SciLab GmbH	Hamburg	Deutschland	Software "XACT"
SERVA Electrophoresis GmbH	Heidelberg	Deutschland	div. Chemikalien
Sigma	Deisenhofen	Deutschland	div. Chemikalien
Ssniff Spezialdiäten GmbH	Soest	Deutschland	Ratten- und Mäusepellets

<b>Händler</b>	<b>Ort</b>	<b>Land</b>	<b>Bezug von</b>
Statsoft Inc.	Tulsa, OK	USA	Software "Statistica"
True Spectra Inc.	North York, ON	Canada	Software "PhotoGraphics Pro"
Universal Imaging Corporation	Downingtown, PA	USA	Software "MetaMorph" und "MetaFluor"
Ushio	Martinsried	Deutschland	Xenon-Kurzbogenlampen
VisiTron Systems GmbH	Puchheim	Deutschland	Bilddaufnahme-Software und Steuerung des Imaging-Setup
Waters	Milford, MA	USA	CE, Chemikalien für CE-Puffer
Zeiss	Jena	Deutschland	Optische Geräte

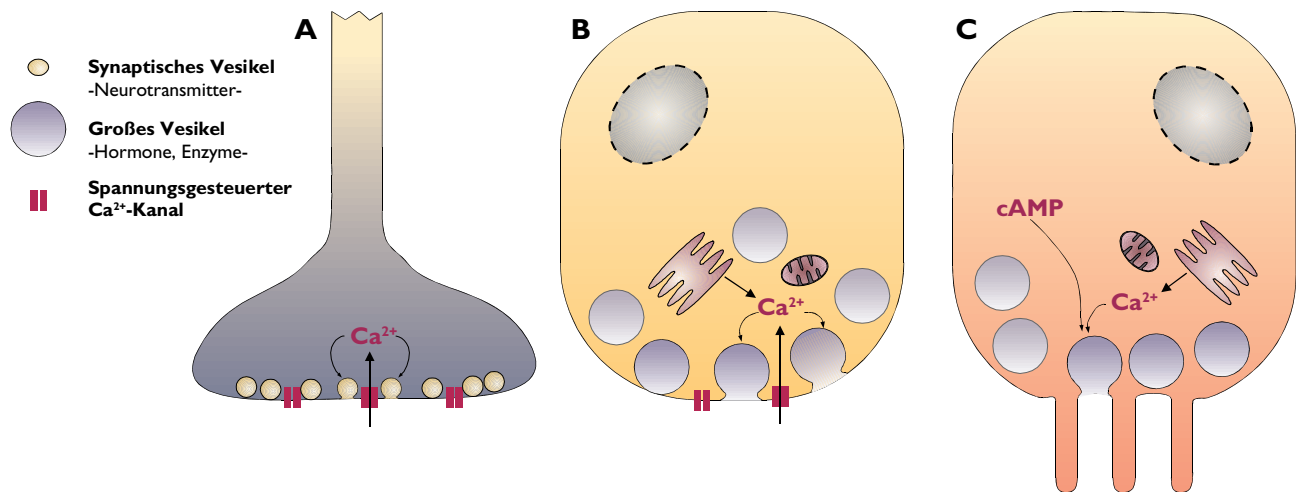
## **8.3 Weitergehende theoretische Hintergründe zu den Inhalten dieser Arbeit**

### **8.3.1 Wesentlichen Mechanismen der Exocytose: ein kurzer Überblick**

Bei der Proteinsekretion wird der Inhalt sekretorischer Vesikel über Exocytosen abgegeben, z. B. Verdauungsenzyme in Zellen von Speicheldrüsen. Während der Exocytose verschmelzen Vesikel- und Plasmamembran miteinander, so daß ein kontinuierlicher Übergang von Vesikellumen und Extrazellularraum entsteht, durch den der Inhalt des Vesikels abgegeben wird (Lin & Scheller, 2000; Thévenod, 2002). In allen Zellen findet die konstitutive Exocytose statt, welche dem Einbau neu synthetisierter Bestandteile in die Plasmamembran dient. Dagegen findet die regulierte Exocytose nur in spezialisierten sekretorischen Zellen statt. Sie dient der Abgabe von z.B. Neurotransmittern, Hormonen oder Verdauungsenzymen (Alberts et al., 1994, Lin & Scheller, 2000). An diesen sekretorischen Zellen, wie z .B. Nervenzellen, Chromaffinzellen, Mastzellen, Speicheldrüsenzellen oder Pankreas-Acinuszellen, wird die Erregungs-Sekretions-Kopplung intensiv untersucht. Die spezialisierten sekretorischen Zellen werden in zwei Gruppen unterteilt: die erregbaren und die nicht-erregbaren Zellen. Beide Gruppen unterscheiden hauptsächlich sich durch die Art des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms nach der Stimulation. In erregbaren Zellen erfolgt der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom nach einer Depolarisation der Basolateralmembran, wohingegen in nicht-erregbaren Zellen andere Mechanismen den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom auslösen. Jedoch gibt es auch viele Zellen, die nicht eindeutig in eine der beiden Gruppen eingeordnet werden können (van den Brink et al., 1999).

Bezüglich der Aktivierung von Exocytosen unterscheiden sich erregbare und nicht-erregbare Zellen vor allem in folgenden Punkten: in erregbaren Zellen findet die Exocytose sehr schnell statt und wird hauptsächlich durch eine Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration nach Depolarisation der Zellmembran aktiviert. Dagegen verläuft die Exocytose in nicht-erregbaren Zellen um ein Vielfaches langsamer. Sofern sich das Membranpotential ändert, findet eher eine Hyperpolarisation der Basolateralmembran statt, welche einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom aktiviert bzw. mit diesem einhergeht. Der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom kann in nicht-erregbaren Zellen aber auch unabhängig von einer Änderung des Membranpotentials erfolgen (Matthews et al., 1989). Neben  $\text{Ca}^{2+}$  wird die Geschwindigkeit der Exocytose auch stark von anderen intrazellulären Botenstoffen, wie z. B. cAMP, beeinflusst (Penner & Neher, 1989; Hille et al., 1999). So wird z. B. in Parotis-Speicheldrüsenzellen die Exocytose direkt durch eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration aktiviert (Quisell & Tabak, 1989; Fujita-Yoshigaki, 1998). Bedeutende Aspekte, in denen sich die Exocytose erregbarer und nicht-erregbarer Zellen unterscheidet, sind in Abb. A1 illustriert.

Obwohl wichtige Teilmechanismen der Erregungs-Sekretions-Kopplung in einigen Zelltypen gut charakterisiert sind, fehlen jedoch häufig Informationen über die Zielmoleküle der beteiligten Botenstoffe und die Kenntnis darüber, auf welche Weise die verschiedenen Signalwege sich wechselseitig beeinflussen (Artalejo et al., 1996; Yoshimura et al., 2002).



### Abb. A 1: Unterschiede der Exocytose in erregbaren und nicht-erregbaren Zellen.

In **A** ist die Exocytose erregbarer Zellen am Beispiel einer Synapse dargestellt. Die mit Transmittern gefüllten synaptischen Vesikel haben einen geringen Durchmesser (ca. 50 nm). Um fusionsbereit zu werden, haben die Vesikel mehrere Schritte durchlaufen: sie haben an der Membran "angedockt", wurden in einem ATP-abhängigen Schritt kompetent für die Exocytose gemacht ("priming") und sind dann fusionsbereit. Diese Vesikel sind an aktiven Zonen der Zellmembran lokalisiert, in direkter Nähe spannungsgesteuerter  $Ca^{2+}$ -Kanäle. Diese Kanäle öffnen sich nach einer Depolarisation der Zellmembran, so daß die intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Konzentration schnell und lokal sehr stark ansteigt. Die Gesamtdauer der Exocytose beträgt meist weniger als 1 ms (Zucker, 1996; Neher, 1998; Lin & Scheller, 2000).

In **B** ist die Exocytose (neurosekretorischer) endokriner Zellen, z.B. Chromaffinzellen oder Pankreas- $\beta$ -Zellen, dargestellt, bei denen es sich ebenfalls um erregbare Zellen handelt. Die fusionsbereiten Vesikel enthalten Hormone und liegen in direkter Nähe spannungsgesteuerter  $Ca^{2+}$ -Kanäle an der Zellmembran. Es kommt ebenfalls zu einem  $Ca^{2+}$ -Einstrom nach einer Depolarisation des basolateralen Membranpotentials, außerdem wird  $Ca^{2+}$  aus intrazellulären Speichern, z. B. dem ER, freigesetzt. Die Exocytosen haben eine längere Latenzzeit als die in Synapsen, mit Zeitkonstanten von 30 ms und 2 Sek. in Chromaffinzellen sowie 0,9 und 9 Sek. in Pankreas- $\beta$ -Zellen (Kasai, 1999).

In **C** ist die Exocytose exokriner Drüsenzellen (z. B. Speicheldrüsen- oder Pankreas-Acinuszellen) zusammengefaßt. Dabei handelt es sich um nicht-erregbare Zellen. Die zur Exocytose bereiten sekretorischen Vesikel befinden sich am apikalen Zellpol, sie haben mit 700 - 800 nm einen größeren Durchmesser als die synaptischen Vesikel (Fujita-Yoshigaki, 1998). Außerdem können sich dort  $Ca^{2+}$ -Speicher befinden, z. B. das ER oder Mitochondrien. Das Zusammenspiel dieser Organellen kann die Art des  $Ca^{2+}$ -Signals (lokal oder global, oszillierender oder transientser Anstieg) bestimmen (Tinel et al., 1999). Nach der Aktivierung eines Rezeptors, wird in der Zelle die Konzentration von Botenstoffen, z. B.  $Ca^{2+}$  oder cAMP, erhöht und die Exocytose ausgelöst (Hille et al., 1999). In den meisten nicht-erregbaren Zellen löst die Erhöhung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration die Exocytose aus. Daneben kann sie mit geringerer Geschwindigkeit in vielen Zellen auch ohne begleitende Erhöhung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration aktiviert werden. Eine derartige  $Ca^{2+}$ -unabhängige Exocytose wurde in mehreren Zelltypen gezeigt: von Neher (1988) an Mastzellen nach direkter Aktivierung von G-Proteinen, von Koh et al. (2000) an Pankreas-Gangzellen nach Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration oder Aktivierung einer Protein Kinase C sowie von Yoshimura et al. (1998) an Parotis-Drüsenzellen nach Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration. Eine Zusammenfassung zu diesem Thema geben Hille et al. (1999). Für Parotis-Drüsenzellen nimmt Fujita-Yoshigaki (1998) an, daß die Vesikel nicht an der Membran angedockt sind, bevor die Exocytose aktiviert wird. Das "Andocken" an die Membran verläuft cAMP-abhängig, weshalb dies der bedeutende Botenstoff für die Aktivierung der Exocytose ist und  $Ca^{2+}$  nur verstärkend auf die Fusion wirkt. In anderen exokrinen Drüsenzellen, wie z.B. den Pankreas-Acinuszellen, wird die Exocytose durch einen Anstieg der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration ausgelöst, und die Funktion der anderen Signalwege wird in der Modulation und Verstärkung der  $Ca^{2+}$ -abhängigen Exocytose gesehen (Brose & Neher, 2002). Die Exocytose in nicht-erregbaren Zellen setzt erst im Sekundenbereich (bis > 10 Sek.) nach Aktivierung des Rezeptors ein (Ninomiya et al., 1997, Kasai, 1999).

### **8.3.2 Methoden, mit denen die Exocytose untersucht werden kann: ein kurzer Überblick**

Die Exocytose kann prinzipiell mit einer Vielzahl verschiedener Methoden untersucht werden, die ihre spezifischen Vor- und Nachteile haben und in der Regel nicht in allen Präparaten angewandt werden können.

#### **8.3.2.1 Biochemische Methoden**

##### **a) Bestimmung des Gewichts oder der Konzentration der abgegebenen Proteine.**

Die gelösten Proteine werden gefärbt und die Lichtabsorption gemessen (Bradford, 1976; Carpenter et al., 2000). Diese Methode ermöglicht eine Quantifizierung der Proteinsekretion. Es werden dafür relativ große Mengen an Proteinen benötigt (in den von mir durchgeführten Versuchen > 500 ng); die Folge ist leider ein relativ schlechtes zeitliches Auflösungsvermögen.

##### **b) Bestimmung des Molekulargewichts der abgegebenen Proteine**

Eine Auftrennung der Proteine durch Gelelektrophorese bringt Aufschluß über ihr Molekulargewicht. Zur Identifizierung kann zum Beispiel eine passende Antikörperfärbung eingesetzt werden. Eine Quantifizierung ist nur eingeschränkt möglich.

##### **c) Messung der Enzymaktivität sezernierter Proteine**

Diese Methode kann nur angewendet werden, wenn es sich um Enzym-sezernierende Gewebe, wie z.B. Speicheldrüsen, handelt. In deren Sekret kann z. B. die Amylaseaktivität gemessen und so die Amylasesekretion quantifiziert werden (Yoshimura & Nezu, 1991; Yoshimura et al., 2002). Für diese Messung werden ebenfalls größere Mengen sezernierter Proteine und eine entsprechend große Anzahl an Zellen benötigt. Auch hier ist das zeitliche Auflösungsvermögen gering. Für die bei größeren Geweben nötige Perfusion muß eine aufwendige Präparation erfolgen, die nicht mit allen Geweben durchzuführen ist.

#### **8.3.2.2 Mikroskopische Methoden**

##### **a) Vitalmikroskopische Beobachtung ungefärbter Vesikel**

Terakawa et al. (1991) haben eine Methode beschrieben, mit der die Exocytose ungefärbter Vesikel in Gewebeschnitten oder Einzelzellen mit videoverstärkter differentieller Interferenzkontrast-Mikroskopie (DIK-Mikroskopie) während der Stimulierung beobachtet werden kann. Die Vesikel und das umgebende Cytoplasma haben unterschiedliche Brechungsindices. Deshalb kommt es bei der Exocytose zu einer plötzlichen Änderung der Helligkeit des fusionierenden Vesikels (Ishihara et al., 2000a,b). Durch die Subtraktion sequentiell aufgenommener Bilder können die Stellen, an denen ein Vesikel abgegeben wurde, sichtbar gemacht werden. Die Vorteile der Methode sind, (1) daß sie bei Verwendung von mechanisch zerkleinerten Gewebestückchen ohne Substanzen auskommt, welche die Signalübertragung in den Zellen beeinflussen könnten (z.B. Fluoreszenzfarbstoff-

fe oder zur Dissoziation der Zellen verwendete Enzyme; Ishihara et al., 2000a,b) und (2) ihre gute zeitliche Auflösung (Segawa et al., 1991). Nachteile sind: (1) Artefakte in den Differenzbildern aufgrund von Bewegungen oder Volumenänderungen der Zellen und (2) keine Aussage darüber, ob möglich ist, ob ein Vesikel exocytiert wurde oder sich von der Zellmembran wieder ins Innere der Zelle bewegt hat.

#### b) Beobachtung mit Fluoreszenzfarbstoffen gefärbter Vesikel

Saure Organellen, wie Lysosomen, Mitochondrien oder viele sekretorische Vesikel, werden durch Farbstoffe mit einem leicht basischen pH-Wert angefärbt. Zu diesen Farbstoffen gehören Acridinorange, Quinacrin oder LysoTracker (Haller et al., 1998; Campos-Toimil et al., 2000; Holroyd et al., 2002). Die Abgabe der Vesikel kann z.B. im confocalen Mikroskop beobachtet werden. Durch Verwendung der totalen-internen Reflektionsmikroskopie ("Evanescent-wavelength microscopy") wird es ermöglicht, die Richtung der Bewegung einzelner Vesikel in direkter Nähe der Zellmembran und die Exocytose der Vesikel zu beobachten (Steyer et al., 1997 an Chromaffinzellen; Zenisek et al., 2000 an Synapsen).

#### c) Beobachtung des Membran-turnovers nach Färbung der Membran mit Fluoreszenzfarbstoffen

Membranfarbstoffe wie FM1-43 oder FM1-20 lagern sich in die äußere Zellmembran ein. Nach der Färbung endocytisierte Vesikel haben eine gefärbte Membran, die auch bei Auswaschen des Farbstoffs aus der Zellmembran erhalten bleibt. Exocytosen der gefärbten Vesikel können im Mikroskop registriert werden (Guatimosim & von Gersdorff, 2002). Mit dieser Methode werden vorwiegend Exocytosen an Synapsen analysiert (Betz & Bewick, 1992; reviewed in Betz & Angleson, 1998, Kjaerulff et al., 2002). Durch komplexere Ansätze können jedoch auch Exo- und Endocytosen getrennt voneinander beobachtet werden (Abenavoli et al., 2001). Diese Methode ist in Zellen anwendbar, in denen es einen relativ schnellen Endo-Exocytose-Zyklus gibt. Dieses ist in nicht-erregbaren Zellen mit großem Vesikelvorrat, wie den C-Zellen der Schabenspeicheldrüse, nicht der Fall.

#### d) Direkte Beobachtung der Zellmembran-Oberfläche (Atomic Force Microscopy)

Mit der "atomic force microscopy" kann die Struktur von Oberflächen im nm-Bereich aufgelöst und ihre Elastizität gemessen werden. Dafür wird die Zelloberfläche mit einer Silikon-Elektrode abgetastet (Fisher et al., 1999). Diese Methode eignet sich auch für die Anwendung an lebenden (isolierten) Zellen. Indem die Oberfläche der Zellmembran vor Beginn einer Stimulierung mit der Oberfläche während der Stimulierung verglichen wird, können an der Exocytose beteiligte Strukturen identifiziert werden. In Pankreas-Acinuszellen (Schneider et al., 1997) sowie Chromaffinzellen (Cho et al., 2002) wurden Vertiefungen in der Zellmembran gefunden (sogenannte "pits"), in denen jeweils mehrere kleinere Vertiefungen lagen (sogenannte "depressions"). Bei Stimulierung nimmt die Größe der kleineren Vertiefungen zu. Daraus wurde geschlossen, daß es sich bei den "depressions" um die Fusionsporen handelt.

### **8.3.2.3 Elektrophysiologische Methoden**

#### **a) Messung der Membrankapazität ("patch-clamp" Messungen)**

Während der Exocytose verschmelzen Vesikel- und Zellmembran, so daß die Fläche der Zellmembran zunimmt. Die Fusion einzelner Vesikel kann in "patch-clamp"-Messungen als stufenförmiger Anstieg der Membrankapazität gemessen werden. Durch Endocytosen wird die Membranfläche verringert, die gemessene Membrankapazität nimmt schrittweise ab. Während eines Gleichgewichts von Exo- und Endocytosen wird keine Änderung der Membrankapazität gemessen. Diese Methode ergibt ein sehr gutes zeitliches Auflösungsvermögen. Mit ihr kann nicht zwischen der Exocytose unterschiedlicher Vesikeltypen unterschieden werden, ihre Anwendung ist nur an isolierten Zellen möglich (Neher & Marty, 1982; Neher, 1992; von Gersdorff & Matthews, 1999).

#### **b) Amperometrische Messung der Exocytose**

Mit Carbonfaserelektroden kann die Freisetzung leicht oxidierbarer Substanzen (z. B. die Catecholamin-Sekretion aus Chromaffinzellen) in einer sehr guten zeitlichen und räumlichen Auflösung analysiert werden (Leszczyszyn et al., 1990, 1991). Die Vorteile beider elektrophysiologischer Methoden können kombiniert angewendet werden, indem die Carbonfaserelektrode der amperometrischen Methode in eine "patch"-Elektrode integriert wird (Albillos et al., 1997). Indem man Vesikel mit DA oder 5-HT belädt (Koh et al., 2000), können amperometrische Messungen auch an Zellen durchgeführt werden, die selber keine catecholaminhaltigen Vesikel besitzen. Eine Voraussetzung dafür ist aber, daß die Exocytose in diesen Zellen nicht durch diese Substanzen stimuliert wird, wie es in der Schabensspeicheldrüse der Fall ist.

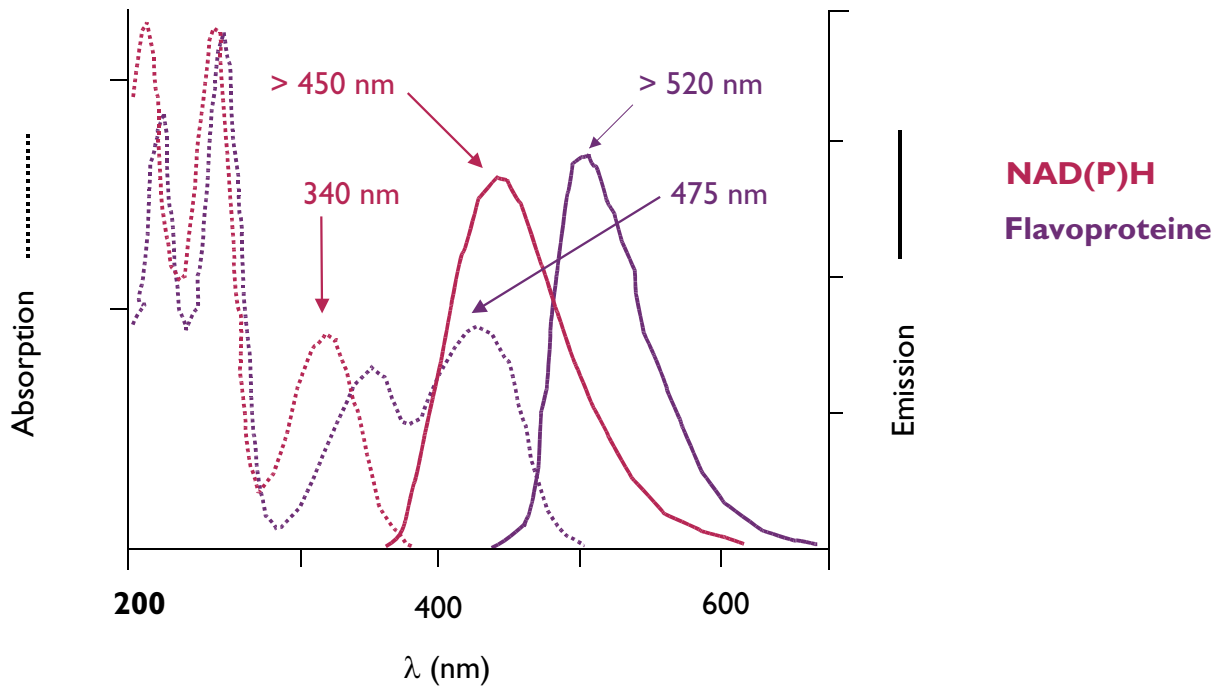
### **8.3.2.3 Weitere Methoden**

#### **Kapillarelektrophoretische Analyse der Exocytose**

Mit Hilfe der Kapillarelektrophorese kann die Exocytose einzelner Vesikel aus isolierten Zellen gemessen werden. Dafür werden einzelne Zellen in die Kapillare aufgenommen und anschließend in der Kapillare stimuliert. Dann wird der CE-Lauf gestartet, so daß die Auftrennung der sezernierten Substanzen beginnt. Entsprechende Messungen wurden z. B. für Pankreas- $\beta$ -Zellen und Mastzellen durchgeführt. Es kann nicht nur die absolute Menge abgegebener Substanzen quantifiziert werden, sondern auch ihr relativer Anteil am gesamten Gehalt in der Zelle. Dafür wird nach Beginn des CE-Laufs die Zellmembran aufgelöst, so daß sämtliche Substanzen aus der Zelle freigesetzt werden. Sofern diese Substanzen unter den angewandten Meßbedingungen analysiert werden können, wird ihre Konzentration quantifiziert. Mit dieser Methode wird ein gutes zeitliches Auflösungsvermögen erreicht (im Sub-Sekunden-Bereich) und mit ihr kann bei geeigneten Zellen die Exocytose einzelner Vesikel gemessen werden (Yeung, 1999).



### 8.3.3 Absorptions- und Emissionsspektren von NAD(P)H und Flavoproteinen



**Abb. A2: Absorptions- und Emissionsspektren von NAD(P)H und Flavoproteinen.** Beide an der Atmungskette beteiligten Gruppen von Coenzymen haben mehrere Absorptionsmaxima. Diese liegen einerseits im kürzerwelligen Bereich  $< 300$  nm. NAD(P)H hat ein Absorptionsmaximum bei 340 nm (gestrichelte rote Linie), und kann in diesem Bereich (relativ) selektiv angeregt werden. Dagegen lassen sich die Flavoproteine selektiv im längerwelligen Bereich, bei 475 nm anregen (gestrichelte blaue Linie). Das Emissionsmaximum von NAD(P)H liegt bei ca. 450 nm (rote Linie), während das der Flavoproteine bei ca. 520 nm liegt (blaue Linie). Spektren nach verändert.

## 8.4 Weitere Ergebnisse

### 8.4.1 Mikrofluorometrische Messungen der $Ca^{2+}$ -Konzentration und Autofluoreszenz

**Tab. A3: DA-stimulierte Änderung der "Ratio"** in den Zellen der Acini und Ausführgänge einer Fura-2 beladenen. Angegeben ist für verschiedene Zeitpunkte des Experiments die "Ratio" der Fluoreszenz (340 / 380 nm), normalisiert auf die Fluoreszenz der unstimulierten Drüse (MW  $\pm$  SD, n=6).

	Acinus		Gang	
	absoluter Wert	(%)	absoluter Wert	(%)
vor Beginn der DA-Stimulierung	0,7 $\pm$ 0,04	0 $\pm$ 0	0,7 $\pm$ 0,05	0,0 $\pm$ 0,0
Maximum DA-Stimulierung	0,8 $\pm$ 0,07	14 $\pm$ 9	1,1 $\pm$ 0,30	43 $\pm$ 47
Ende DA-Stimulierung	0,8 $\pm$ 0,08	13 $\pm$ 10	1,1 $\pm$ 0,28	39 $\pm$ 43
Minimum Ringer	0,8 $\pm$ 0,10	9 $\pm$ 12	0,9 $\pm$ 0,21	23 $\pm$ 34
vor Ionomycin-Applikation	0,8 $\pm$ 0,15	13 $\pm$ 17	0,9 $\pm$ 0,21	24 $\pm$ 33
Maximum Ionomycin	1,1 $\pm$ 0,27	46 $\pm$ 34	1,1 $\pm$ 0,24	45 $\pm$ 40

**Tab. A4: Änderung der Autofluoreszenz in den Zellen der Acini.** Es wurden die Änderungen der Autofluoreszenz unter den Bedingungen einer Messung mit Fura-2 (Anregungswellenlängen 340 und 380 nm, Belichtungszeit 200 ms) aufgenommen. Angegeben ist die "Ratio" der Fluoreszenz von 340/380 nm, jeweils als absolute Werte und normalisiert auf die Fluoreszenz vor der Stimulierung (MW  $\pm$  SD, n=8).

	Absolute Änderung der "Ratio"	Relative Änderung der "Ratio" (%)
vor DA	0,873 $\pm$ 0,02	0 $\pm$ 0
Maximum DA-Stimulierung	0,893 $\pm$ 0,02	2,3 $\pm$ 1,1
Ende DA-Stimulierung	0,882 $\pm$ 0,02	1,0 $\pm$ 0,9
Minimum Ringer	0,871 $\pm$ 0,01	-0,2 $\pm$ 1,1
direkt vor 5-HT-Stimulierung	0,872 $\pm$ 0,01	-0,1 $\pm$ 1,0
Maximum 5-HT-Stimulierung	0,872 $\pm$ 0,01	-0,2 $\pm$ 1,1
Ende 5-HT-Stimulierung	0,869 $\pm$ 0,01	-0,5 $\pm$ 0,9

**Tab. A5: Änderungen der Autofluoreszenz in den Zellen der Acini und Ausführungsgänge bei spezifischer Anregung von NAD(P)H und FAD<sup>+</sup>.** Angegeben ist die "Ratio" der Fluoreszenz (340 / 475 nm) zu verschiedenen Zeitpunkten des Experiments. Die NAD(P)H-Fluoreszenz wird bei 340 nm angeregt, die FAD<sup>+</sup>-Fluoreszenz bei 475 nm. Die Änderungen der "Ratio" zu verschiedenen Zeiten während einer DA- und 5-HT-Stimulierung (jeweils 1  $\mu$ M) sind jeweils als absolute Werte und normalisiert auf die Fluoreszenz vor Beginn der Stimulierung angegeben (MW  $\pm$  SD, n=7).

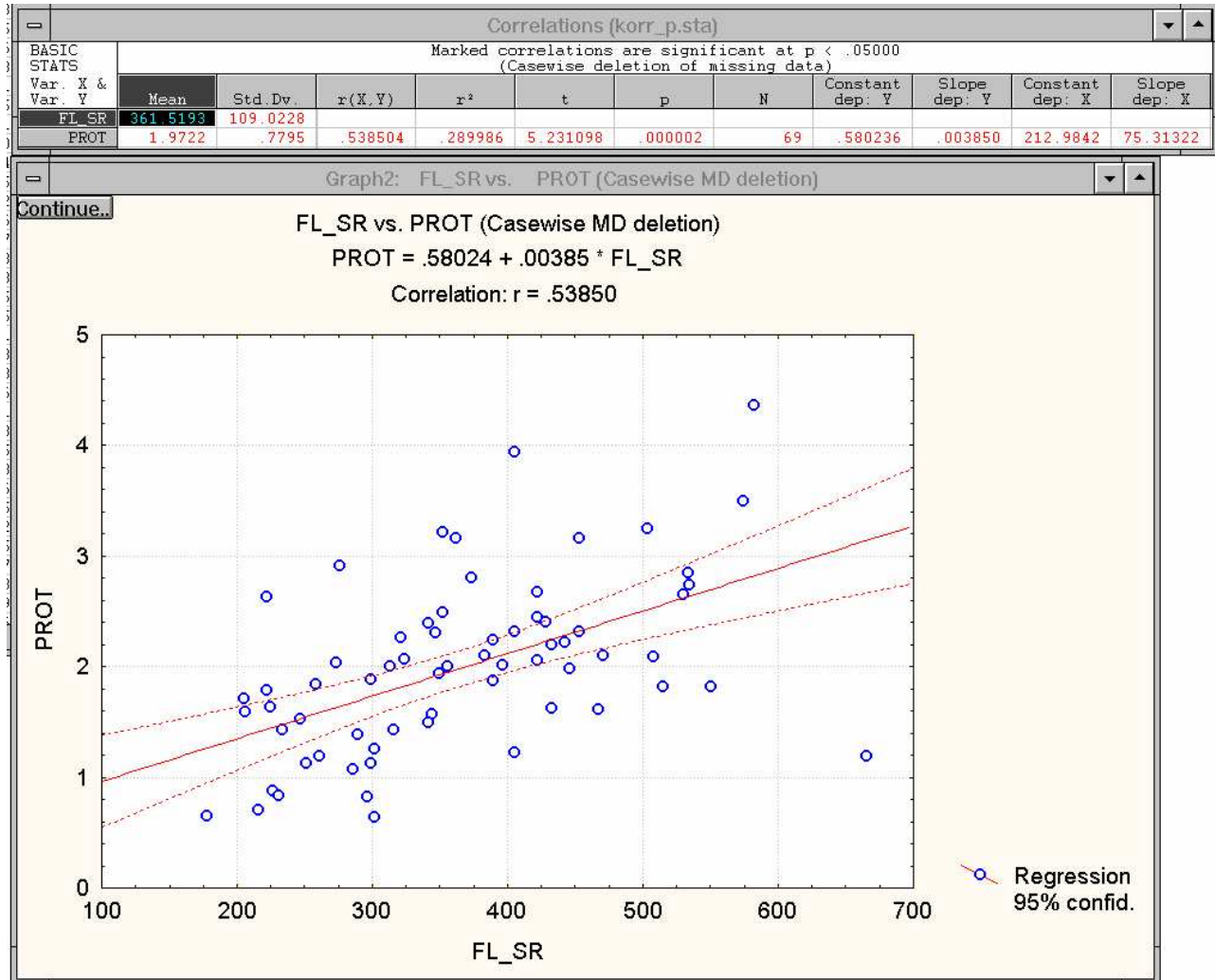
	Acinus		Gang	
	absoluter Wert	(%)	absoluter Wert	(%)
vor Beginn der DA-Stimulierung	0,853 $\pm$ 0,04	0 $\pm$ 0	0,840 $\pm$ 0,05	0 $\pm$ 0
Maximum DA-Stimulierung	0,908 $\pm$ 0,04	6,6 $\pm$ 3,9	0,910 $\pm$ 0,04	8,5 $\pm$ 4,1
Ende DA-Stimulierung	0,889 $\pm$ 0,05	4,3 $\pm$ 3,5	0,880 $\pm$ 0,06	4,9 $\pm$ 3,5
Minimum Ringer	0,856 $\pm$ 0,03	0,5 $\pm$ 1,0	0,844 $\pm$ 0,04	0,6 $\pm$ 2,5
vor 5-HT Stimulierung	0,860 $\pm$ 0,03	0,9 $\pm$ 1,2	0,853 $\pm$ 0,04	1,7 $\pm$ 3,2
Maximum 5-HT Stimulierung	0,869 $\pm$ 0,04	1,9 $\pm$ 1,9	0,862 $\pm$ 0,04	2,7 $\pm$ 2,2
Ende 5-HT Stimulierung	0,860 $\pm$ 0,03	0,9 $\pm$ 2,3	0,848 $\pm$ 0,04	1,1 $\pm$ 2,4

#### **8.4.2 Proteinsekretion**

**Tab. A6: Proteinsekretion bei Stimulierung mit verschiedenen 5-HT Konzentrationen.** Angegeben sind MW  $\pm$  SD der maximalen Proteinsekretion als absolute Werte ( $\mu$ g/min) sowie normalisiert auf die maximale Proteinsekretion während einer vorangegangenen Stimulierung mit 1  $\mu$ M 5-HT. In allen Experimenten fand eine Hintergrundstimulierung mit 1  $\mu$ M DA statt.

	absoluter Wert	(%)	n
10 <sup>-9</sup> M 5-HT	0	0	6
10 <sup>-8</sup> M 5-HT	0	0	5
3 x 10 <sup>-7</sup> M 5-HT	0,1 $\pm$ 0,2	2 $\pm$ 5	5
7 x 10 <sup>-7</sup> M 5-HT	0,4 $\pm$ 0,3	14 $\pm$ 9	8
10 <sup>-7</sup> M 5-HT	0,3 $\pm$ 0,1	13 $\pm$ 8	6
10 <sup>-6</sup> M 5-HT	1,3 $\pm$ 0,6	67 $\pm$ 16	10
10 <sup>-5</sup> M 5-HT	2,1 $\pm$ 0,5	96 $\pm$ 33	8
10 <sup>-4</sup> M 5-HT	2,4 $\pm$ 1,6	138 $\pm$ 41	9
10 <sup>-3</sup> M 5-HT	2,3 $\pm$ 0,8	131 $\pm$ 22	9

**Abb. A3: Korrelation der Raten von Protein- und Flüssigkeitssekretion während einer 5-HT-Stimulierung.** Im oberen Bereich der Abbildung sind die Ergebnisse der Korrelationsanalyse (Spearman R) dargestellt. Im unteren Teil sind die absoluten Werte der Proteinsekretion ( $\mu\text{g}/\text{Min.}$ ) über der Flüssigkeitssekretion aufgetragen. Außerdem sind die berechnete Regressionsgerade sowie das 95 % Vertrauensintervall eingetragen. Nur wenige Werte liegen in diesem Vertrauensintervall, weshalb der berechnete Korrelationskoeffizient nur eine schwache Korrelation anzeigt ( $R^2 = 0,29$ ). Diese schwache Korrelation ist jedoch statistisch signifikant.



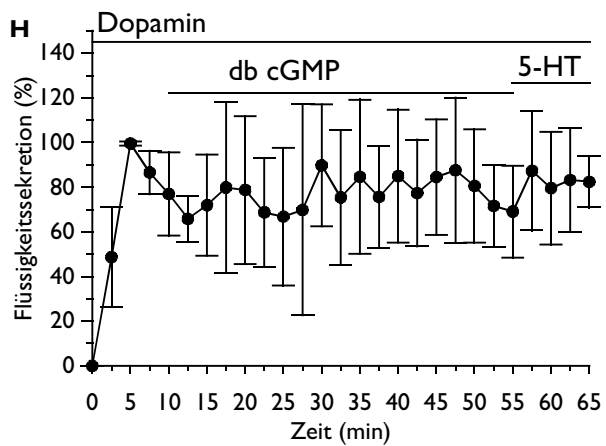
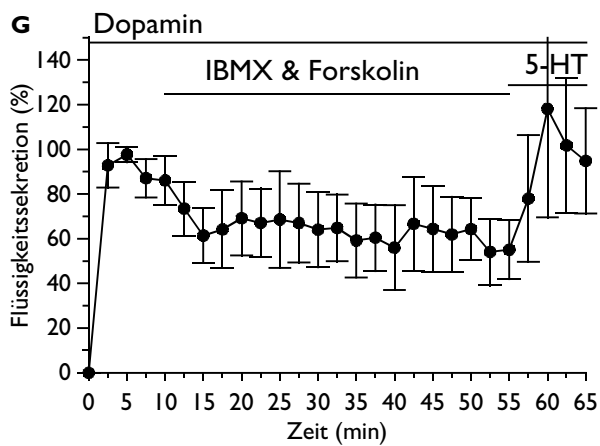
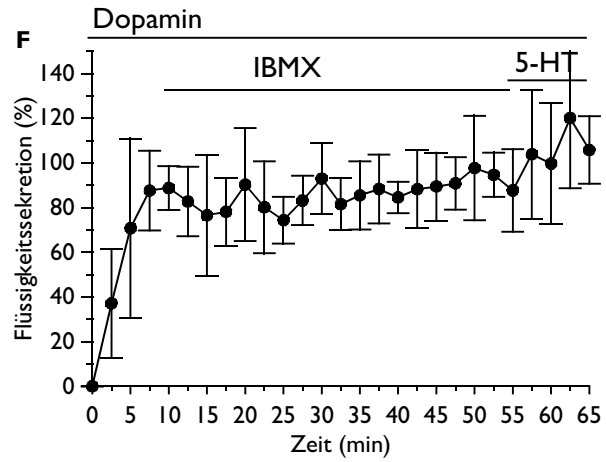
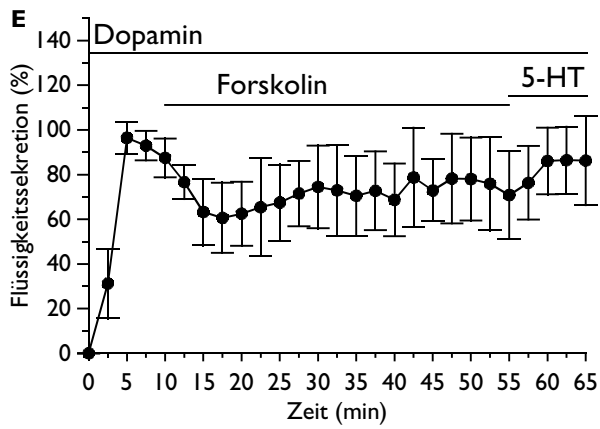
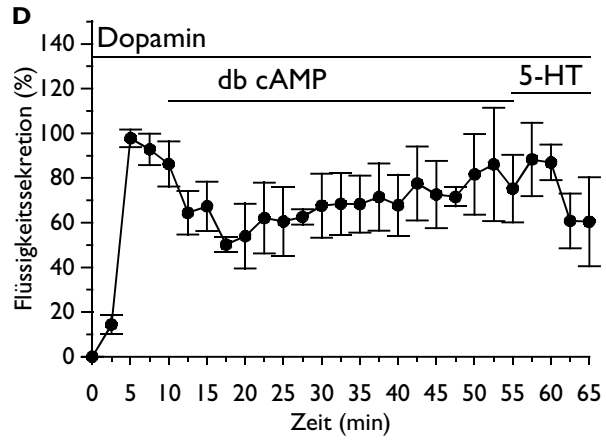
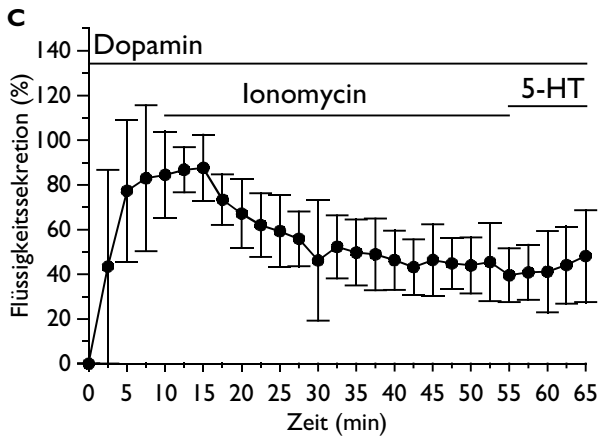
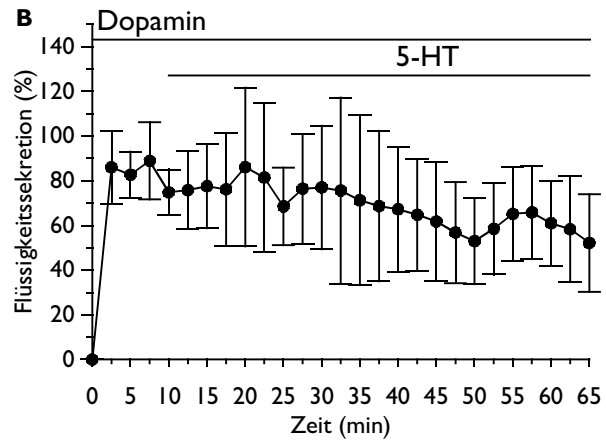
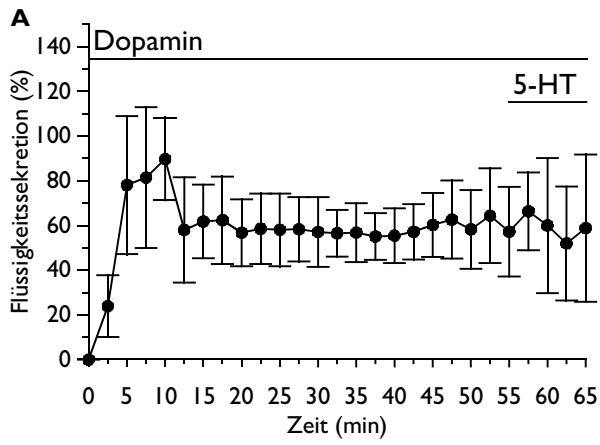
**Tab. A7: Maximale Raten der Proteinsekretion während der verschiedenen Experimente.** Die Proteinsekretion ist angegeben als MW  $\pm$  SD ( $\mu\text{g}/\text{Min.}$ ). Zur Stimulierung verwendete Konzentrationen der Substanzen: DA, 5-HT: 1  $\mu\text{M}$ ; Ionomycin: 5  $\mu\text{M}$ ; IBMX, Forskolin: 100  $\mu\text{M}$ ; db cGMP 1 mM; db cAMP 10 mM. Als Hintergrundstimulierung wurde in allen Experimenten 1  $\mu\text{M}$  DA gegeben.

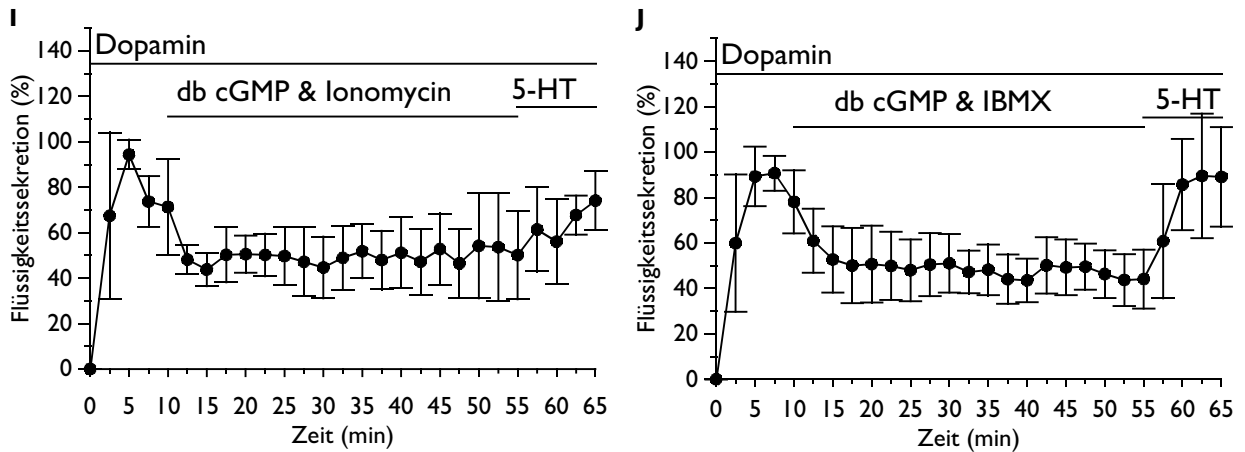
Stimulierung	Teststimulierung			Kontrollstimulierung				n
	Proteinsekretion	Zeit	p <sup>1</sup>	Proteinsekretion	Zeit	p <sup>2</sup>	p <sup>3</sup>	
DA	0			<b>1,3 <math>\pm</math> 0,3</b>	63 $\pm$ 2			8
5-HT	<b>2,2 <math>\pm</math> 0,8</b>	18 $\pm$ 2		0,5 $\pm$ 0,2	58 $\pm$ 2	*		12
<u>Erhöhung der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub></u>								
Ionomycin	0,4 $\pm$ 0,2	49 $\pm$ 6	*	2,2 $\pm$ 0,7	63 $\pm$ 1	n.s.	*	6
<u>Erhöhung der [cAMP]<sub>i</sub></u>								
db cAMP	0,2 $\pm$ 0,0	27 $\pm$ 12	-	3,0 $\pm$ 1,5	60 $\pm$ 0	n.s.	*	3
IBMX	0,6 $\pm$ 0,3	24 $\pm$ 3	*	2,5 $\pm$ 1,1	59 $\pm$ 1	n.s.	*	8
Forskolin	0,4 $\pm$ 0,1	32 $\pm$ 4	*	2,1 $\pm$ 0,8	60 $\pm$ 0	n.s.	*	9
IBMX & Forskolin	1,4 $\pm$ 0,5	23 $\pm$ 2	n.s.	2,0 $\pm$ 0,7	59 $\pm$ 1	n.s.	*	9
<u>Erhöhung der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> und [cAMP]<sub>i</sub></u>								
Forskolin & Ionomycin	0,9 $\pm$ 0,3	25 $\pm$ 5	*	1,2 $\pm$ 0,3	60 $\pm$ 1	n.s.	*	8
IBMX & Ionomycin	1,7 $\pm$ 0,9	23 $\pm$ 5	n.s.	1,5 $\pm$ 0,5	61 $\pm$ 1	n.s.	*	7
IBMX, Forskolin & Ionomycin	1,6 $\pm$ 0,7	20 $\pm$ 3	n.s.	0,9 $\pm$ 0,4	61 $\pm$ 1	n.s.	n.s.	7
<u>Erhöhung der [cGMP]<sub>i</sub> (und [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> bzw. [cAMP]<sub>i</sub>)</u>								
db cGMP	0,0		-	1,5 $\pm$ 0,4	64 $\pm$ 1	-	-	4
db cGMP & Ionomycin	0,0		-	1,5 $\pm$ 0,3	63 $\pm$ 1	-	-	4
db cGMP & IBMX	0,8 $\pm$ 0,4	30 $\pm$ 4	*	2,4 $\pm$ 0,9	59 $\pm$ 1	n.s.	*	9
1: Signifikante Unterschiede zur Proteinsekretion während der Teststimulierung mit 1 $\mu\text{M}$ 5-HT.								
2: Signifikante Unterschiede zur Proteinsekretion nach Teststimulierung mit 1 $\mu\text{M}$ DA.								
3: Signifikante Unterschiede Proteinsekretion nach Teststimulierung mit 1 $\mu\text{M}$ 5-HT.								
Statistische Auswertung: Ein-Wege ANOVA; n.s. p>0,05; * p≤0,05.								

### 8.4.3 Flüssigkeitssekretion

#### 8.4.3.1 Flüssigkeitssekretion nach Erhöhung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-, cAMP und / oder cGMP-Konzentration

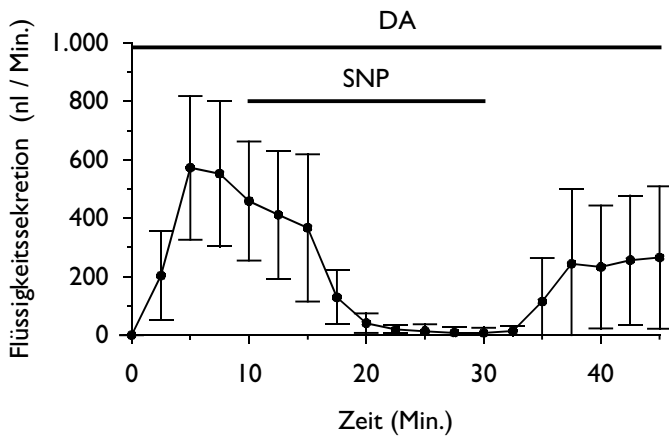
In den Experimenten, mit denen untersucht wurde, welche Signalwege die Proteinsekretion aktivieren, wurde alle 2,5 Minuten ein Speicheltropfen abgesammelt, und sein Volumen bestimmt. Daraus wurden die Raten der Flüssigkeitssekretion (nl/Min.) während der einzelnen Experimente berechnet. Diese sind in den folgenden Abbildungen zusammengefaßt.



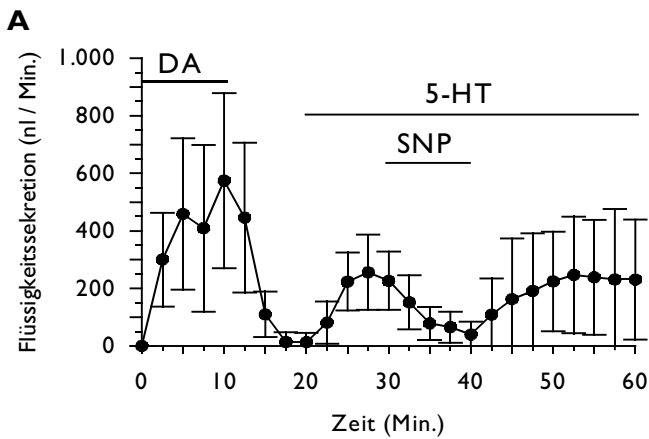


**Abb. A4: Rate der Flüssigkeitssekretion bei verschiedenen Stimulierungen.** Die Werte sind auf die maximale durch DA-Stimulierung aktivierte Rate der Flüssigkeitssekretion der Drüsen normalisiert, MW  $\pm$  SD. In allen Experimenten erfolgte eine kontinuierliche Hintergrundstimulierung mit 1  $\mu$ M DA. Nach Stimulierung mit 1  $\mu$ M DA (**A**, n=8) steigt die Rate der Flüssigkeitssekretion in den ersten 10 Minuten des Experiments an. Anschließend sinkt sie auf ein niedrigeres Niveau und bleibt auf diesem annähernd konstant. Applikation von 1  $\mu$ M 5-HT ab Minute steigert die Sekretionsrate kaum. Dagegen ist die Sekretionsrate höher, wenn während der Teststimulierung (zwischen Minute 10 und 55) 5-HT appliziert wird (**B**, n=12). Sie fällt in diesem Experiment langsam zum Ende des Versuchszeitraums. Applikation des  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophors Ionomycin (5  $\mu$ M) während der Teststimulierung (**C**, n=6) bewirkt innerhalb der ersten 5 Minuten einen Anstieg der Sekretionsrate, verglichen mit der nach einer reinen DA-Stimulierung (vgl. mit A). Die nachfolgende Stimulierung mit 5-HT kann die Sekretionsrate kaum steigern. Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration durch Applikation von 10 mM db cAMP (**D**, n=3), 100  $\mu$ M Forskolin (**E**, n=9) oder 100  $\mu$ M IBMX (**F**, n=8) steigert die Sekretionsraten über die Dauer der Teststimulierung. Nach Applikation von Forskolin (E) und IBMX (F) während der Teststimulierung steigert die anschließende 5-HT-Stimulierung die Sekretionsraten leicht. Dagegen bewirkt die Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration durch simultane Applikation von jeweils 100  $\mu$ M Forskolin & IBMX (**G**, n=9) keine Steigerung der Flüssigkeitssekretion während der Teststimulierung, aber die anschließende Kontrollstimulierung mit 5-HT steigert die Sekretionsrate deutlich. Bei Applikation von 1 mM db cGMP (**H**, n=4) bleibt die Sekretionsrate auf einem höheren Niveau annähernd konstant (wenn auch mit großen Schwankungen zwischen den einzelnen Drüsen), verglichen mit dem Experiment, in dem ausschließlich DA appliziert wurde (vgl. mit A). Bei simultaner Applikation von 1 mM db cGMP & 5  $\mu$ M Ionomycin (**I**, n=4) kommt es nicht zu dem durch Ionomycin stimulierten Anstieg der Sekretionsrate innerhalb der ersten fünf Minuten nach Versuchsbeginn (vgl. mit C), und die Sekretionsrate ist niedriger als die allein durch db cGMP (& DA) aktivierte (vgl. mit H). Auch bei simultaner Applikation von 1 mM db cGMP und 100  $\mu$ M IBMX ist das Muster der Flüssigkeitssekretion anders als bei Applikation von nur einer der beiden Substanzen (**J**, n=9). Es kommt nicht zu dem langsamen Anstieg der Sekretionsrate während der Teststimulierung, der bei Applikation von IBMX beobachtet wird (vgl. mit F), und die Sekretionsrate ist niedriger als bei Stimulierung nur mit cGMP (& DA) (vgl. mit H).

### 8.4.3.2 DA- und 5-HT-stimulierte Flüssigkeits- und Proteinsekretion bei Applikation des NO-Donors SNP



**Abb. A5: Einfluß des NO-Donors SNP auf die DA-stimulierte Flüssigkeitssekretion.** Applikation des NO-Donors SNP (1 mM) bewirkt eine reversible, nahezu vollständige Hemmung der durch 1  $\mu$ M DA-stimulierten Flüssigkeitssekretion. Die Werte sind als MW  $\pm$  SD angegeben, n=5.



**Abb. A6: Einfluß des NO-Donors SNP auf die 5-HT-stimulierte Flüssigkeits- und Proteinsekretion.** Applikation des NO-Donors SNP (1 mM) bewirkt eine reversible, nahezu vollständige Hemmung der durch 1  $\mu$ M 5-HT-stimulierten Flüssigkeitssekretion (**A**). Anscheinend hemmt die Erhöhung der intrazellulären NO-Konzentration auch die Proteinsekretion (**B**), da nach Absetzen des SNP die Rate der Proteinsekretion langsam ansteigt. Während der Phase, in der keine Flüssigkeit sezerniert wurde, scheinen also auch keine Proteine abgegeben worden zu sein, die sich im Lumen der Acini angesammelt hätten. Die Werte sind als MW  $\pm$  SD angegeben, n=6.

