

Institut für Biochemie & Biologie  
Arbeitsgruppe Zoophysiologie

---

**Charakterisierung von Transportmechanismen in der  
Speicheldrüse der Schabe *Periplaneta americana***

- DISSERTATION -

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

eingereicht an der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität Potsdam

von  
CARSTEN HILLE

Potsdam, Mai 2006

*Für Kerstin in Dankbarkeit*

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

## Publikationen

HILLE, C., WALZ, B. (2006). Dopamine-induced graded intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  elevation via the  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  exchanger operating in the  $\text{Ca}^{2+}$ -entry mode in cockroach salivary ducts. *Cell Calcium* **39**: 305-311.

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

HILLE, C., WALZ, B. Dopamine-induced intracellular pH changes in cockroach salivary ducts: mechanisms and pH homeostasis. *Manuskript in Vorbereitung*.

HILLE, C., WALZ, B. Transepithelial fluid reabsorption in cockroach salivary ducts. *Manuskript in Vorbereitung*.

## Konferenzbeiträge

HILLE, C., WALZ, B. (2004). Transepithelial fluid reabsorption in ducts of salivary glands in the cockroach *Periplaneta americana* (Blattodea: Blattidae). Abstractband S.158, Poster P23. 97. Jahresversammlung der Deutschen Zoologischen Gesellschaft, Rostock.

HILLE, C., WALZ, B. (2005). Dopamine-induced intracellular and luminal pH changes in ducts of cockroach salivary glands: V-ATPase involvement. Abstractband S.124, Poster 6\_Po\_04. 98. Jahresversammlung der Deutschen Zoologischen Gesellschaft, Bayreuth.

HILLE, C., WALZ, B. (2006). Dopamine-induced intracellular pH changes in cockroach salivary ducts: mechanisms and pH homeostasis. *Acta Physiologica* **186**: 264, Poster. 85. Jahresversammlung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft, München.

## Zusammenfassung

Die Aktivierung der Speichelsekretion erfolgt in der innervierten Speicheldrüse der Schabe *Periplaneta americana* durch die biogenen Amine Dopamin (DA) und Serotonin (5-HT). Die Acini der Speicheldrüse sezernieren einen Primärspeichel, der in den Ausführungsgängen modifiziert wird. Die durch DA und 5-HT aktivierten Signalwege sowie die an der Elektrolyt- und Flüssigkeitssekretion bzw. Speichelmodifikation beteiligten Transportmechanismen sind weitgehend unbekannt.

Mikrofluorometrische  $\text{Ca}^{2+}$ -,  $\text{Na}^+$ - und pH-Messungen in Kombination mit pharmakologischen Experimenten, biochemische Messungen der Aktivitäten von Ionentransport-ATPasen sowie videomikroskopische Analysen zu transepithelialen Wasserbewegungen wurden in dieser Arbeit durchgeführt. Sie sollten Informationen über die an der Speichelbildung und -modifikation beteiligten Transportmechanismen und die Signalwege liefern, welche durch DA und/oder 5-HT aktiviert werden.

Wesentliche Ergebnisse dieser Arbeit waren:

- Messungen des intrazellulären pH ( $\text{pH}_i$ ) in Gangzellen zeigten, dass isolierte Ausführungsgänge mit Acini bei Stimulierung mit DA und 5-HT stark ansäuerten. In isolierten Ausführungsgängen ohne Acini verursachte nur DA eine schwache Ansäuerung. Da nur die Ausführungsgänge dopaminerg innerviert sind, die Acini jedoch dopaminerg und serotonerg, zeigt dieses Ergebnis, dass die DA- und/oder 5-HT-induzierte Primärspeichelbildung die Ursache für die  $\text{pH}_i$ -Änderungen in den Gangzellen ist.  $\text{pH}_i$ -Messungen in den Gangzellen geben also auch Hinweise auf Transportvorgänge in den Acini.
- Der  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -2Cl<sup>-</sup>-Symporter und der Cl<sup>-</sup>-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Antiporter, gekoppelt mit dem  $\text{Na}^+$ -H<sup>+</sup>-Antiporter (NHE) waren an der NaCl-Aufnahme in die peripheren Zellen der Acini zur Bildung des NaCl-reichen Primärspeichels beteiligt. Die Aktivität dieser Transporter hing von der CO<sub>2</sub>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Verfügbarkeit ab und war Ca<sup>2+</sup>-abhängig.
- Die starke Ansäuerung in den Gangzellen hing nicht von der Aktivität der apikalen vakuolären Protonen-ATPase (V-H<sup>+</sup>-ATPase), aber von der Aktivität der basolateralen Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase ab, die anscheinend in den Ausführungsgängen die Speichelmodifikation energetisiert.

- In isolierten Ausführgängen mit Acini waren die V-H<sup>+</sup>-ATPase und Na<sup>+</sup>-abhängige Transporter (u. a. NHE) an der Erholung von einer DA-induzierten oder einer NH<sub>4</sub>Cl-Vorpuls-induzierten Ansäuerung in den Gangzellen beteiligt. Bei der Regulation des pH<sub>i</sub> in unstimulierten Gangzellen spielten diese Transporter keine Rolle.
- In isolierten Ausführgängen mit Acini induzierte DA in den Gangzellen einen Anstieg der [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub> und, zeitlich verzögert, auch der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. Der [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub>-Anstieg war von der Aktivität der Acini abhängig und erfolgte möglicherweise über apikale Na<sup>+</sup>-Kanäle. Der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>-Anstieg war graduiert und tonisch. Der DA-induzierte [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub>-Anstieg in den Gangzellen und deren Depolarisation führten dazu, dass der basolaterale Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-Antiporter in den Ca<sup>2+</sup>-Influx-Modus umkehrte. Die daraus resultierende tonische [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>-Erhöhung könnte an der Regulation der Na<sup>+</sup>-Rückresorption beteiligt sein.
- Zum Nachweis transepithelialer Flüssigkeitsbewegungen in isolierten Ausführgängen wurde eine videomikroskopische Methode entwickelt. Isolierte Ausführgänge ohne Acini resorbierten im unstimulierten Zustand Flüssigkeit aus dem Ausführganglumen. Möglicherweise sezernieren die Acini auch im unstimulierten Zustand mit geringerer Rate einen Primärspeichel, der in den Ausführgängen resorbiert wird. Die Resorption war ATP-abhängig. Der ATP-verbrauchende Transportmechanismus konnte nicht identifiziert werden. Weder die Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase noch die V-H<sup>+</sup>-ATPase waren an der Resorption beteiligt.

Diese Arbeit trug zur Kenntnis der komplexen Funktionsweise von Speicheldrüsen in Insekten bei und erweiterte das lückenhafte Wissen über die zellulären Wirkungen biogener Amine in Insekten. Zudem wurden in dieser Arbeit viele Parallelen zu Funktionsweisen der Speicheldrüsen in Vertebraten deutlich.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>IV</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>VI</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>VII</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Aspekte des transepithelialen Transports</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2 Speicheldrüse der Schabe <i>Periplaneta americana</i></b> .....	<b>3</b>
1.2.1 Morphologie .....	3
1.2.2 Bedeutung der biogenen Amine Dopamin und Serotonin bei der Speichelsekretion .....	4
1.2.3 Gegenwärtiges Modell der Speichelbildung und -modifikation .....	6
<b>1.3 Zielstellung dieser Arbeit</b> .....	<b>7</b>
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>10</b>
<b>2.1 Substanzen und Lösungen</b> .....	<b>10</b>
<b>2.2 Präparation der Speicheldrüsen</b> .....	<b>12</b>
<b>2.3 Mikrofluorometrische Messungen von Ionenkonzentrationen</b> .....	<b>14</b>
2.3.1 Fluoreszenzmikroskop .....	14
2.3.2 Fluoreszenzfarbstoffe .....	15
2.3.3 Messung der intrazellulären Ca <sup>2+</sup> Konzentration .....	16
2.3.4 Messung des intrazellulären pH .....	17
2.3.5 Simultane Messung der intrazellulären Ca <sup>2+</sup> Konzentration und des intrazellulären pH .....	18
2.3.6 Simultane Messung der intrazellulären Na <sup>+</sup> und Ca <sup>2+</sup> Konzentrationen .....	18
2.3.7 Messung des pH an der luminalen Oberfläche des Ausführgangs .....	18

<b>2.4 Differential-Interferenzkontrast- und Fluoreszenzmikroskopie zur Untersuchung des transepithelialen Wassertransports .....</b>	<b>19</b>
<b>2.5 Konfokale Laser-Rastermikroskopie zur Analyse der Verteilung von Fluoreszenzfarbstoffen .....</b>	<b>21</b>
<b>2.6 Messung der ATPase-Aktivität .....</b>	<b>22</b>
<b>2.7 Statistische Auswertung .....</b>	<b>24</b>
<b>3 Ergebnisse .....</b>	<b>25</b>
<b>3.1 DA-induzierter <math>[Ca^{2+}]_i</math>-Anstieg in den Ausführungsgängen isolierter Loben .....</b>	<b>25</b>
3.1.1 Graduierter $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg .....	25
3.1.2 Abhängigkeit des $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegs von der Aktivität des $Na^+$ - $K^+$ - $2Cl^-$ -Symporters .....	27
3.1.3 Umkehr des $Na^+$ - $Ca^{2+}$ -Antiporters durch einen DA-induzierten $[Na^+]_i$ -Anstieg .....	28
3.1.4 Berechnung des Umkehrpotentials für den $Na^+$ - $Ca^{2+}$ -Antiporter .....	30
<b>3.2 Mechanismen der <math>pH_i</math>-Regulation in den Ausführungsgängen isolierter Loben ...</b>	<b>31</b>
3.2.1 Lokalisation des BCECF in den Ausführungszellen .....	31
3.2.2 $NH_4Cl$ -induzierte intrazelluläre Ansäuerung in den Ausführungsgängen .....	33
3.2.3 Beteiligung der $V-H^+$ -ATPase und des $Na^+$ - $H^+$ -Antiporters an der $pH_i$ -Regulation.....	34
<b>3.3 DA-induzierte <math>pH_i</math>-Änderungen.....</b>	<b>37</b>
3.3.1 Intrazelluläre Ansäuerung in den Ausführungsgängen isolierter Loben .....	37
3.3.2 Schwächere intrazelluläre Ansäuerung in isolierten Ausführungsgängen.....	40
<b>3.4 DA-induzierte intrazelluläre Ansäuerung in den Ausführungsgängen isolierter Loben .....</b>	<b>41</b>
3.4.1 Abhängigkeit vom $Na^+$ - $K^+$ - $2Cl^-$ -Symporter in $HCO_3^-$ -freier Ringerlösung .....	41
3.4.2 Einfluss des $Cl^-$ - $HCO_3^-$ -Antiporters und der Carboanhydrase in $HCO_3^-$ -freier Ringerlösung .....	43
3.4.3 Abhängigkeit der Ansäuerung von der Aktivität des $Na^+$ - $H^+$ -Antiporters und des $Cl^-$ - $HCO_3^-$ -Antiporters in $CO_2/HCO_3^-$ -gepufferter Ringerlösung .....	44
3.4.4 Beteiligung der $V-H^+$ -ATPase und $Na^+$ -abhängiger Transporter an der $pH_i$ -Erholung .....	47
3.4.5 Beziehung zwischen DA-induziertem $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg und DA-induzierter intrazellulärer Ansäuerung .....	50
3.4.6 Ansäuerung nach einem Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ und der $[cAMP]_i$ .....	51

<b>3.5 DA-induzierte intrazelluläre Ansäuerung in isolierten Ausführgängen.....</b>	<b>53</b>
3.5.1 Abhängigkeit vom Cl <sup>-</sup> -HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -Antiporter .....	53
3.5.2 Abhängigkeit der pH <sub>i</sub> -Erholung von der Aktivität der V-H <sup>+</sup> -ATPase .....	55
3.5.3 Ansäuerung nach einem Anstieg der [cAMP] <sub>i</sub> .....	56
<b>3.6 Messung des pH an der Oberfläche des Ausführganglumens (pH<sub>s</sub>) .....</b>	<b>58</b>
3.6.1 Lokalisation und pH-Empfindlichkeit von HAF im Ausführganglumen .....	58
3.6.2 DA-induzierte biphasische pH <sub>s</sub> -Änderungen.....	60
3.6.3 Beteiligung der V-H <sup>+</sup> -ATPase an den DA-induzierten pH <sub>s</sub> -Änderungen .....	62
3.6.4 Cl <sup>-</sup> -Abhängigkeit der DA-induzierten pH <sub>s</sub> -Änderungen .....	63
3.6.5 Beteiligung des intrazellulären Botenstoffs cAMP .....	64
<b>3.7 Transepithelialer Wassertransport in isolierten Ausführgängen.....</b>	<b>65</b>
3.7.1 Wasserresorption in unstimulierten Ausführgängen .....	65
3.7.2 ATP-Abhängigkeit der Wasserresorption.....	69
3.7.3 Mechanismen der Wasserresorption .....	70
3.7.4 DA-induzierte Veränderungen der Wasserresorption .....	72
<b>3.8 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase- und V-H<sup>+</sup>-ATPase-Aktivität in den Speicheldrüsen .....</b>	<b>72</b>
<b>4 Diskussion .....</b>	<b>77</b>
<b>4.1 DA-induzierter [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>-Anstieg in den Ausführgängen .....</b>	<b>77</b>
<b>4.2 pH<sub>i</sub>-Regulation in den Ausführgängen .....</b>	<b>83</b>
<b>4.3 DA-induzierte pH-Änderungen in den Ausführgängen .....</b>	<b>88</b>
4.3.1 DA-induzierte pH-Änderungen in isolierten Ausführgängen .....	89
4.3.2 Abhängigkeit von Acini und Ausführgängen .....	93
4.3.3 DA-induzierte pH-Änderungen in den Ausführgängen als Indikator der Aktivität der P-Zellen in den Acini .....	94
4.3.4 Ursachen der DA-induzierten pH-Änderungen in den Ausführgängen isolierter Loben .....	99
4.3.5 Luminale Regulation der Speichelmodifikation in den Ausführgängen.....	105
<b>4.4 Transepithelialer Wassertransport in den Ausführgängen .....</b>	<b>108</b>
<b>4.5 Ausblick.....</b>	<b>113</b>
<b>5 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>115</b>



# Abbildungsverzeichnis

1.1	Morphologie der Speicheldrüse von <i>P. americana</i> .....	4
1.2	Schematische Darstellung der Zelltypen in der Speicheldrüse.....	5
1.3	Gegenwärtiges Modell der Speichelbildung und -modifikation.....	6
2.1	Lichtmikroskopische Aufnahmen isolierter Speicheldrüsen.....	13
2.2	Schematische Darstellung Fluoreszenzmikroskops.....	15
2.3	Schematische Darstellung der „Öltropfen-Methode“.....	20
3.1	Einfluss von DA auf $[Ca^{2+}]_i$ in den Ausführungsgängen.....	26
3.2	Einfluss von DA und 5-HT auf $[Ca^{2+}]_i$ in den Ausführungsgängen.....	26
3.3	$Na^+$ -Abhängigkeit des DA-induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegs.....	27
3.4	Einfluss des $Na^+$ - $Ca^{2+}$ -Antiporters auf den DA-induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg.....	28
3.5	Einfluss von Ouabain auf den DA-induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg.....	30
3.6	Lokalisation von BCECF in den Ausführungszellen.....	32
3.7	$pH_i$ -Erholung nach $NH_4Cl$ -induzierter Ansäuerung in den Ausführungszelle....	35
3.8	DA-induzierte Ansäuerung in den Ausführungszellen isolierter Loben.....	38
3.9	Konzentrationsabhängigkeit der DA-induzierten Ansäuerung.....	39
3.10	DA-induzierte Ansäuerung in Ausführungszellen isolierter Ausführungsgänge vs. isolierter Loben.....	40
3.11	Einfluss von DA und 5-HT auf $pH_i$ in Ausführungszellen isolierter Ausführungsgänge vs. isolierter Loben.....	41
3.12	$Cl^-$ -Abhängigkeit der DA-induzierten Ansäuerung in isolierten Loben.....	42
3.13	Einfluss von DIDS und Azetazolamid auf die DA-induzierte Ansäuerung in isolierten Loben.....	43
3.14	Einfluss von $CO_2/HCO_3^-$ auf die DA-induzierte Ansäuerung in isolierten Loben.....	45
3.15	Einfluss von DIDS und EIPA auf die DA-induzierte Ansäuerung in isolierten Loben bei Anwesenheit von $CO_2/HCO_3^-$ .....	46
3.16	$pH_i$ -Erholung nach DA-induzierter Ansäuerung in isolierten Loben.....	47
3.17	Einfluss von Ouabain auf die DA-induzierte Ansäuerung in isolierten Loben....	49

3.18	Simultane Messung von $\text{pH}_i$ und $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in Ausführungsgängen isolierter Loben.....	50
3.19	$\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit der DA-induzierten Ansäuerung in isolierten Loben.....	51
3.20	Imitierung der DA-induzierten Ansäuerung in isolierten Loben durch eine $[\text{cAMP}]_i$ - und/oder $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Erhöhung.....	52
3.21	$\text{Cl}^-$ -Abhängigkeit der DA-induzierten Ansäuerung in isolierten Ausführungsgängen	54
3.22	Einfluss von $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ auf die DA-induzierte Ansäuerung in isolierten Ausführungsgängen.....	55
3.23	$\text{pH}_i$ -Erholung nach DA-induzierter Ansäuerung in isolierten Ausführungsgängen....	56
3.24	Imitierung der DA-induzierten Ansäuerung in isolierten Ausführungsgängen durch eine $[\text{cAMP}]_i$ -Erhöhung.....	57
3.25	Eigenschaften von HAF im Ausführungsganglumen.....	58
3.26	DA-induzierte $\text{pH}_s$ -Änderungen.....	60
3.27	Dosis-Wirkungskurve der DA-induzierten $\text{pH}_s$ -Änderungen.....	61
3.28	Einfluss von Concanamycin und Bafilomycin auf die DA-induzierten $\text{pH}_s$ -Änderungen.....	62
3.29	$\text{Cl}^-$ -Abhängigkeit der DA-induzierten $\text{pH}_s$ -Änderungen.....	64
3.30	Imitierung der DA-induzierten $\text{pH}_s$ -Änderungen durch eine $[\text{cAMP}]_i$ -Erhöhung	64
3.31	Visualisierung der Wasserresorption in isolierten Ausführungsgängen.....	66
3.32	Messung der Wasserresorption in isolierten Ausführungsgängen.....	67
3.33	Analyse der Wasserresorption mittels konfokaler Laser-Rastermikroskopie....	68
3.34	ATP-Abhängigkeit der Wasserresorption in isolierten Ausführungsgängen.....	69
3.35	Einfluss von DA auf die Wasserresorption in isolierten Ausführungsgängen.....	72
4.1	Vorgeschlagenes Modell der Speichelbildung und -modifikation.....	88
4.2	DA-induzierte Änderungen von $[\text{Na}^+]_i$ , $[\text{K}^+]_i$ und der Membranpotentiale in den Ausführungszellen.....	100

## Tabellenverzeichnis

2.1	Zusammensetzung der Ringerlösungen.....	10
2.2	Verwendete Substanzen.....	11
3.1	Pharmakologische Untersuchungen zur Wasserresorption in isolierten Ausführgängen.....	71
3.2	ATPase-Aktivitäten in Homogenaten isolierter Speicheldrüsen.....	73
3.3	ATPase-Aktivitäten in Homogenaten isolierter Ausführgänge.....	75

## Abkürzungsverzeichnis

5-HT	5-Hydroxytryptamin, Serotonin
AE	Cl <sup>-</sup> -HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -Antiporter
ATP	Adenosintriphosphat
BCECF	2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5-(und-6)-carboxyfluorescein
cAMP	zyklisches 3',5'-Adenosinmonophosphat
DA	Dopamin
DIDS	4,4-Diisothiocyanostilben-2,2-disulfonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNP	2,4-Dinitrophenol
EC <sub>50</sub>	Konzentration mit halbmaximalem Effekt
EIPA	5-( <i>N</i> -Ethyl- <i>N</i> -isopropyl)-amilorid
FCCP	Carbonylcyanid-4-(trifluoromethoxy)-phenylhydrazon
G-Protein	Guanin-Nukleotid-bindendes Protein
HAF	5- <i>N</i> -Hexadecanoylaminofluorescein
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-trisphosphat
NBC	Na <sup>+</sup> -HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -Symporter
NCE	Na <sup>+</sup> -Ca <sup>2+</sup> -Antiporter
NDCBE	Na <sup>+</sup> -getriebener Cl <sup>-</sup> -HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -Antiporter
NHE	Na <sup>+</sup> -H <sup>+</sup> -Antiporter
NKCC	Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -2Cl <sup>-</sup> -Symporter
pH <sub>i</sub>	intrazellulärer pH
pH <sub>s</sub>	pH an der Oberfläche des Ausführungslumens
P-Zellen	periphere Zellen
SBFI	Natrium-bindendes Benzofuran-Isophtalat
TMRE	Tetramethylrhodaminester

# 1 Einleitung

## 1.1 Aspekte des transepithelialen Transports

In den meisten Metazoa bedecken ein- oder mehrschichtige Epithelien innere und äußere Körperflächen. Epithelien bilden somit Grenzflächen zwischen verschiedenen Kompartimenten. Epithelien haben einerseits Schutzfunktion, andererseits besitzen sie die Fähigkeit des selektiven Transports von Substanzen und kontrollieren den Stoffaustausch zwischen verschiedenen Kompartimenten.

Insbesondere zwei Eigenschaften erlauben Epithelien die Ausführung ihrer spezifischen Funktionen. Epithelzellen sind einerseits polar aufgebaut (KNUST 2002, NELSON 2003) und bilden andererseits in charakteristischer Weise Zell-Zell-Kontakte zur ihren Nachbarzellen aus (CEREIJIDO *et al.* 1998, TEPASS *et al.* 2001). Die Polarität spiegelt sich auf mehreren Ebenen wider. Die Plasmamembran ist polar organisiert und in zwei Domänen unterteilt. Die basolaterale Membran auf der Blut- oder Hämolymphe-seite des Epithels hat Kontakt zum Extrazellularraum und zu den Nachbarzellen. Die apikale Membran grenzt an das Außenmedium oder das Lumen eines epithelbegrenzten Körperhohlraums. Beide Membrandomänen können sich morphologisch (Oberflächenvergrößerungen wie Mikrovilli oder Membraneinfaltungen) unterscheiden, sind jedoch in allen Fällen funktionell unterschiedlich, denn apikaler und basolateraler Membrananteil unterscheiden sich in ihrer Protein- und Lipidzusammensetzung (VAN MEER & SIMONS 1986). Verschiedene Zell-Zell-Kontakte garantieren die dichte Anhaftung sowie die Kommunikation zwischen den Epithelzellen. *Tight junctions* bzw. *septate junctions* trennen die apikale von der basolateralen Membrandomäne und stellen eine Diffusionsbarriere für den parazellulären Transport von Substanzen über das Epithel dar (SCHNEEBERGER & LYNCH 2004). *Gap junctions* hingegen sind porenbildende Proteinkomplexe, die den unspezifischen passiven

Transmembrantransport zwischen zwei benachbarten Epithelzellen ermöglichen (SÁEZ *et al.* 2003).

Der transepitheliale Transport von Ionen und ungeladenen Substanzen erfolgt transzellulär und/oder parazellulär. Der transzelluläre Transport erfolgt sequenziell über beide Membrandomänen der Epithelzellen. Hierbei ist die asymmetrische Verteilung von Transportproteinen in beiden Membrandomänen die Grundlage für einen vektoriellen Transport. Die Verteilung der Transportproteine bestimmt auch, ob ein Epithel eine sezernierende oder resorbierende Funktion hat. Der transzelluläre Transport kann aktiv oder passiv erfolgen und wird mit Ausnahme der Lipiddiffusion und dem Membran verlagernden Transport durch Transmembranproteine vermittelt, die in Carrier, Kanäle und Ionen-transport-ATPasen eingeteilt werden (ALBERTS *et al.* 1994).

Der parazelluläre Transport erfolgt immer passiv entlang eines bestehenden elektrochemischen Gradienten über die Zellzwischenräume durch die *tight junctions* bzw. *septate junctions* (SCHNEEBERGER & LYNCH 2004). Je nach Epithelart sind diese mehr oder weniger stark durchlässig, wodurch man undichte und dichte Epithelien unterscheiden kann (POWELL 1981). Dichte Epithelien können hohe transepitheliale Potentiale generieren und sind oft in Transportprozesse zwischen Medien unterschiedlicher ionaler Zusammensetzung und Osmolarität involviert. Undichte Epithelien dagegen haben in der Regel geringe transepitheliale Potentiale und erlauben den Transport großer Volumina an isoosmotischer Flüssigkeit. Unterschiede zwischen undichten und dichten Epithelien finden sich vor allem im strukturellen Aufbau und in der Verteilung ihrer Transportproteine in der apikalen Membran. Undichte Epithelien haben oft als Oberflächenvergrößerungen apikale und basolaterale Einfaltungen (WELLING *et al.* 1978). Symporter-Systeme (z. B.  $\text{Na}^+$ -Glucose,  $\text{Na}^+$ -Aminosäure,  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ - $2\text{Cl}^-$ ) findet man vor allem in der apikalen Membran undichter Epithelien wie z. B. der Gallenblase und dem proximalen Tubulus der Niere (BROWN 2000, VERREY *et al.* 2005). Im Gegensatz dazu sind epitheliale  $\text{Na}^+$ -Kanäle (ENaCs) typisch für apikale Membranen dichter Epithelien wie z. B. der Harnblase, dem distalen Tubulus und Sammelrohr der Niere (GARTY & PALMER 1997).

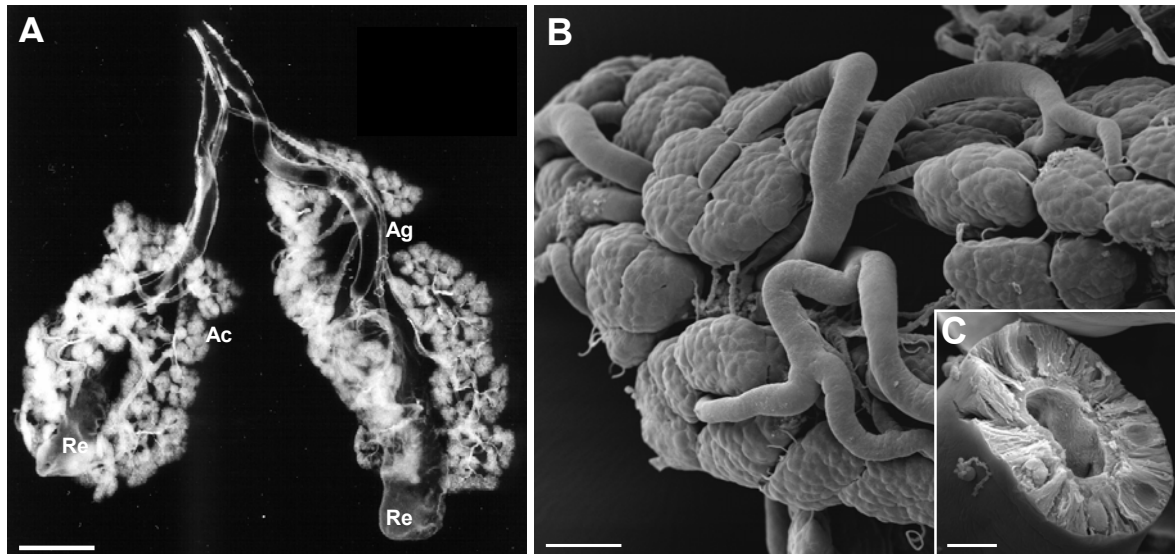
## 1.2 Speicheldrüse der Schabe *Periplaneta americana*

Die zellulären Prozesse des transepithelialen Transports wurden bereits in zahlreichen Insektengeweben wie Speicheldrüsen (HOUSE & GINSBORG 1985), Malpighischen Gefäßen (BEYENBACH 2003) und Mitteldarm (WIECZOREK *et al.* 2000) untersucht. Die Speicheldrüsen der Amerikanischen Schabe *Periplaneta americana* stellen ein hervorragendes System dar, um die zellphysiologischen Vorgänge der Stimulus-Sekretionskopplung zu charakterisieren. Die großen und leicht zu präparierenden Speicheldrüsen erlauben die Anwendung von nahezu allen zellphysiologischen, vor allem der nicht-invasiven optischen Methoden. Ein weiterer Vorteil ergibt sich aus der strukturellen Organisation der Speicheldrüsen. Wie nachfolgend detailliert beschrieben, sind die Elementarprozesse der Speichelbildung auf verschiedene Zelltypen verteilt, die zudem unterschiedlich stimuliert und somit getrennt analysiert werden können.

### 1.2.1 Morphologie

Die paarige, acinöse Speicheldrüse liegt beiderseits des Vorderdarms. Die Acini bilden die traubenförmigen sekretorisch aktiven Endstücke der Speicheldrüse. Ihnen schließt sich ein verzweigtes Ausführungssystem an, das in einem paarigen Hauptspeichelgang mündet. Zum Speicheldrüsenkomplex gehören zwei Reservoirs mit Reservoiringängen. Die beiden Hauptspeichelgänge verlaufen parallel zu den zwei Reservoiringängen, ehe sie sich zum Hauptausführungsgang vereinigen und in den Hypopharynx münden (KESSEL & BEAMS 1963, WHITEHEAD 1971) (Abb. 1.0).

Die einzelnen Acini sind gleichartig aufgebaut und bestehen aus drei Zelltypen (JUST & WALZ 1994a) (Abb. 1.0). Zwei pyramidenförmige periphere Zellen (P-Zellen) bilden die Basis eines jeden Acinus. Die Ultrastruktur der P-Zellen deutet auf ihre Beteiligung an einem transepithelialen Flüssigkeitstransport. Sie besitzen basolateral zahlreiche Membraneinfaltungen mit einer hohen Dichte an Mitochondrien und apikal einen ausgeprägten Mikrovillisaum. Die zentralen Zellen (C-Zellen) umgeben das Lumen des Acinus. Sie sind reich an rauem endoplasmatischem Retikulum, Dictyosomen sowie sekretorischen Vesikeln. Dies



**Abb. 1.0** Morphologie der Speicheldrüse von *P. americana*. **(A)** Dunkelfeldaufnahme der paarigen Speicheldrüse, bestehend aus zahlreichen Acini (Ac) und einem verzweigten Ausführungssystem (Ag) sowie einem paarigen Reservoir (Re), Balken = 1 mm. **(B)** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einzelner Acini und Gänge, Balken = 100  $\mu\text{m}$ . **(C)** Aufgebrochener Ausführungsgang, Balken = 20  $\mu\text{m}$ .

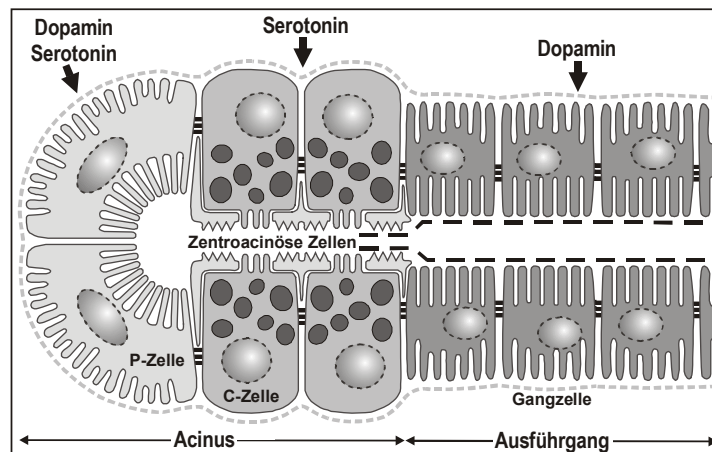
deutet auf ihre Beteiligung bei der Proteinbildung und -sekretion hin. Fläche, auf der luminalen Seite den C-Zellen aufliegende zentroacinöse Zellen stabilisieren die Acini.

Das sich den Acini anschließende Ausführungssystem besteht nur aus einem Zelltyp, den Ausführungszellen. Diese zeigen ebenfalls starke basolaterale sowie apikale Membraneinfaltungen und eine hohe Dichte an Mitochondrien an beiden Membrandomänen. Die luminalen Ausführungsgänge sind mit einer dünnen, kutikulären Schicht (Intima) über die gesamte Länge ausgekleidet (Abb. 1.0).

### 1.2.2 Bedeutung der biogenen Amine Dopamin und Serotonin bei der Speichelsekretion

Biogene Amine sind kleine organische Verbindungen, die sich von Aminosäuren ableiten. Im Nervensystem von Invertebraten konnten die biogenen Amine Dopamin (DA), Serotonin (5-Hydroxytryptamin, 5-HT), Histamin, Oktopamin und Tyramin nachgewiesen werden. Biogene Amine wirken als Neurotransmitter, Neuromodulatoren sowie Neurohormone und beeinflussen zahlreiche Prozesse wie z. B. zirkadiane Rhythmen, motorische Aktivitäten, endo- und exokrine





**Abb. 1.0** Schematische Darstellung der strukturellen Organisation eines Acinus mit Ausführungsgang der Speicheldrüse von *P. americana*. Erläuterungen im Text (verändert nach BAUMANN *et al.* 2002).

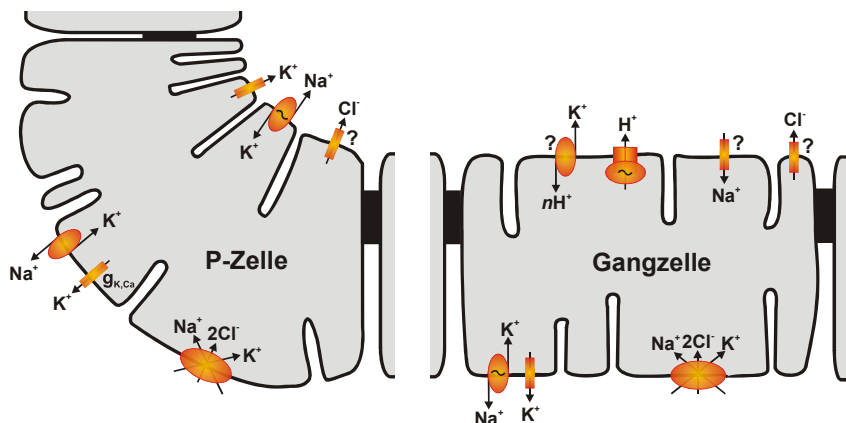
Sekretionsprozesse sowie Lern- und Gedächtnisvorgänge (BLENAU & BAUMANN 2001, BAUMANN *et al.* 2003).

Die Speicheldrüse von *P. americana* wird vom Unterschlundganglion und vom stomatogastrischen Nervensystem innerviert (WHITEHEAD 1971). Die Regulation ihrer sekretorischen Aktivität erfolgt über dopaminerge und serotonerge Neurone, deren Axone auf der Oberfläche der Speicheldrüse ein dichtes Netzwerk bilden. Dabei sind die einzelnen Zelltypen unterschiedlich innerviert. Die P-Zellen sind dopaminerg und serotonerg innerviert, während die C-Zellen ausschließlich serotonerg innerviert sind. Die Ausführungsgangszellen in unmittelbarer Nähe der Acini sind dopaminerg und serotonerg innerviert, während die Innervierung der distal gelegenen Ausführungsgänge nur dopaminerg ist (GIFFORD *et al.* 1991, BAUMANN *et al.* 2002, BAUMANN *et al.* 2004) (Abb. 1.0). Aufgrund dieses Innervationsmusters wird die Aktivität der Speicheldrüse durch die biogenen Amine DA und 5-HT unterschiedlich beeinflusst. Die Badapplikation von DA oder 5-HT bewirkt in isolierten Speicheldrüsen der Schaben *Nauphoeta cinerea* und *P. americana*, deren Innervationsmuster im Wesentlichen identisch sind, die Speichelsekretion (WHITEHEAD 1973, SMITH & HOUSE 1977, 1979, HOUSE & SMITH 1978). Die Qualitäten des gebildeten Speichels unterscheiden sich jedoch. 5-HT bewirkt die Sekretion eines proteinhaltigen Speichels durch die sekretorische Aktivität der P-Zellen und die Exozytose von sekretorischen Vesikeln aus den C-Zellen. DA hingegen bewirkt die Sekretion eines proteinfreien Speichels allein durch die sekretorische Aktivität der P-Zellen. Zusätzlich beeinflusst DA die

Speichelmodifikation durch die Ausführungszellen (JUST & WALZ 1996, LANG & WALZ 1999).

### 1.2.3 Gegenwärtiges Modell der Speichelbildung und -modifikation

Die Mechanismen der Agonist-induzierten Speichelbildung und dessen Modifikation sind nur unzureichend verstanden. Abb. 1.0 fasst die bereits elektrophysiologisch, pharmakologisch und immunzytochemisch nachgewiesenen Transportproteine zusammen, die für die Flüssigkeitssekretion verantwortlich sind. Es wird angenommen, dass die Flüssigkeitssekretion im Wesentlichen auf die sekretorische Aktivität der P-Zellen zurückzuführen ist. Die Stimulierung isolierter Speicheldrüsen mit DA bewirkt eine Hyperpolarisation der basolateralen Membran der P-Zellen von ca. -40 bis -55 mV auf bis zu -100 mV (HOUSE 1980). Diese Hyperpolarisation ist  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig und wird möglicherweise durch die Erhöhung einer  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen  $\text{K}^+$ -Leitfähigkeit ausgelöst (GINSBORG *et al.* 1980a, 1980b). WALZ *et al.* (2006) konnten einen DA-induzierten  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg in den P-Zellen messen. Die DA-induzierte Flüssigkeitssekretion ist von extrazellulärem  $\text{Na}^+$  abhängig (Smith & House 1979). Die pharmakologische Hemmung eines  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ - $2\text{Cl}^-$ -Symporters (NKCC) unterdrückt die DA-induzierte Flüssigkeitssekretion nahezu vollständig (RIETDORF *et al.* 2003). Es wird deshalb ein  $\text{Na}^+$ -Einwärtstransport über die basolaterale Membran der P-Zelle durch einen NKCC angenommen. Der aktive  $\text{Na}^+$ -Transport in das Lumen der Acini erfolgt über eine apikale  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase, die von JUST & WALZ (1994c) immunzytochemisch



**Abb. 1.0** Schematische Darstellung der identifizierten (pharmakologisch, immunzytochemisch und elektrophysiologisch) sowie postulierten (Fragezeichen) Transportproteine, die bei der Speichelbildung und -modifikation eine Rolle spielen. Erläuterungen im Text.

nachgewiesen wurde.  $\text{Cl}^-$  folgt dem  $\text{Na}^+$ -Transport wahrscheinlich passiv. Durch DA-Stimulierung entsteht somit ein isoosmotischer, NaCl-reicher Primärspeichel (GUPTA & HALL 1983).

Die Stimulierung isolierter Speicheldrüsen mit 5-HT bewirkt eine geringere Hyperpolarisation der P-Zellen (BOWSER-RILEY & HOUSE 1976) sowie eine geringere Flüssigkeitssekretion als eine DA-Stimulierung. Auch die 5-HT-induzierte Flüssigkeitssekretion wird durch die NKCC-Hemmung reduziert (HOUSE & SMITH 1978, RIETDORF *et al.* 2003). 5-HT induziert zudem die Proteinsekretion aus den C-Zellen (JUST & WALZ 1996), die über einen  $[\text{cAMP}]_i$ -Anstieg sowie einen  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg vermittelt wird (RIETDORF *et al.* 2005).

Die Speichelmodifikation erfolgt in den Ausführgängen. Die Stimulierung isolierter Speicheldrüsen mit DA bewirkt eine Depolarisation der basolateralen Membran der Ausführungszellen von ca. -63 mV auf bis zu -32 mV (LANG & WALZ 2001). Zudem kommt es zu einem dramatischen  $[\text{Na}^+]_i$ -Anstieg, während  $[\text{K}^+]_i$  sinkt. Eine  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase wurde immunzytochemisch in der basolateralen Membran lokalisiert (JUST & WALZ 1994c). Ihre Hemmung verhindert die Erholung vom DA-induzierten  $[\text{Na}^+]_i$ -Anstieg (LANG & WALZ 2001). Die pharmakologische Hemmung eines NKCC verhindert die DA-induzierten  $[\text{Na}^+]_i$ - und  $[\text{K}^+]_i$ -Änderungen. Es wird angenommen, dass die Ausführgänge den Primärspeichel durch  $\text{Na}^+$ -Resorption und  $\text{K}^+$ -Sekretion modifizieren, da der Endspeichel hypoosmotisch ist und das Na/K-Verhältnis nur noch etwa ein Drittel des Verhältnisses des Primärspeichels entspricht (SMITH & HOUSE 1979, GUPTA & HALL 1983, RIETDORF *et al.* 2003). Die  $\text{Na}^+$ -Resorption könnte dabei durch die Aktivität der basolateralen  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase energetisiert werden.

### 1.3 Zielstellung dieser Arbeit

Die Kenntnisse über die molekularen Teilschritte der Stimulus-Sekretionskopplung in der Speicheldrüse von *P. americana* sind trotz zahlreicher Untersuchungen noch immer unzureichend. Insbesondere zum besseren Verständnis der Mechanismen der Speichelmodifikation in den Ausführgängen ist eine weitere Analyse der beteiligten Transportprozesse und der beteiligten intrazellulären Signalkaskaden nötig.

Die Stimulierung isolierter Speicheldrüsen mit DA führt konzentrationsabhängig zu einem graduierten  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg in den Epithelzellen der Ausführungsgänge, der vollständig auf einen  $Ca^{2+}$ -Influx vom Extrazellularraum zurückzuführen ist (LANG & WALZ 1999). Der genaue Mechanismus dieses DA-induzierten  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegs war bisher nicht bekannt, jedoch wird angenommen, dass der  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg die DA-induzierte Speichelmodifikation reguliert.

In der apikalen Membran der Ausführungszellen wurde immunzytochemisch eine vakuoläre Protonenpumpe (V-H<sup>+</sup>-ATPase) nachgewiesen (JUST & WALZ 1994c). Ihre funktionelle Rolle bei der Speichelmodifikation ist bisher unbekannt. Die Ausführungsgänge modifizieren den Primärspeichel durch Na<sup>+</sup>-Resorption und K<sup>+</sup>-Sekretion. Es wurde bereits für einige Insektenepithelien wie Malpighische Gefäße (MADDRELL & O'DONNELL 1992), Mitteldarm (WIECZOREK 1992) und Speicheldrüse (ZIMMERMANN *et al.* 2003) postuliert, dass eine V-H<sup>+</sup>-ATPase bei der apikalen K<sup>+</sup>-Sekretion beteiligt ist. Die aus mehreren Untereinheiten bestehende V-H<sup>+</sup>-ATPase lässt sich in zwei Domänen aufteilen. Eine katalytische ATP-bindende V<sub>1</sub>-Domäne befindet sich auf der zytosolischen Seite der apikalen Membran, während eine membrangebundene V<sub>0</sub>-Domäne für die H<sup>+</sup>-Translokation verantwortlich ist (WIECZOREK *et al.* 2000, BEYENBACH & WIECZOREK 2006). Die Aktivität der V-H<sup>+</sup>-ATPase baut einen elektrochemischen Protonengradient über der apikalen Membran der Ausführungszellen auf, und energetisiert auf diese Weise die apikale Membran für einen putativen nH<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-Antiporter (Abb. 1.0). Möglicherweise ist die V-H<sup>+</sup>-ATPase auch an der intrazellulären pH-Regulation beteiligt. Ihre Aktivität als *acid extruder* zeigte sich z. B. in Malpighischen Gefäßen und Schweißdrüsen nach einer intrazellulären Ansäuerung (BERTRAM & WESSING 1994, GRANGER *et al.* 2002). Eine solche intrazelluläre Ansäuerung könnte in den Ausführungszellen das Ergebnis einer erhöhten Stoffwechselaktivität während der Speichelmodifikation sein.

Die Osmolarität und das Volumen des Endspeichels werden durch den Ionen- und Flüssigkeitstransport während der Speichelmodifikation in den Ausführungsgängen bestimmt. Die Tatsache, dass die Osmolarität des Endspeichels gegenüber der Osmolarität des Primärspeichels abnimmt, macht einen netto-Wassertransport in das Ausführungslumen unwahrscheinlich (GUPTA & HALL 1983, RIETDORF *et al.* 2003). Über transepitheliale Wasserbewegungen in den Ausführungsgängen liegen aber bisher keine Erkenntnisse vor.

Zum besseren Verständnis der funktionellen Rolle der Ausführungsgänge bei der Modifikation des Primärspeichels wurden deshalb in der vorliegenden Arbeit die folgenden Aspekte untersucht:

- ◆ Mit Hilfe mikrofluorometrischer Messungen der  $[Ca^{2+}]_i$  und der  $[Na^+]_i$  wurden die Ursachen des DA-induzierten  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegs in den Epithelzellen der Ausführungsgänge charakterisiert.
- ◆ Die Beteiligung der V-H<sup>+</sup>-ATPase an der DA-induzierten Modifikation des Primärspeichels in den Ausführungsgängen wurde untersucht, indem mikrofluorometrisch luminale und intrazelluläre pH-Messungen sowie biochemische Messungen der V-H<sup>+</sup>-ATPase-Aktivität durchgeführt wurden.
- ◆ Zur Untersuchung des transepithelialen Wassertransports in den Ausführungsgängen wurde eine videomikroskopische Methode entwickelt.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Substanzen und Lösungen

Laborchemikalien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma (Taufkirchen) im Reinheitsgrad *pro analysis* bezogen. Es wurden verschiedene Ringerlösungen verwendet, deren Zusammensetzung in Tab. 2.0 aufgelistet ist.

**Tab. 2.0** Zusammensetzung der Ringerlösungen (Angaben in mM)

Substanz	Tris-Ringer	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -Ringer	Ca <sup>2+</sup> -freier Ringer	Na <sup>+</sup> -freier Ringer	Cl <sup>-</sup> -freier Ringer	K <sup>+</sup> -freier Ringer	NH <sub>4</sub> Cl-Ringer	Na <sup>+</sup> -freier NH <sub>4</sub> Cl-Ringer
NaCl	160	135	160			160	140	
KCl	10	10	10	10			10	10
CaCl <sub>2</sub>	2	2		2		2	2	2
MgCl <sub>2</sub>	2	2	2	2		2	2	2
Glucose	10	10	10	10	10	10	10	10
Tris	10	5	10	10	10	10	10	10
NaHCO <sub>3</sub>		25						
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>		0,1						
EGTA			2					
Cholin-Cl				160		10		140
Na-isothionat					160			
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>					5			
CaSO <sub>4</sub>					2			
MgSO <sub>4</sub>					2			
NH <sub>4</sub> Cl							20	20
pH <sup>1)</sup>	7,4	7,4		7,4	7,4	7,4	7,4	7,4

<sup>1)</sup> Einstellen des pH mit 1 M HCl bzw. 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> im Cl<sup>-</sup>-freien Ringer

Zum Ansetzen der Lösungen wurde Reinstwasser (Millipore-Qualität, MQ H<sub>2</sub>O) verwendet. Die CO<sub>2</sub>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-gepufferte Ringerlösung wurde zur Einstellung von pH 7,4 mindestens 1 h lang vor und während des gesamten Versuchs mit Carbogen (95 % O<sub>2</sub> / 5 % CO<sub>2</sub>) begast.

Die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe sowie weitere Substanzen sind in Tab. 2.0 zusammengefasst. Die Versuchslösungen wurden unmittelbar vor dem Versuch entweder aus den bei -20 °C gelagerten Stammlösungen oder durch direktes Lösen der Substanzen in der entsprechenden Ringerlösung hergestellt. Die Konzentration des Lösungsmittels Dimethylsulfoxid (DMSO) betrug in den entsprechenden Versuchslösungen soweit nicht anders angegeben ≤ 0,1 % (v/v).

**Tab. 2.0** Verwendete Substanzen

Substanz	Herkunft	Lösungs- mittel	Konz. in der Stamm- lösung	Konz. in der Versuchs- lösung	Funktion
Acetazolamid	Sigma	DMSO	500 mM	500 µM	Hemmstoff der Carbo- anhydrase
Amilorid	Sigma	DMSO	500 mM	1 mM	Hemmstoff von Na <sup>+</sup> -Kanälen, NHE und NCE
BaCl <sub>2</sub>	Sigma	MQ H <sub>2</sub> O	500 mM	6 mM	Hemmstoff von K <sup>+</sup> -Kanälen
Bafilomycin A	Axxora	DMSO	1 mM	1 µM	Hemstoff der H <sup>+</sup> -V-ATPase
BCECF, AM	Invitrogen	DMSO	1 mM	0,5 µM	pH-empfindlicher Fluoreszenzfarbstoff
Bumetanid	Axxora	DMSO	10 mM & 20 mM	10 µM	Hemmstoff des NKCC
Concanamycin A	Sigma	DMSO	5 mM	1 µM	Hemstoff der H <sup>+</sup> -V-ATPase
DIDS	Sigma	0,1 M NaHCO <sub>3</sub>	100 mM	500 µM	Hemmstoff von Anionen- Antiportern
DNP	Sigma	---	---	1 mM	Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung
Dopamin	Sigma	---	---	1 µM	Neurotransmitter
β-Escin	Sigma	DMSO	100 mg/ml	100 µg/ml	Permeabilisierung
EIPA	Sigma	DMSO	100 mM	100 µM	Hemmstoff des NHE
FCCP	Sigma	DMSO	10 mM	1 µM	Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung
Fluo-3, AM	Invitrogen	DMSO	1 mM	3,75 µM	Ca <sup>2+</sup> -empfindlicher Fluoreszenzfarbstoff
Forskolin	Axxora	DMSO	100 mM	100 µM	Aktivator der Adenylatzyklase
Fura-2, AM	Invitrogen	DMSO	1 mM	5 µM	Ca <sup>2+</sup> -empfindlicher Fluoreszenzfarbstoff

Tab. 2.2 Fortsetzung Verwendete Substanzen

Substanz	Herkunft	Lösungs- mittel	Konz. in der Stamm- lösung	Konz. in der Versuchs- lösung	Funktion
HAF	Invitrogen	DMSO	20 mM	30 $\mu$ M	pH-empfindlicher Fluoreszenzfarbstoff
IBMX	Sigma	DMSO	1 M & 500 mM	500 $\mu$ M	Hemmstoff von Phosphodiesterasen
Ionomycin	Axxora	DMSO	10 mM & 20 mM	10 $\mu$ M	Ca <sup>2+</sup> -Ionophor
LaCl <sub>3</sub>	Merck	MQ H <sub>2</sub> O	100 mM	100 $\mu$ M	Hemmstoff Ca <sup>2+</sup> -abhängiger Transportprozesse
Methazolamid	Sigma	DMSO	500 mM	500 $\mu$ M	Hemmstoff der Carbo- anhydrase
MnCl <sub>2</sub>	Sigma	---	---	20 mM	Unterdrückung der Fura-2- Fluoreszenz
Oligomycin	Axxora	DMSO	2,5 mg/ml	2,5 $\mu$ g/ml	Hemmstoff der F-ATP- Synthase
Ouabain	Sigma	MQ H <sub>2</sub> O	10 mM	100 $\mu$ M	Hemmstoff der Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> - ATPase
SBFI, AM	Invitrogen	DMSO <sup>1)</sup>	2 mM	15 $\mu$ M	Na <sup>+</sup> -empfindlicher Fluoreszenzfarbstoff
Serotonin	Sigma	MQ H <sub>2</sub> O	10 mM	1 $\mu$ M	Neurotransmitter
Sulforhodamin	Invitrogen	MQ H <sub>2</sub> O	1 mM	100 $\mu$ M	Fluoreszenzfarbstoff
TMRE	Invitrogen	DMSO	5 mM	0,2 $\mu$ M	Marker für Mitochondrien
Triton X-100	Sigma	---	---	1 % (v/v)	Permeabilisierung

<sup>1)</sup> inkl. 16,7 % Pluronic F-127

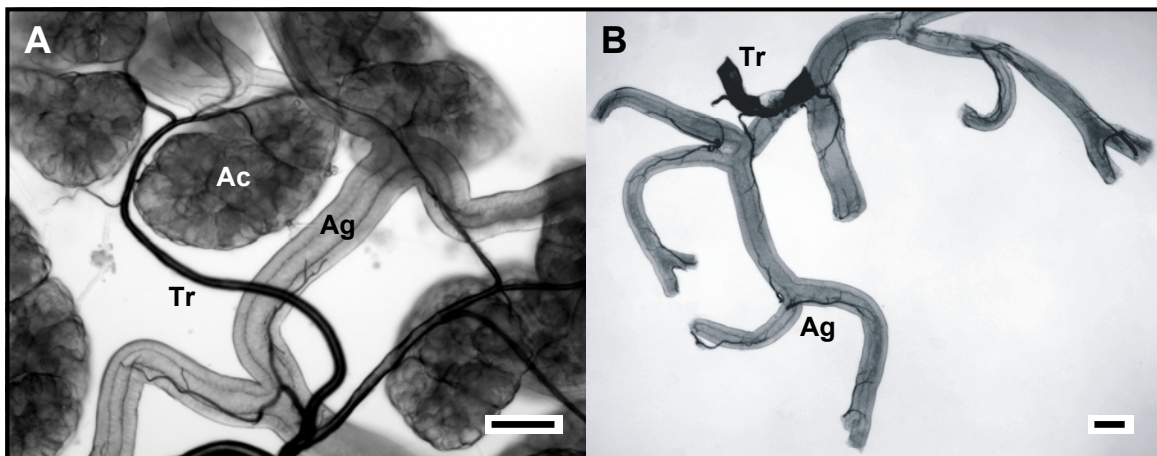
## 2.2 Präparation der Speicheldrüsen

Schaben der Art *Periplaneta americana* (L.) (Blattodea, Blattidae) wurden bei 27 °C und einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 12 h : 12 h gehalten. Die Tiere hatten freien Zugang zu Futter und Wasser. Für die Versuche wurden nur männliche Imagines im Alter von 4-6 Wochen verwendet.

Nach Entfernen des Kopfes, der Beine und der Flügel wurde das Versuchstier in einer mit Ringerlösung (je nach Versuch Tris-Ringer oder HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Ringer) gefüllten Petrischale mittels zweier Insektennadeln fixiert. Das Tier wurde dorsal mit Hilfe einer Schere median geöffnet. Durch das Herausziehen des Vorderdarms mittels



einer gebogenen Pinzette konnte die sich beidseits des Vorderdarms befindliche paarige Speicheldrüse freigelegt werden. Ausgehend von der isolierten Speicheldrüse konnten zwei verschiedene Präparate hergestellt werden. Zum einen wurden einzelne Loben, bestehend aus wenigen Acini mit dazugehörigem verzweigtem Ausführungssystem, präpariert und untersucht (Abb. 2.0A). Zum anderen wurden von den einzelnen Loben die Acini entfernt, so dass ein isoliertes, verzweigtes Ausführungssystem untersucht werden konnte (Abb. 2.0B).



**Abb. 2.0** Lichtmikroskopische Aufnahmen isolierter Speicheldrüsen. (A) Ausschnitt eines Lobus mit Acini und Ausführungsgängen. (B) Isoliertes Ausführungssystem ohne Acini. Ac Acini, Ag Ausführungsgang, Tr Tracheole. Balken = 100  $\mu$ m.

Die Präparate wurden für biochemische Methoden in mit Ringerlösung gefüllten Blockschälchen gesammelt.

Bei der Anwendung von mikroskopischen Methoden wurden die Präparate nach einer Inkubation mit Fluoreszenzfarbstoffen oder ohne weitere Behandlung einzeln auf Deckgläschen (20  $\times$  60 mm) fixiert. Dazu wurden die Deckgläschen unmittelbar vor der Verwendung mit 1,5  $\mu$ l Cell-Tak™ (BD Biosciences, Heidelberg), einem Haftmittel, beschichtet und bei 60 °C kurz getrocknet. Um mit Haftmittel versehene Deckgläschen längere Zeit lagern zu können, wurde auch eine zweite Methode angewendet. Dabei wurden die Deckgläschen zuerst 5 min lang mit Aceton (Roth, Karlsruhe) gereinigt. Dann wurden die Deckgläschen weitere 5 min mit dem in Aceton gelösten Haftmittel Vectabond™ (Axxora, Grünberg) inkubiert. Die so beschichteten Deckgläschen wurden dann mit MQ H<sub>2</sub>O gewaschen, bei 60 °C getrocknet und maximal einen Monat lang bei Raumtemperatur gelagert und verwendet.

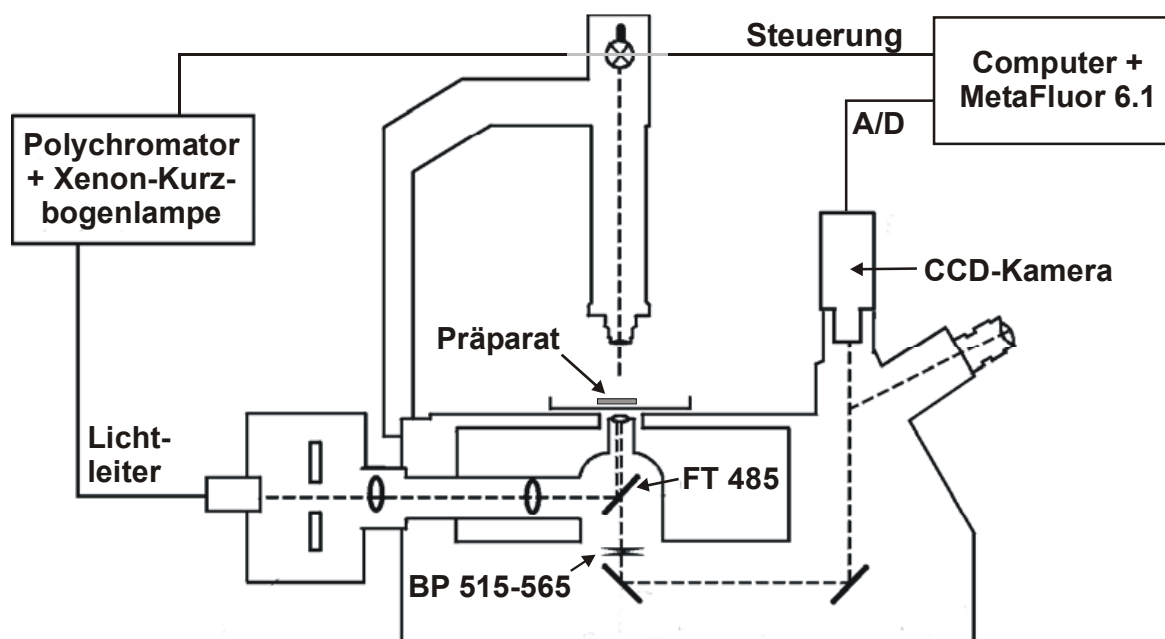
Eine Versuchskammer ohne Boden wurde mittels Vaseline (Roth, Karlsruhe) auf das mit einem Präparat versehene Deckgläschen festgeklebt. Auf diese Weise wurde das Deckgläschen zum Boden der Versuchskammer. Diese Kammer wurde auf dem Objektisch eines inversen Mikroskops befestigt. Das Präparat konnte während des gesamten Experiments mit einer Ringerlösung bzw. mit pharmakologisch wirksamen Substanzen mittels eines Zu- und Abflusses umspült werden.

## 2.3 Mikrofluorometrische Messungen von Ionenkonzentrationen

### 2.3.1 Fluoreszenzmikroskop

Die Fluoreszenzmessungen erfolgten an einem inversen Mikroskop (Axiovert 135TV, Zeiss, Jena), das auf einem schwingungsgedämpften Tisch befestigt war (Abb. 2.0). Als Objektiv wurde ein Fluar 20×/0,75 (Zeiss, Jena) verwendet. Als Lichtquelle diente eine 75 W Xenon-Kurzbogenlampe (Ushio, Steinhöring), die sich in einem VisiChrome High-Speed Polychromator (Visitron Systems, Puchheim) befand, der das Licht spektral aufteilte. Das monochromatische Licht wurde mittels eines Quarz-Lichtleiters in den Strahlengang des Mikroskops eingekoppelt. Das Anregungslicht wurde mittels eines Farbteilers FT 485, der Licht mit einer Wellenlänge < 485 nm reflektierte, auf das Präparat gelenkt. Das emittierte Licht mit einer Wellenlänge > 485 nm konnte den Farbteiler passieren. Im Emissionsstrahlengang befand sich ein Bandpass BP 515-565, so dass bei allen Messungen nur die Emission zwischen 515-565 nm detektiert wurde. Die gewählten Anregungswellenlängen und Belichtungszeiten sind in den jeweiligen Abschnitten zu den verwendeten Farbstoffen aufgelistet. Bei allen Messungen erfolgte die Anregung in einem Intervall von 15 s bei Perfusion der Präparate mit einer Ringerlösung bzw. 10 s bei Perfusion mit einer pharmakologisch wirksamen Substanz.

Die Bildaufnahme und Digitalisierung erfolgte mit einer gekühlten CCD-Kamera (CoolSnap-HQ; Roper Scientific Inc., Tucson, USA) bei einer Farbtiefe von 12 bit. Jeweils neun Bildpunkte wurden miteinander verrechnet ( $3 \times 3$  binning), so dass die aufgenommenen Bilder eine Größe von  $464 \times 346$  Bildpunkten hatten. Die



**Abb. 2.0** Schematische Darstellung des mikroskopischen Aufbaus für mikrofluorometrische Messungen von Ionenkonzentrationen. Erläuterungen siehe Text.

Steuerung des Polychromators, der Bildaufnahme sowie die Bildbearbeitung erfolgten mit dem Computerprogramm MetaFluor 6.1 (Universal Imaging Corp., Downingtown, USA). Zur Auswertung wurden die Änderungen der Fluoreszenzintensitäten in einem Bildbereich variierender Größe (ROI, *region of interest*) berechnet. Es wurde dabei darauf geachtet, dass die Änderungen repräsentativ für das gesamte Präparat und nicht spezifisch nur für einen Bereich waren.

### 2.3.2 Fluoreszenzfarbstoffe

Zur Erfassung von Änderungen der intrazellulären sowie luminalen Konzentration von Ionen wurden ionenempfindliche Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt. Auf eine absolute Kalibrierung der registrierten Fluoreszenzsignale wurde verzichtet, da einerseits entsprechende *in situ* Kalibrierungen im Ausführungssystem nicht etabliert werden konnten und andererseits *in situ* wie *in vitro* Kalibrierungen intrinsische Fehler haben (BORZAK *et al.* 1992, BOYARSKY *et al.* 1996, BAYLOR & HOLLINGWORTH 2000, DIARRA *et al.* 2001). Somit wurden nur qualitative Aussagen zu den Änderungen der gemessenen Ionenkonzentrationen vorgenommen.

Für Simultanmessungen mit zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen wurden solche Farbstoffe ausgewählt, die überschneidende Emissionsspektren, aber deutlich voneinander getrennte Anregungsmaxima besitzen. Die somit registrierte Emission konnte je nach Anregungswellenlänge einem der beiden Farbstoffe zugeordnet werden. Fluoreszenzfarbstoffe können sich aber gegenseitig durch ihre spektralen Eigenschaften beeinflussen (ZAVOICO & CRAGOE 1988). Eine geringfügige Überschneidung der Anregungsspektren abseits der Anregungsmaxima führt dazu, dass der zweite Farbstoff bei Anregung des ersten immer geringfügig mit angeregt wird. Andererseits kann sich das Emissionsspektrum des mit kürzeren Wellenlängen angeregten Farbstoffs geringfügig mit dem Anregungsspektrum des bei längeren Wellenlängen angeregten Farbstoffs überschneiden, so dass dieser dann auch angeregt wird. Dies hätte eine Verfälschung bei der Bestimmung der absoluten Ionenkonzentrationen zur Folge. Auch aus diesem Grund wurden nur relative Änderungen der gemessenen Ionenkonzentrationen erfasst.

Es wurden veresterte lipophile Formen der Farbstoffe, sogenannte Acetoxymethylester (AM), genutzt. Als AM-Ester diffundieren die Farbstoffe durch die Plasmamembran in die Zellen. Intrazellulär werden sie durch unspezifische Esterasen in die ionenempfindliche Form der Farbstoffe überführt. Diese freien Säuren der Farbstoffe sind hydrophil und können die Zelle nicht mehr verlassen, was zu ihrer Anreicherung im Zytosol führt.

### 2.3.3 Messung der intrazellulären $\text{Ca}^{2+}$ Konzentration

Für Messungen der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration von  $([\text{Ca}^{2+}]_i)$  in den Ausführungszellen wurde der AM-Ester des  $\text{Ca}^{2+}$ -empfindlichen Fluoreszenzfarbstoffs Fura-2 verwendet. Die Präparate wurden bei Raumtemperatur auf einem Schüttler 30-40 min lang mit 5  $\mu\text{M}$  Fura-2/AM in Tris-Ringerlösung inkubiert. Anschließend wurden die Präparate auf Deckgläschen fixiert und mit Tris-Ringerlösung gewaschen. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -freie Form des Fura-2 besitzt ein Absorptionsmaximum bei 380 nm. Nach  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung verschiebt Fura-2 sein Absorptionsmaximum zu 340 nm. Bei einer Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  steigt demnach die bei einer Anregungswellenlänge von 340 nm gemessene Fluoreszenzintensität, während sie bei einer Anregungswellenlänge von 380 nm

sinkt. Fura-2 wurde nacheinander bei den Wellenlängen 340 nm und 380 nm jeweils 150-200 ms lang angeregt und die Fluoreszenzintensitäten ( $F_{340}$  und  $F_{380}$ ) gemessen. Am Ende jedes Versuches wurde badseitig 20 mM  $MnCl_2$  appliziert, um die Fura-2-Fluoreszenz zu unterdrücken. Dadurch konnte der Beitrag der Hintergrund- und Zellautofluoreszenz ermittelt werden. Änderungen der  $[Ca^{2+}]_i$  wurden als Quotienten (*ratio*) beider Fluoreszenzintensitäten ( $F_{340}/F_{380}$ ) nach Abzug der Hintergrundfluoreszenz dargestellt.

### 2.3.4 Messung des intrazellulären pH

Für Messungen des intrazellulären pH ( $pH_i$ ) in den Ausführungszellen wurde der AM-Ester des pH-empfindlichen Fluoreszenzfarbstoffs 2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5-(und-6)-carboxyfluorescein (BCECF) verwendet. Die Präparate wurden bei Raumtemperatur auf einem Schüttler 10 min lang mit 0,5  $\mu M$  BCECF/AM in Tris-Ringerlösung inkubiert. Anschließend wurden die Präparate auf Deckgläschen fixiert und mit Tris-Ringerlösung gewaschen. Die pH-Abhängigkeit des BCECF beruht auf einer Deprotonierung des BCECF-Moleküls bei Alkalisierung. Die Deprotonierung führt zu einer Verschiebung des Absorptionsspektrums zu längeren Wellenlängen. Bei einer Alkalisierung sinkt die bei einer Anregungswellenlänge von 410 nm gemessene Fluoreszenzintensität, während sie bei einer Anregungswellenlänge von 470 nm steigt. BCECF wurde nacheinander bei den Wellenlängen 410 nm (20-160 ms lang) und 470 nm (5-40 ms lang) angeregt. Um bei der Anregung mit beiden Anregungswellenlängen ungefähr gleiche Fluoreszenzintensitäten zu erhalten, betrug die Belichtungszeit bei der Anregungswellenlänge 470 nm nur 25 % der Belichtungszeit bei 410 nm. Änderungen des  $pH_i$  wurden als Quotienten (*ratio*) beider Fluoreszenzintensitäten ( $F_{470}/F_{410}$ ) dargestellt. Da einige der verwendeten pharmakologisch wirksamen Substanzen bei Belichtung mit UV-Licht fluoreszieren, wurde in diesen Experimenten BCECF bei 450 nm und 480 nm jeweils 5-40 ms lang angeregt und Änderungen des  $pH_i$  als  $F_{480}/F_{450}$  dargestellt.

### 2.3.5 Simultane Messung der intrazellulären $\text{Ca}^{2+}$ Konzentration und des intrazellulären pH

Für simultane Messungen von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  und  $\text{pH}_i$  in Ausführungszellen wurden die AM-Ester von Fura-2 und BCECF verwendet, wie in Kap. 2.3.3 und Kap. 2.3.4 beschrieben. Dazu wurden die Präparate zunächst 30 min lang in Fura-2/AM und anschließend für weitere 10 min in BCECF/AM + Fura-2/AM inkubiert. Die Präparate wurden nacheinander bei den Wellenlängen 340 nm, 380 nm, 450 nm und 480 nm angeregt. Es wurden die Quotienten der Fluoreszenzintensitäten  $F_{340}/F_{380}$  nach Abzug der Hintergrundfluoreszenz für Änderungen der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  und  $F_{480}/F_{450}$  für Änderungen des  $\text{pH}_i$  berechnet.

### 2.3.6 Simultane Messung der intrazellulären $\text{Na}^+$ und $\text{Ca}^{2+}$ Konzentrationen

Für simultane Messungen der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  und der intrazellulären  $\text{Na}^+$  Konzentration ( $[\text{Na}^+]_i$ ) in Ausführungszellen wurden die AM-Ester des  $\text{Ca}^{2+}$ -empfindlichen Fluoreszenzfarbstoffs Fluo-3 und des  $\text{Na}^+$ -empfindlichen Fluoreszenzfarbstoffs Natrium-bindendes Benzofuran-Isophthalat (SBFI) verwendet. Dazu wurden die Präparate bei Raumtemperatur auf einem Schüttler 150-180 min lang mit 3,75  $\mu\text{M}$  Fluo-3/AM und 15  $\mu\text{M}$  SBFI/AM in Gegenwart von 0,125 % Pluronic F-127 (Invitrogen, Karlsruhe) in Tris-Ringerlösung inkubiert. Anschließend wurden die Präparate auf Deckgläschen fixiert und mit Tris-Ringerlösung gewaschen. Die Präparate wurden nacheinander bei den Wellenlängen 340 nm und 360 nm (zur Anregung des SBFI) jeweils 200 ms lang, sowie bei 480 nm (zur Anregung des Fluo-3) 10-20 ms lang angeregt. Die Fluo-3-Fluoreszenzintensität  $F_{480}$  kennzeichnete relative Änderungen der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Änderungen der  $[\text{Na}^+]_i$  wurden als Quotienten der Fluoreszenzintensitäten  $F_{340}/F_{360}$  dargestellt.

### 2.3.7 Messung des pH an der luminalen Oberfläche des Ausführungsgangs

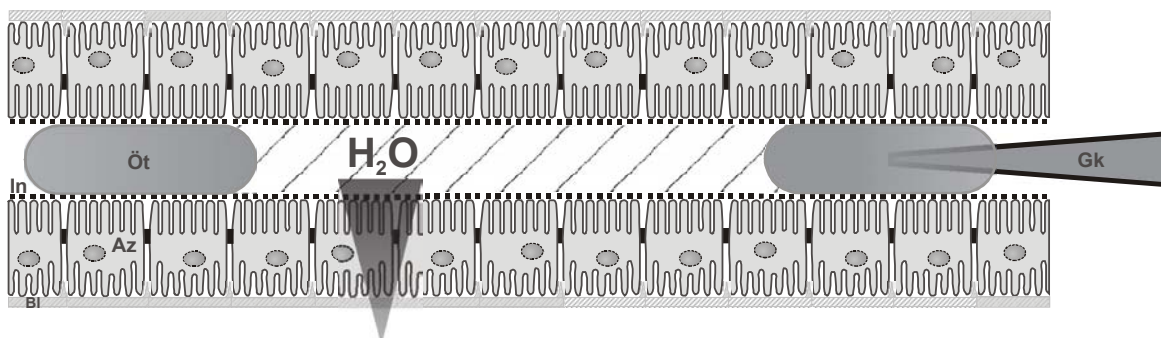
Für Messungen des pH an der Oberfläche des Lumens isolierter Ausführungsgänge ( $\text{pH}_s$ ) wurde der pH-empfindliche Fluoreszenzfarbstoff 5-N-Hexadecanoylamino-fluorescein (HAF) verwendet. HAF ist nicht membrangängig und wurde deshalb in

das Lumen isolierter Ausführgänge ohne Acini injiziert. Die Präparate wurden zuvor auf Deckgläschen fixiert. Für die Injektion benötigt man Kapillaren mit sehr kleinem Spitzendurchmesser. Diese wurden aus Glaskapillaren mit Filament (WPI, Berlin; Außendurchmesser 1 mm, Innendurchmesser 0,58 mm) an einem Elektroden-Ziehgerät (Narishige, Tokio, Japan) hergestellt. Die fertigen Kapillaren wurden mit 30  $\mu$ M HAF in Tris-Ringerlösung befüllt und unter optischer Kontrolle mit Hilfe eines Mikromanipulators (Narishige, Tokio, Japan) an einem Ende des isolierten Ausführgangsystems in dessen Lumen geführt. Die Kapillare war mit einem Druck-Injektionsgerät (WPI, Sarasota, USA) verbunden. Durch mehrere kurze Druckluftpulse ( $< 20$  psi) konnte die HAF-Lösung in das Ausführganglumen injiziert werden. Anschließend wurden die Präparate mit Tris-Ringerlösung gewaschen.

Die injizierte HAF-Lösung verteilte sich im Ausführganglumen. Die lipophile Kohlenwasserstoffkette des Farbstoffs geht in das äußere Blatt der apikalen Plasmamembran, während die pH-sensitive Farbstoffgruppe zum Ausführganglumen hin exponiert ist. Dadurch verbleibt der Farbstoff fest an der luminalen Oberfläche und registriert den extrazellulären pH in unmittelbarer Nähe der apikalen Plasmamembran. Im Lumen verbleibendes, nicht verankertes HAF fluoresziert nicht, da der pH-sensitive Teil offenbar von der Kohlenwasserstoffkette umschlungen und somit maskiert ist. HAF zeigt wie BCECF bei Alkalisierung eine Verschiebung seines Absorptionsspektrums zu längeren Wellenlängen. HAF wurde nacheinander bei den Wellenlängen 410 nm (20-160 ms) und 470 nm (5-40 ms) angeregt. Zum Angleich beider Fluoreszenzintensitäten betrug die Belichtungszeit bei der Anregungswellenlänge 470 nm nur 25 % der Belichtungszeit bei 410 nm. Änderungen des  $pH_s$  wurden als Quotienten beider Fluoreszenzintensitäten ( $F_{470}/F_{410}$ ) dargestellt.

#### **2.4 Differential-Interferenzkontrast- und Fluoreszenzmikroskopie zur Untersuchung des transepithelialen Wassertransports**

Zum Nachweis des transepithelialen Wassertransports in isolierten Ausführgängen der Speicheldrüse wurde eine einfache Methode entwickelt (Abb. 2.0). Zunächst wurden isolierte, verzweigte Ausführgänge ohne Acini auf Deckgläschen fixiert. Im nächsten Schritt wurden unter optischer Kontrolle zwei Paraffinöltropfen (Roth,



**Abb. 2.0** Schematische Darstellung der Methode zum Nachweis des transepithelialen Wassertransports. In das Lumen eines isolierten Ausführungssystems, bestehend aus Ausführungszellen (Az) mit Basallamina (Bl) und Intima (In), werden mittels einer Glaskapillare (Gk) zwei Öltropfen (Öt) injiziert. Veränderungen der als schraffierte Fläche dargestellten Flüssigkeitssäule kennzeichnen einen transepithelialen Wassertransport.

Karlsruhe) in das Lumen der Ausführungsgänge injiziert. Dazu wurden Glaskapillaren wie in Kap. 2.3.7 beschrieben hergestellt und mit Hilfe einer sehr dünn ausgezogenen Plastikspritze ohne Kanüle mit Paraffinöl befüllt. Zur Druckinjektion wurde die Kapillare in einen Mikromanipulator gespannt und mit einem Druck-Injektionsystem versehen. Zwischen beiden injizierten Öltropfen sollte sich ein unverzweigtes Stück des Ausführungsgangs befinden. Je nach Verzweigung der Präparate wurden die Öltropfen deshalb entweder von zwei offenen Enden aus ins Lumen injiziert, oder die Injektion erfolgte von nur einem offenen Ende aus. Hierzu wurde die Kapillare zunächst so weit wie möglich in das Lumen geführt, um einen ersten Öltropfen zu setzen. Nach dem Zurückziehen der Kapillare konnte dann ein zweiter Öltropfen im Bereich der Ausführungsgangöffnung injiziert werden. In einigen Versuchen wurde zudem der Fluoreszenzfarbstoff Sulforhodamin (100 µM gelöst in 160 mM NaCl, 10 mM KCl, 2 mM Tris, pH 7,4 mit 1 M HCl) als Volumenmarker mittels einer zweiten Glaskapillare zwischen die beiden Öltropfen in das Lumen injiziert.

Änderungen der Flüssigkeitssäule zwischen beiden Öltropfen im Lumen des Ausführungsgangs wurden mit Hilfe des inversen Mikroskops Axiovert 135TV (Zeiss, Jena) untersucht. Dazu wurde die Versuchskammer mit dem Öltropfen-injizierten Präparat auf dem Objektisch des Mikroskops befestigt, wodurch ein konstanter Lösungsaustausch während des gesamten Versuchs möglich war. Es konnten während des Versuchs auch pharmakologisch wirksame Substanzen luminal mittels einer weiteren Glaskapillare zwischen beide Öltropfen injiziert werden. Um dies zu ermöglichen, wurde einerseits ein abgewandeltes Zufluss-Ablauf-System



benutzt und zum anderen während der Injektion die Datenaufnahme unterbrochen.

Die Fluoreszenzmikroskopie, Bildaufnahme und -verarbeitung erfolgten, wenn nicht anders erwähnt, wie in Kap. 2.3.1 beschrieben. Das Präparat wurde zunächst so fokussiert, dass der größtmögliche Lumen-Querschnitt des Ausführungsegments zwischen den beiden Öltropfen scharf abgebildet war. In einem Intervall von 10 s wurden Bilder im differentiellen Interferenzkontrast (DIK-Mikroskopie) mit Hilfe des Computerprogramms MetaMorph 6.1 (Universal Imaging Corp., Downingtown, USA) aufgenommen. Die DIK-Mikroskopie ermöglicht die Kontrastierung von Strukturen, die sich im Brechungsindex unterscheiden. Die somit entstehenden reliefartigen Bilder lassen eine optimale Unterscheidung von Öltropfen und Ausführungsgang zu. Der als Volumenmarker verwendete Fluoreszenzfarbstoff Sulforhodamin wurde bei einer Wellenlänge von 560 nm angeregt (Farbteiler FT 580) und seine Fluoreszenz ( $F_{560}$ ) im Bereich  $> 590$  nm detektiert (Langpass LP 590).

Mit MetaMorph 6.1 wurde die Volumenänderung der Flüssigkeitssäule zwischen beiden Öltropfen ermittelt. Dazu wurde die Fläche des Lumens, die von beiden Öltropfen umschlossen wurde, für jeden Zeitpunkt berechnet. Diese Fläche entsprach der optischen Schnittebene eines medianen Längsschnitts durch die Flüssigkeitssäule. Unter der Vereinfachung, dass die Flüssigkeitssäule zylindrisch ist, wurde zudem aufgrund der Volumen-Flächen-Beziehung für Zylinder das Volumen ( $V$ ) berechnet.

$$V = A \times \frac{\pi}{2} \times r^2 \quad \text{A: berechnete Fläche, r: Radius des Lumens}$$

## 2.5 Konfokale Laser-Rastermikroskopie zur Analyse der Verteilung von Fluoreszenzfarbstoffen

Die konfokale Laser-Rastermikroskopie ermöglicht optische Schnitte durch dicke Präparate, weil Licht aus Nichtfokusebenen mittels einer Lochblende (*pinhole*) ausgeblendet und somit nicht detektiert wird. Die Verteilung der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe in den Ausführungsgängen wurde deshalb mit Hilfe eines konfokalen Laser-Rastermikroskops (LSM 510, Zeiss, Jena) untersucht. Als Objektiv diente ein Achroplan 40×/0,8 W (Zeiss, Jena). Zur Analyse der

Lokalisation von BCECF, HAF und Sulforhodamin wurden die Präparate zunächst wie oben beschrieben vorbehandelt. Zusätzlich wurden isolierte Ausführungssysteme mit 0,5  $\mu\text{M}$  BCECF/AM zusammen mit 0,2  $\mu\text{M}$  TMRE (Tetramethylrhodaminester) in Tris-Ringerlösung 15 min lang auf einem Schüttler inkubiert. Die mit dem Präparat versehene Versuchskammer wurde auf dem Objektisch des konfokalen Mikroskops befestigt. Bei BCECF- und HAF-markierten Präparaten wurde während des Versuchs kein Lösungsaustausch vorgenommen. Bei Sulforhodamin-markierten Präparaten erfolgte während des Versuchs ein ständiger Austausch der  $\text{HCO}_3^-$ -Ringerlösung. BCECF und HAF wurden mit einem 488 nm Argonlaser angeregt und die Fluoreszenz mittels eines Langpasses bei  $> 505$  nm detektiert. Die mit BCECF und dem Mitochondrienmarker TMRE doppelt markierten Präparate wurden nacheinander mit einem 488 nm Argonlaser und einem 543 nm Helium-Neonlaser angeregt und die Fluoreszenzen mittels eines Bandpasses bei 505-530 nm sowie mittels eines Langpasses bei  $> 560$  nm detektiert. Sulforhodamin wurde bei 543 nm angeregt und die Fluoreszenz bei  $> 560$  nm detektiert. Bei allen Fluoreszenzmessungen wurden zu jedem Messzeitpunkt auch Bilder der Präparate im differentiellen Interferenzkontrast aufgenommen. Diese Bilder wurden mit Hilfe des Programms LSM Image Browser Vers. 3.2 (Zeiss, Jena) ausgewertet.

## 2.6 Messung der ATPase-Aktivität

Zur Untersuchung der Expression der  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase und der  $\text{V-H}^+$ -ATPase in der Speicheldrüse wurde die Aktivität beider Ionentransport-ATPasen in homogenisierten Speicheldrüsen mit einer biochemischen Methode bestimmt. Dazu wurde pro Versuch eine in Tris-Ringerlösung präparierte Speicheldrüse in zwei gleichgroße Hälften geteilt. Die eine Hälfte wurde 3 min in Ringerlösung inkubiert, während die andere Hälfte mit der entsprechenden Testsubstanz (1  $\mu\text{M}$  DA, 1  $\mu\text{M}$  5-HT, 100  $\mu\text{M}$  cis(Z)-Flupenthixol, 100  $\mu\text{M}$  Chlorpromazin, 100  $\mu\text{M}$  S(+)-Butaclamol oder Niedrig-NaCl-Medium) behandelt wurde. Danach wurden beide Hälften getrennt auf Eis in 100  $\mu\text{l}$  Extraktionslösung in einem Handhomogenisator (NeoLab, Heidelberg) 5 min lang homogenisiert.

Zur Bestimmung der ATPase-Aktivität wurden 5  $\mu\text{l}$  Homogenat mit der Reaktionslösung, 4 % DMSO (Lösungsmittel von Bafilomycin A) und 5 mM

Na<sub>2</sub>ATP (zum Starten der Reaktion) auf 100 µl Endvolumen angesetzt. Die Ansätze, in denen sich Homogenat der Testsubstanz-behandelten Drüsenhälfte befand, enthielten außerdem die Testsubstanz in der entsprechenden Konzentration. Zur Feststellung der ATPase-Aktivitäten von Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase und V-H<sup>+</sup>-ATPase wurden die spezifischen Hemmstoffe Bafilomycin A (1 µM) oder Ouabain (1 mM) den entsprechenden Ansätzen zugegeben.

Nach einer Inkubationszeit von 1 h bei 30 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 µl 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gestoppt. Die Ansätze wurden dann bei 18000 g bei 4 °C 10 min lang zentrifugiert. 100 µl des Überstands wurden mit 300 µl 0,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> sowie 600 µl Färbelösung für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das während der Reaktion durch die ATPase-Aktivität freigewordene anorganische Phosphat (P<sub>i</sub>) konnte als Phosphomolybdatkomplex durch die photometrische Bestimmung der Absorption bei einer Wellenlänge von 707 nm gegen einen Referenzansatz nachgewiesen werden (Zweistrahl-Spektrophotometer Varian Cary 50, Darmstadt). Für den Referenzansatz wurde Homogenat-freie Extraktionslösung verwendet. In einem 100 µl-Ansatz führt hierbei die Bildung von 10 nM P<sub>i</sub> zu einer Veränderung der Absorption um 0,36 bei 707 nm (BONTING *et al.* 1961). Die ATPase-Aktivitäten wurden pro Drüse und Stunde kalkuliert.

Für die Untersuchung der ATPase-Aktivitäten in isolierten Ausführgängen wurden verzweigte Gangsysteme aus 5 Speicheldrüsen präpariert. Etwa die Hälfte der Gänge wurde mit Ringerlösung inkubiert, während die andere Hälfte mit der entsprechenden Testsubstanz behandelt wurde. Die weiteren Schritte erfolgten wie oben beschrieben. Die ATPase-Aktivitäten wurden hierbei pro mg Protein und Stunde kalkuliert. Dazu wurde der Proteingehalt der Ansätze modifiziert nach BRADFORD mittels Roti-Nanoquant (Roth, Karlsruhe) bestimmt. Die Berechnung der Proteinmengen beruhte auf einer zuvor durchgeführten Kalibrierung mit definierten Konzentrationen von Rinderserumalbumin (Sigma, Taufkirchen).

Extraktionslösung:	0,3 M Saccharose, 0,1 M Imidazol, 0,1 mM EGTA, 0,1 % β-Mercaptoethanol, pH 7,4 mit 1 M HCl, Proteinase-Inhibitor-Cocktail (Endkonzentrationen: 0,3 µg/ml Leupeptin, 0,3 µg/ml Pepstatin A, 30 µg/ml Pefabloc SC), 1 µM okadaic acid (nur bei mit Testsubstanz behandelter Drüsenhälfte)
Reaktionslösung:	140 mM NaCl, 37,5 mM KCl, 6,25 mM MgCl <sub>2</sub> , 0,1 M Imidazol, 0,1 mM EGTA, pH 7,4 mit 1 M HCl, 1 µM okadaic acid (nur bei mit Testsubstanz behandelter Drüsenhälfte)
Färbelösung:	1,7 g Ammoniummolybdat in 50 ml 1 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> und 340 mg FeSO <sub>4</sub> in H <sub>2</sub> O, beide Lösungen 1:1 mischen

## 2.7 Statistische Auswertung

Aus einer Speicheldrüse wurde jeweils nur eine Präparation für ein Experiment verwendet. Zur Eliminierung individueller Schwankungen wurden, wenn möglich, beobachtete Effekte auf eine zu Beginn des Experiments erfolgte Kontrollstimulierung mit 1  $\mu$ M DA normiert. Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (SE) dargestellt. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism 4.01 (Graph Pad Software, San Diego, USA). Das Signifikanzniveau für die statistische Auswertung lag bei  $P < 0,05$ . Die Datensätze wurden auf Normalverteilung getestet, so dass parametrische Tests verwendet werden konnten. Zwei unabhängige Datensätze wurden mit dem Student's *t*-Test verglichen, während der Vergleich von zwei abhängigen Datensätzen mit dem gepaarten Student's *t*-Test erfolgte. Mehr als zwei unabhängige Datensätze wurden mit einer Ein-Wege ANOVA und sich anschließenden Dunnett's *post-hoc* Tests statistisch ausgewertet. Bei mehr als zwei abhängigen Datensätzen wurde eine ANOVA mit Messwiederholungen (*repeated-measures* ANOVA) mit sich anschließenden Dunnett's *post-hoc* Tests verwendet.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 DA-induzierter $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg in den Ausführungsgängen isolierter Loben

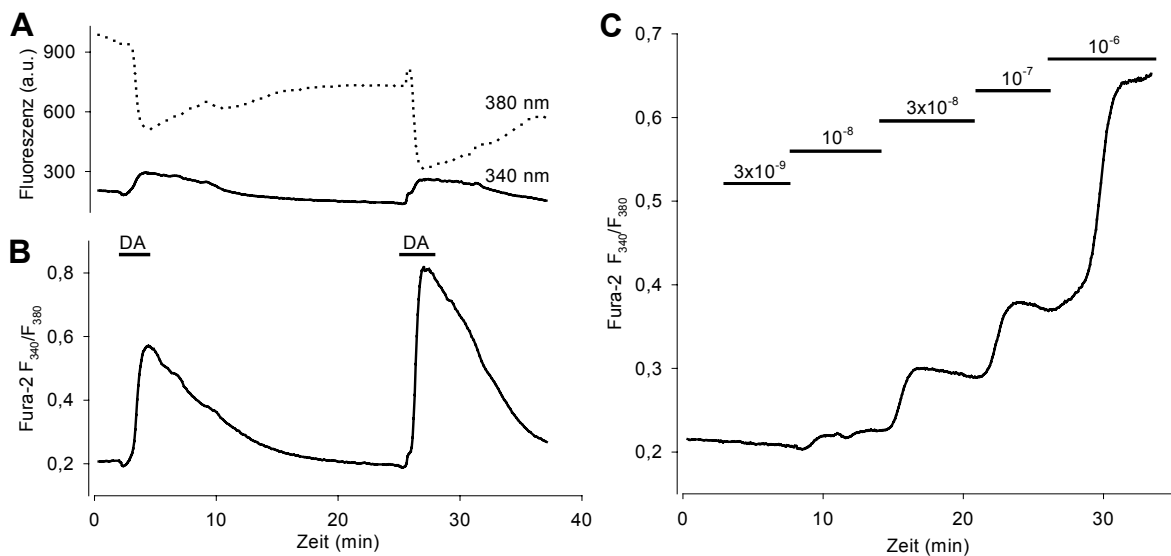
#### 3.1.1 Graduierter $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg

Die Stimulierung isolierter Speicheldrüsen mit DA führt in den Epithelzellen der Ausführungsgänge zu einem reversiblen, langsamen Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$ . Diese intrazelluläre Calciumerhöhung breitet sich als „ $Ca^{2+}$ -Welle“ über das Epithel aus (LANG & WALZ 1999). Es wurde anhand nachfolgender Experimente untersucht, welche Mechanismen für die DA-induzierten Änderungen der  $[Ca^{2+}]_i$  verantwortlich sind. Die Versuche wurden an isolierten Loben der Speicheldrüse durchgeführt, die sowohl Acini als auch Ausführungsgänge besaßen.

$[Ca^{2+}]_i$ -Änderungen wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 gemessen, dessen Absorptionsmaximum sich bei  $Ca^{2+}$ -Bindung zu niedrigeren Wellenlängen verschiebt. Während der DA-induzierten Änderungen der  $[Ca^{2+}]_i$  zeigten sich gegenläufige Fluoreszenzsignale bei den Anregungswellenlängen 340 nm und 380 nm (Abb. 3.0A). Bei Stimulierung des Lobus mit 1  $\mu$ M DA sank das Fluoreszenzsignal bei 380 nm, während gleichzeitig das Signal bei 340 nm stieg. Die daraus resultierende Fura-2 *ratio* stieg und kennzeichnete in den Ausführunggangzellen einen Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  (Abb. 3.0B).

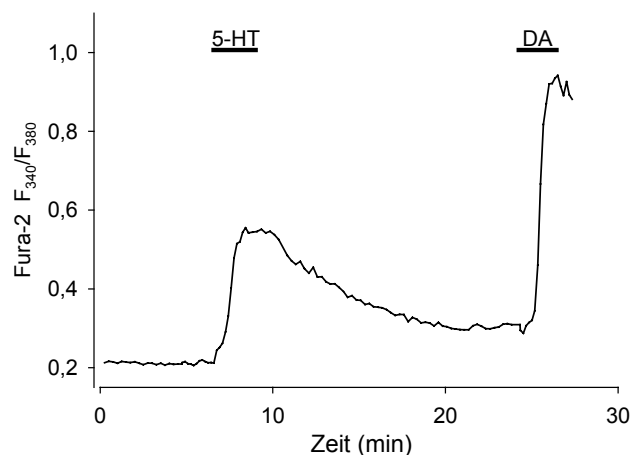
In einigen Präparaten war vor dem DA-induzierten  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg ein kurzer Abfall der  $[Ca^{2+}]_i$  zu beobachten (siehe Abb. 3.0B oder Abb. 3.0B). Die Höhe des  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegs hing von der zeitlichen Abfolge der Stimulierungen ab. Eine zweite Stimulierung mit 1  $\mu$ M DA führte zu einem  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg, der  $2,3 \pm 0,4$  ( $n = 16$ ) mal größer war als der  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg, der durch die vorausgegangene Stimulierung mit 1  $\mu$ M DA ausgelöst wurde. Der DA-induzierte  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg war konzentrationsabhängig und führte zu tonischen  $[Ca^{2+}]_i$ -Änderungen (Abb. 3.0C).

Die Schwelle für den DA-induzierten Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  lag im Bereich von 3-10 nM DA.



**Abb. 3.0** Einfluss von DA auf  $[Ca^{2+}]_i$  in Ausführgängen eines Lobus einer isolierten Speicheldrüse. (A,B) Effekt zweier Stimulierungen mit 1  $\mu$ M DA. Darstellung der Fluoreszenzintensitäten bei den Anregungswellenlängen 340 nm und 380 nm sowie der Fura-2 *ratio*,  $n = 5$ . (C) Graduierter, tonischer Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$ , der durch 3, 10, 30, 100 und 1000 nM DA induziert wird,  $n = 5$ .

LANG & WALZ (1999) konnten in den Epithelzellen der Ausführgänge isolierter Loben bei Verwendung von 5-HT Konzentrationen bis zu 10  $\mu$ M keinen Effekt auf die  $[Ca^{2+}]_i$  beobachten. Im Gegensatz dazu konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Badapplikation von 1  $\mu$ M 5-HT ebenfalls wie DA in den Epithelzellen der Ausführgänge isolierter Loben einen  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg hervorruft ( $n = 5$ ) (Abb. 3.0). Im Folgenden werden aber lediglich die Mechanismen des DA-induzierten  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegs näher untersucht.

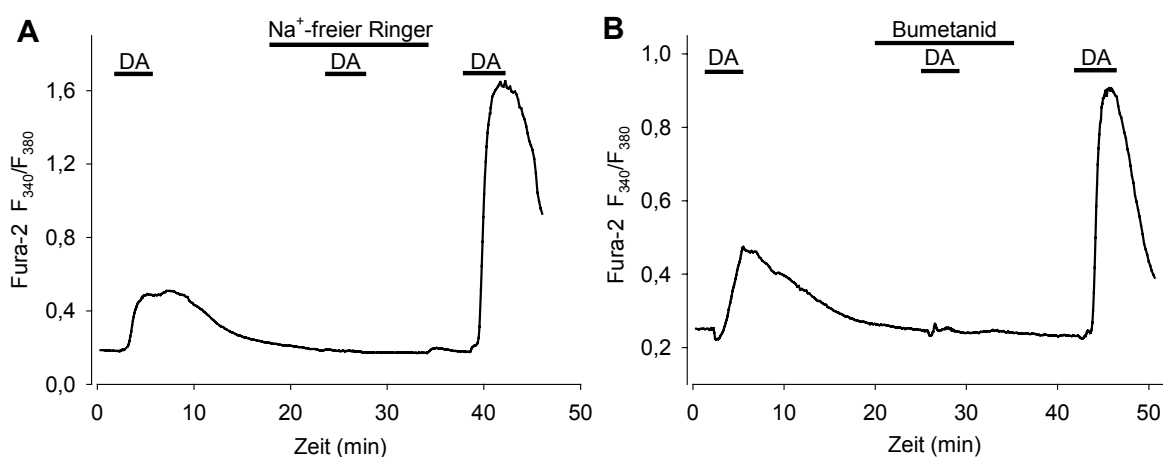


**Abb. 3.0** Einfluss von 1  $\mu$ M 5-HT und 1  $\mu$ M DA auf die  $[Ca^{2+}]_i$  in den Ausführgängen eines Lobus einer isolierten Speicheldrüse,  $n = 5$ .

### 3.1.2 Abhängigkeit des $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegs von der Aktivität des $Na^+-K^+-2Cl^-$ -Symporters

Der DA-induzierte  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg in den Ausführungszellen wird von einem deutlichen Anstieg der  $[Na^+]_i$  begleitet (LANG & WALZ 2001). Um zu untersuchen, ob der  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg vom  $[Na^+]_i$ -Anstieg abhängt, wurde extrazellulär  $Na^+$  entfernt und getestet, ob DA unter diesen Bedingungen noch einen Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  induziert. Die  $Na^+$ -freie Badlösung beeinflusste  $[Ca^{2+}]_i$  im unstimulierten Zustand nicht, verhinderte aber den DA-induzierten  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg komplett (*repeated-measures* ANOVA,  $n = 5$ ,  $P < 0,05$ , Abb. 3.0A). Nach Zugabe von extrazellulärem  $Na^+$  führte eine erneute DA-Stimulierung im Vergleich zur ersten DA-Stimulierung zu einem deutlich höheren  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg ( $P < 0,05$ ).

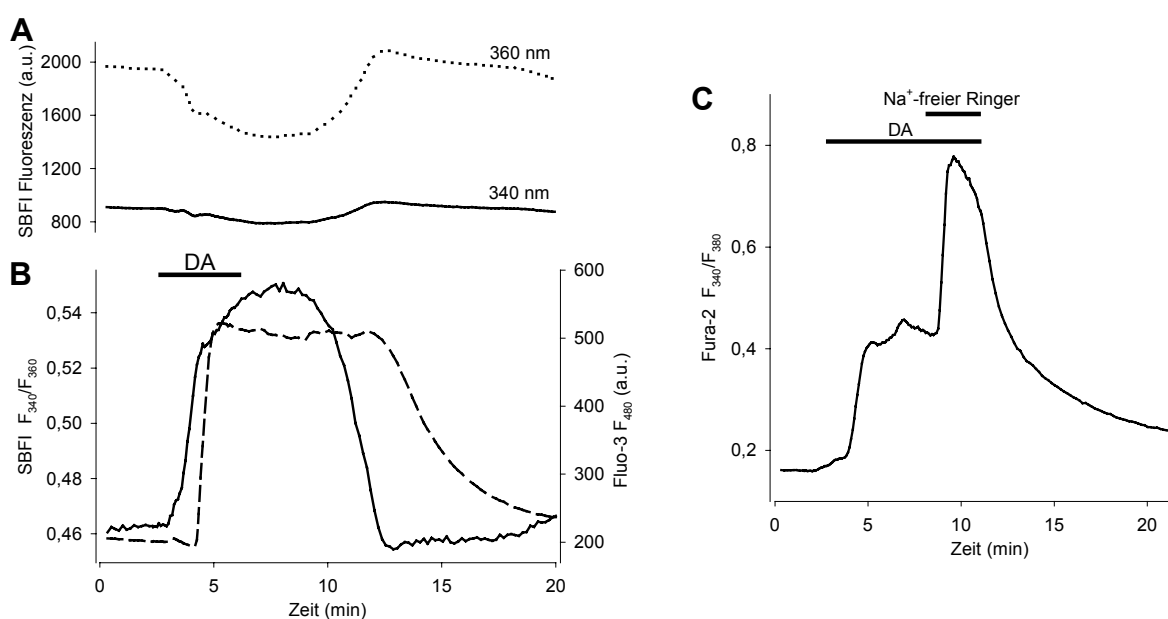
LANG & WALZ (2001) konnten zeigen, dass der DA-induzierte  $[Na^+]_i$ -Anstieg das Ergebnis der Aktivität eines  $Na^+-K^+-2Cl^-$ -Symporters (NKCC) ist. Durch die Verwendung von 10  $\mu M$  Bumetanid, einem spezifischen Hemmstoffs des NKCC (RUSSELL 2000), wurde der Einfluss des NKCC auf den  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg analysiert. Bumetanid beeinflusste die Ruhe- $[Ca^{2+}]_i$  nicht, unterdrückte jedoch den DA-induzierten  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg vollständig (*repeated-measures* ANOVA,  $n = 6$ ,  $P < 0,05$ , Abb. 3.0B). Der Effekt des Bumetanids war reversibel und eine erneute DA-Stimulierung nach Auswaschen des Hemmstoffs ergab wiederum einen stärkeren  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg im Vergleich zur ersten DA-Stimulierung ( $P < 0,05$ ).



**Abb. 3.0**  $Na^+$ -Abhängigkeit des DA-induzierten  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegs (1  $\mu M$  DA) in Ausführungsgängen eines Lobus einer isolierten Speicheldrüse. **(A)** Hemmung  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegs in  $Na^+$ -freier Ringerlösung,  $n = 5$ . **(B)** Reversible Hemmung des  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegs bei Badapplikation von 10  $\mu M$  Bumetanid,  $n = 6$ .

### 3.1.3 Umkehr des $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Antiporters durch einen DA-induzierten $[\text{Na}^+]_i$ -Anstieg

Wenn der DA-induzierte  $[\text{Na}^+]_i$ -Anstieg Voraussetzung für den  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg ist, sollte der  $[\text{Na}^+]_i$ -Anstieg dem  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg zeitlich vorausgehen. Dieser Aspekt wurde in Experimenten untersucht, in denen  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  und  $[\text{Na}^+]_i$  simultan gemessen wurden. Die Stimulierung isolierter Loben mit  $1 \mu\text{M}$  DA führte in den Epithelzellen der Ausführungsgänge zu einem reversiblen  $[\text{Na}^+]_i$ -Anstieg. Der Anstieg der SBF1 *ratio* war hierbei das Resultat eines Abfalls der Fluoreszenzintensität bei einer Anregungswellenlänge von  $360 \text{ nm}$ , während sich das Signal bei der Anregungswellenlänge  $340 \text{ nm}$  nur unwesentlich änderte (Abb. 3.0A,B) (DIARRA *et al.* 2001, PIESKE *et al.* 2002).



**Abb. 3.0** Hinweise für den Einfluss eines  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Antiporters auf den DA-induzierten  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg in den Ausführungsgängen eines Lobus einer isolierten Speicheldrüse. **(A,B)** Simultane Messungen von  $[\text{Na}^+]_i$  und  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  bei Stimulierung mit  $1 \mu\text{M}$  DA. Darstellung der SBF1 Fluoreszenz bei  $340 \text{ nm}$  und  $360 \text{ nm}$  sowie der SBF1 *ratio* (durchgezogene Linie in B) und Darstellung der Fluo-3 Fluoreszenz (gestrichelte Linie in B),  $n = 8$ . **(C)** Einfluss des Entfernens von extrazellulärem  $\text{Na}^+$  während einer Stimulierung mit  $50 \text{ nM}$  DA auf  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ,  $n = 7$ .

Der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg begann erst nach einer Latenzzeit von  $60 \pm 6 \text{ s}$  ( $n = 8$ ) nach Beginn des  $[\text{Na}^+]_i$ -Anstiegs. Zu diesem Zeitpunkt hatte  $[\text{Na}^+]_i$  nahezu die maximale Konzentration erreicht. Der Zeitverlauf der mit Fluo-3 gemessenen  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Änderungen war nahezu identisch zu dem Zeitverlauf, der mit Fura-2 gemessen

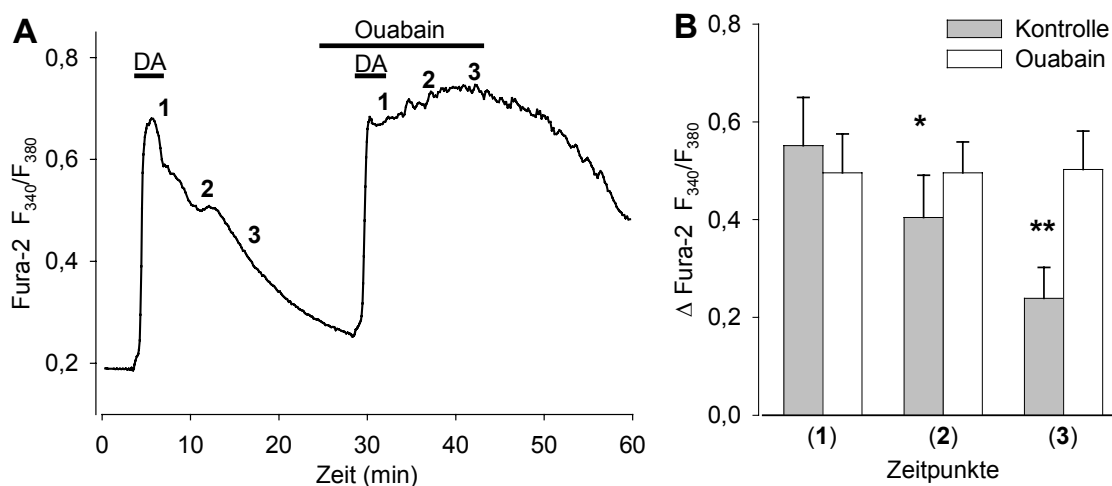


wurde (Vgl. Abb. 3.0B & Abb. 3.0B). Nach Auswaschen des DA sank  $[Na^+]_i$  in allen Präparationen rasch, während  $[Ca^{2+}]_i$  deutlich langsamer sank.

Die gleichen Simultanmessungen der  $[Ca^{2+}]_i$  und  $[Na^+]_i$  wurden auch an isolierten Ausführungsgängen ohne Acini durchgeführt. Hierbei konnte beobachtet werden, dass die Stimulierung mit 1  $\mu$ M DA die  $[Na^+]_i$  und  $[Ca^{2+}]_i$  nicht beeinflusste ( $n = 5$ ). Um sicherzustellen, dass die Speicheldrüsen, aus denen die lobenf freien Ausführungsgänge isoliert wurden, funktionsfähig waren, wurden aus einer Speicheldrüse ein isoliertes Ausführungssystem und zusätzlich ein isolierter Lobus mit Acini und Ausführungssystem präpariert. Letzterer diente als Funktionskontrolle und ergab bei DA-Stimulierung einen reversiblen Anstieg von  $[Na^+]_i$  und  $[Ca^{2+}]_i$ . Für die DA-induzierten Änderungen der  $[Na^+]_i$  und  $[Ca^{2+}]_i$  in den Epithelzellen der Ausführungsgänge war ganz offensichtlich die Aktivität der Acini erforderlich, was ein unerwartetes Ergebnis war.

LANG & WALZ (1999) hatten gezeigt, dass der  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg vollständig auf einen  $Ca^{2+}$ -Influx aus dem Extrazellarraum zurückzuführen ist und durch  $La^{3+}$  blockierbar ist. Ein möglicher  $La^{3+}$ -empfindlicher  $Ca^{2+}$ -Influx-Mechanismus, der auch von der  $[Na^+]_i$  abhängig ist, ist der  $Na^+$ - $Ca^{2+}$ -Antiporter (NCE). Die Richtung des  $Ca^{2+}$ -Transports durch den NCE hängt sowohl von den Konzentrationsgradienten für  $Na^+$  und  $Ca^{2+}$  über die basolaterale Membran als auch vom Membranpotential ab. Da sich bei Stimulierung mit DA der Konzentrationsgradient für  $Na^+$  über die basolaterale Membran stark vermindert, wäre ein  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg durch die Aktivität des NCE denkbar, wenn dieser im  $Ca^{2+}$ -Influx-Modus arbeitet. Unter dieser Annahme würde ein  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg bei einer experimentell induzierten Erhöhung des auswärts gerichteten  $Na^+$  Konzentrationsgradienten während einer DA-Stimulierung verstärkt werden. Diese Erwartung konnte bestätigt werden (Abb. 3.0C). Die Stimulierung isolierter Loben mit 50 nM DA führte in den Epithelzellen der Ausführungsgänge zu einem moderaten  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg. Nachdem die  $[Ca^{2+}]_i$  ein Plateau erreicht hatte, wurde in Anwesenheit von DA badseitig das  $Na^+$  entfernt. Dieses führte zu einer signifikanten Verstärkung des  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegs ( $n = 7$ , gepaarter  $t$ -Test,  $P < 0,01$ ). Dieser zusätzliche  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg war transient und begann noch in der DA-haltigen,  $Na^+$ -freien Ringerlösung zurückzugehen.

Die Abhängigkeit des DA-induzierten  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegs von der  $[Na^+]_i$  konnte zusätzlich dadurch gezeigt werden, dass die Rückkehr zur Ruhe- $[Na^+]_i$  nach DA-Stimulierung durch eine Hemmung der basolateral lokalisierten  $Na^+-K^+-ATPase$  mit Ouabain unterdrückt werden konnte (Abb. 3.0). Unter Kontrollbedingungen ging der  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg nach Auswaschen des DA innerhalb der ersten 10 min signifikant zurück ( $n = 6$ , *repeated-measures* ANOVA,  $P < 0,05$  bzw.  $P < 0,01$ ). Die badseitige Zugabe von 100  $\mu M$  Ouabain, einem spezifischen Hemmstoff der  $Na^+-K^+-ATPase$  (GLYNN 1957), beeinflusste den  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg nicht, blockierte aber vollständig die Erholung vom  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg. Erst nach Auswaschen des



**Abb. 3.0** Einfluss von 100  $\mu M$  Ouabain auf die DA-induzierten  $[Ca^{2+}]_i$ -Änderungen (1  $\mu M$  DA) in Ausführungsgängen eines Lobus einer isolierten Speicheldrüse. **(A)** Originalregistrierung. Analyse der  $[Ca^{2+}]_i$  zu 3 Zeitpunkten: 1: Ende der DA-Stimulierung, 2: 5 min nach Absetzen des DA, 3: 10 min nach Absetzen des DA. **(B)** Statistische Auswertung zu den 3 Zeitpunkten, *repeated-measures* ANOVA und Dunnett's *post hoc* Tests, \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ ,  $n = 6$ , Mittelwerte + SE.

Ouabains nahm die  $[Ca^{2+}]_i$  langsam ab.

### 3.1.4 Berechnung des Umkehrpotentials für den $Na^+-Ca^{2+}$ -Antiporter

Ein weiterer Hinweis für einen DA-induzierten und NCE-vermittelten  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg lieferte die Berechnung des Umkehrpotentials für den NCE. In den meisten Zelltypen tauscht der NCE 3  $Na^+$ -Ionen gegen 1  $Ca^{2+}$ -Ion aus, wobei die Richtung des Austauschs von den Konzentrationsgradienten für  $Ca^{2+}$  und  $Na^+$  sowie dem Membranpotential ( $E_m$ ) abhängt (BLAUSTEIN & LEDERER 1999, HINATA & KIMURA 2004). Aufgrund der Stöchiometrie errechnet sich das Umkehrpotential des NCE ( $E_{Na/Ca}$ ) durch:

$$E_{Na/Ca} = 3E_{Na} - 2E_{Ca},$$

wobei  $E_{Na}$  und  $E_{Ca}$  die Gleichgewichtspotentiale<sup>1</sup> für  $Na^+$  und  $Ca^{2+}$  sind, die durch:

$$E_{Na} = \frac{R \times T}{F} \times \ln \frac{[Na^+]_e}{[Na^+]_i} \quad \text{und} \quad E_{Ca} = \frac{R \times T}{2F} \times \ln \frac{[Ca^{2+}]_e}{[Ca^{2+}]_i}$$

bestimmt sind. Die Richtung des Austauschs ergibt sich aus dem Vergleich von  $E_{Na/Ca}$  und  $E_m$ . Wenn  $E_m$  negativer als  $E_{Na/Ca}$  ist, erfolgt durch den NCE ein auswärts gerichteter  $Ca^{2+}$ -Transport. Ein einwärts gerichteter  $Ca^{2+}$ -Transport erfolgt dagegen, wenn  $E_m$  positiver als  $E_{Na/Ca}$  ist. In dieser Arbeit wurden nur relative Änderungen der  $[Na^+]_i$  und der  $[Ca^{2+}]_i$  gemessen. Messungen der  $[Na^+]_i$  mit Hilfe von  $Na^+$ -empfindlichen Mikroelektroden und mikrofluorometrische Messungen der  $[Ca^{2+}]_i$  hatten für diese beiden Ionen jedoch die nachfolgenden Konzentrationen ergeben (LANG & WALZ 1999, 2001). Im unstimulierten Zustand ist in den Ausführungszellen  $[Ca^{2+}]_i = 48 \text{ nM}$ ,  $[Ca^{2+}]_o = 2 \text{ mM}$ ,  $[Na^+]_i = 22 \text{ mM}$ ,  $[Na^+]_o = 160 \text{ mM}$  und  $E_m = -65 \text{ mV}$ . Das daraus errechnete Umkehrpotential im Ruhezustand betrug  $E_{Na/Ca} = -117 \text{ mV}$ . Während der DA-Stimulierung stieg  $[Na^+]_i$  im Mittel auf  $92 \text{ mM}$  an und  $E_m$  depolarisierte auf  $-31 \text{ mV}$ . Somit änderte sich  $E_{Na/Ca}$  von  $-117 \text{ mV}$  auf  $-224 \text{ mV}$ . Ein  $Ca^{2+}$ -Influx durch den NCE ist bei DA-Stimulierung demnach prinzipiell zu erwarten.

## 3.2 Mechanismen der $pH_i$ -Regulation in den Ausführungsgängen isolierter Loben

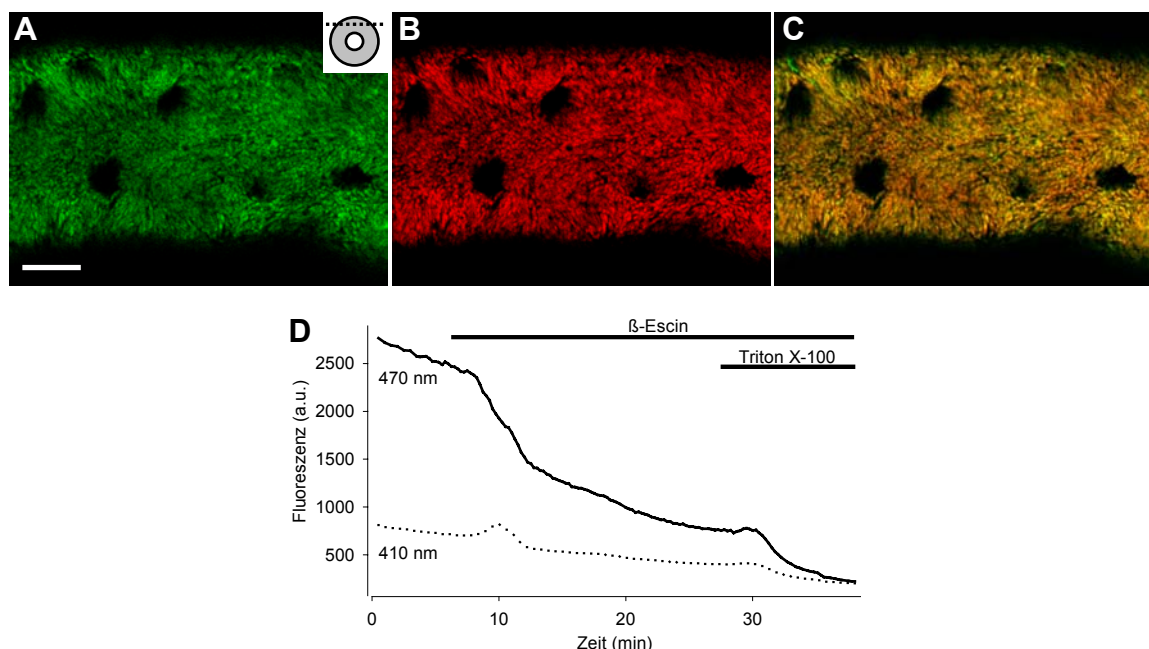
### 3.2.1 Lokalisation des BCECF in den Ausführungszellen

Änderungen des  $pH_i$  wurden mikrofluorometrisch mit dem pH-empfindlichen Fluoreszenzfarbstoffs BCECF gemessen. Dieser Farbstoff wurde in Speicheldrüsen der Amerikanischen Schabe noch nicht verwendet. Auch mit anderen Methoden (z. B. pH-empfindliche Mikroelektroden) wurde der  $pH_i$  in diesem System bisher nicht gemessen. Zunächst wurde die Verteilung des BCECF in den Ausführungszellen untersucht, um herauszufinden, ob sich BCECF gleichförmig in den Zellen verteilt oder auch in Organellen akkumuliert. Mit Hilfe der Konfokalmikroskopie konnte in den BCECF/AM-beladenen ( $0,5 \mu\text{M}$ )

<sup>1</sup> R: Universelle Gaskonstante ( $8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ), T: absolute Temperatur ( $298,15 \text{ K}$  bei  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ), F: Faraday-Konstante ( $9,649 \times 10^4 \text{ A s mol}^{-1}$ ), e und i tiefgestellt: extrazelluläre bzw. intrazelluläre Konzentration

Epithelzellen der Ausführgänge eine inhomogene Verteilung der BCECF-Fluoreszenz beobachtet werden (Abb. 3.0A). Mit  $0,2 \mu\text{M}$  TMRE markierte Mitochondrien zeigten eine ähnliche Verteilung (Abb. 3.0B). Die Überlagerung beider Fluoreszenzen ergab zumindest teilweise eine Kolo­kalisierung der BCECF- und TMRE-Fluoreszenz (Abb. 3.0C, gelbe Bereiche). Die Zellkerne wurden durch keinen der beiden Farbstoffe gefärbt. Diese Ergebnisse ließen vermuten, dass BCECF zumindest teilweise entweder mit der äußeren Mitochondrienmembran assoziiert ist oder in den Mitochondrien akkumuliert. Eine inhomogene BCECF-Verteilung wurde in verschiedenen Zelllinien (WEINLICH *et al.* 1998) sowie in Epithelzellen von Speicheldrüsen der Schmeißfliege *Calliphora vicina* (SCHEWE 2005) beobachtet. Beide Untersuchungen zeigten aber auch, dass BCECF teilweise an der äußeren Mitochondrienmembran adsorbiert und pH-Änderungen im Zytoplasma detektiert.

Die genaue Verteilung des BCECF in den Epithelzellen der Ausführgänge wurde deshalb an Präparaten untersucht, die selektiv permeabilisiert wurden (COWLEY *et al.* 2005). Hierzu wurden Ausführgänge nach 10 min Inkubation mit  $0,5 \mu\text{M}$  BCECF/AM in zwei aufeinander folgenden Schritten permeabilisiert und die



**Abb. 3.0** Lokalisation des BCECF in Epithelzellen der Ausführgänge isolierter Speicheldrüsen. (A,B,C) Konfokalmikroskopische Aufnahmen von mit  $0,5 \mu\text{M}$  BCECF/AM und  $0,2 \mu\text{M}$  TMRE doppelt markierten Ausführgängen. (A) BCECF-Fluoreszenz. Die optische Schnittebene ist oben rechts dargestellt, Balken =  $10 \mu\text{m}$ . (B) TMRE-Fluoreszenz. (C) Überlagerung der BCECF- und TMRE-Fluoreszenzen. (D) Zeitverlauf der BCECF-Fluoreszenz nach sequentieller Permeabilisierung der Plasmamembran und aller anderen Zellkompartimente mit  $100 \mu\text{g/ml}$   $\beta$ -Escin und 1 % Triton X-100,  $n = 4$ .

BCECF-Fluoreszenz bei den Anregungswellenlängen 410 nm und 470 nm registriert (Abb. 3.0D). Die selektive Permeabilisierung der Plasmamembran mit 100 µg/ml  $\beta$ -Escin führte innerhalb von 20 min zu einem Abfall des Fluoreszenzsignals um  $70 \pm 3$  % bei 470 nm bzw.  $48 \pm 5$  % bei 410 nm ( $n = 4$ ). Die sich daran anschließende Permeabilisierung aller restlichen Zellkompartimente mit 1 % Triton X-100 führte zu einem weiteren Abfall des Fluoreszenzsignals um lediglich  $21 \pm 3$  % bei 470 nm bzw.  $25 \pm 4$  % bei 410 nm ( $n = 4$ ). Die verbleibende Fluoreszenz entsprach der Hintergrunds- und Zellautofluoreszenz. Dieses Ergebnis belegt, dass der größte Anteil des BCECF ungebunden im Zytoplasma vorliegt.

### 3.2.2 $\text{NH}_4\text{Cl}$ -induzierte intrazelluläre Ansäuerung in den Ausführgängen

Der mögliche Beitrag der apikal lokalisierten  $\text{V-H}^+$ -ATPase zur  $\text{pH}_i$ -Regulation in den Epithelzellen der Ausführgänge wurde mit der  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Vorpuls-Methode untersucht (BORON & DE WEER 1976). In einer Ringerlösung mit  $\text{NH}_4\text{Cl}$  hängt das Dissoziationsgleichgewicht des Säure-Basepaares  $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$  vom pH der Lösung ab. Eine kurze, badseitige  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Applikation führt in den meisten Zelltypen zu einer charakteristischen Änderung des  $\text{pH}_i$ . Bei Zugabe von  $\text{NH}_4\text{Cl}$  diffundiert  $\text{NH}_3$  sehr schnell in die Zelle und puffert dort unter Bildung von  $\text{NH}_4^+$  Protonen ab. Dies führt intrazellulär zu einer schnellen Alkalisierung. Wesentlich langsamer gelangt  $\text{NH}_4^+$  durch Diffusion durch Ionenkanäle oder Transport mittels Carrier in die Zelle und führt zu einer Verschiebung des intrazellulären Dissoziationsgleichgewichts. Die Folge der Dissoziation des intrazellulären  $\text{NH}_4^+$  zu  $\text{NH}_3$  und  $\text{H}^+$  ist eine moderate Abnahme des  $\text{pH}_i$ . Nach Auswaschen des  $\text{NH}_4\text{Cl}$  beobachtet man intrazellulär eine drastische Ansäuerung, da  $\text{NH}_3$  schnell aus der Zelle heraus diffundiert und  $\text{H}^+$  in der Zelle zurücklässt. Die Wiederherstellung des Ausgangs- $\text{pH}_i$  ist nur möglich, wenn die Zelle über Mechanismen verfügt, die aktiv Säureäquivalente aus der Zelle heraus bzw. Basenäquivalente in die Zelle hinein transportieren. Durch die pharmakologische Hemmung  $\text{pH}_i$ -regulierender Transporter kann deshalb nach intrazellulärer Ansäuerung durch einen  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Puls ihr Beitrag zur Wiederherstellung des Ausgangs- $\text{pH}_i$  bestimmt werden.

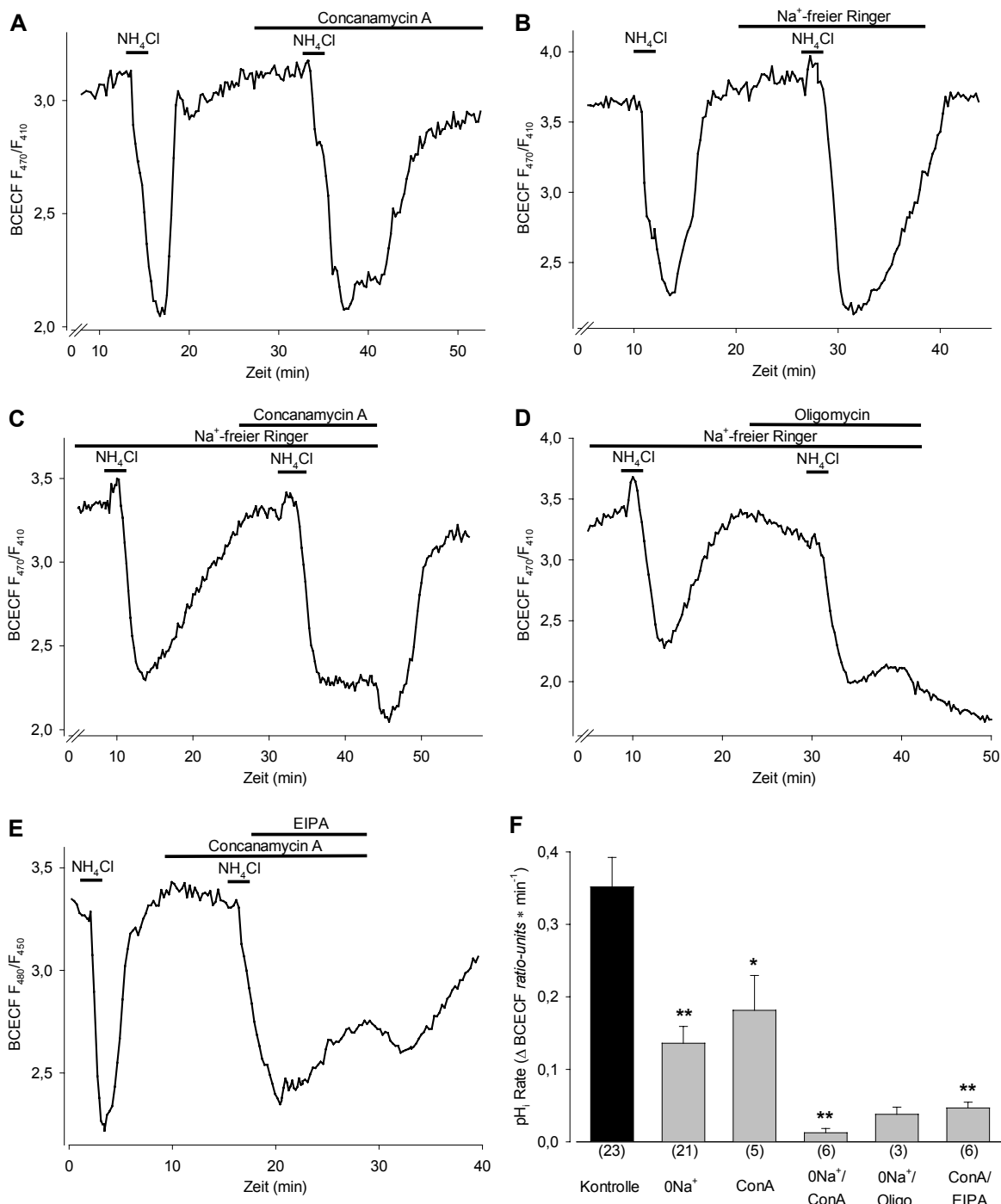
Die Experimente erfolgten an isolierten Loben mit Ausführgängen und Acini in  $\text{HCO}_3^-$ -freier Tris-Ringerlösung, um einen Beitrag potentieller Bicarbonat-Transporter an der  $\text{pH}_i$ -Regulation zu unterdrücken. Die kurze (1-2 min) Badapplikation von 20 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  bewirkte in den Epithelzellen der Ausführgänge keine Alkalisierung wie oben beschrieben, sondern nur eine schnelle intrazelluläre Ansäuerung (Abb. 3.0A). Diese nahm nach dem Auswaschen des  $\text{NH}_4\text{Cl}$  weiter zu. Die Erholung von dieser Ansäuerung erfolgte innerhalb von 2-4 min vollständig. Die Geschwindigkeiten, mit denen sich der Ruhe- $\text{pH}_i$  einstellte, konnten in allen folgenden Experimenten durch die Berechnung des linearen Anstiegs des  $\text{pH}_i$  während der ersten 3 min nach Beginn der  $\text{pH}_i$ -Erholung ermittelt werden. In  $\text{HCO}_3^-$ -freier Tris-Ringerlösung (Kontrolle) betrug die Geschwindigkeit der  $\text{pH}_i$ -Erholung  $0,35 \pm 0,04$  *ratio-units*  $\text{min}^{-1}$  ( $n = 23$ ). Innerhalb der ersten 3 min nach Beginn der  $\text{pH}_i$ -Erholungsphase erhöhte sich demnach die BCECF *ratio* im Mittel um  $0,35$  *ratio-units* pro Minute, was eine Alkalisierung kennzeichnete.

### 3.2.3 Beteiligung der $\text{V-H}^+$ -ATPase und des $\text{Na}^+$ - $\text{H}^+$ -Antiporters an der $\text{pH}_i$ -Regulation

Mit Hilfe von Concanamycin A, einem hoch spezifischen Hemmstoff der  $\text{V-H}^+$ -ATPase (DRÖSE 1993, ALTENDORF & DRÖSE 1997), wurde der Beitrag der  $\text{V-H}^+$ -ATPase an der Wiederherstellung des Ruhe- $\text{pH}_i$  nach einem  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Puls untersucht. Kontrollexperimente zeigten, dass eine Tris-Ringerlösung mit 0,2 % DMSO, dem Lösungsmittel für Concanamycin A, keine Veränderungen des  $\text{pH}_i$  bewirkte ( $n = 3$ ). Die Badapplikation von 1  $\mu\text{M}$  Concanamycin A verursachte keine Veränderung des  $\text{pH}_i$  und der  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -induzierten Ansäuerung (Abb. 3.0A). Die  $\text{pH}_i$ -Erholung erfolgte aber wesentlich langsamer. Die  $\text{pH}_i$ -Erholungsrate war mit  $0,18 \pm 0,05$  *ratio-units*  $\text{min}^{-1}$  ( $n = 5$ ) signifikant um etwa 48 % niedriger als die unter Kontrollbedingungen beobachtete  $\text{pH}_i$ -Erholungsrate (Ein-Wege ANOVA,  $P < 0,05$ , Abb. 3.0F). Dennoch erfolgte eine nahezu vollständige Erholung innerhalb von 10-15 min.

Da die  $\text{pH}_i$ -Erholung nicht vollständig Concanamycin A-sensitiv war, wurde im nächsten Schritt die  $\text{Na}^+$ -abhängige  $\text{pH}_i$ -Erholung untersucht. Abb. 3.0B zeigt, dass die  $\text{pH}_i$ -Erholung nach einer intrazellulären Ansäuerung extrazelluläres  $\text{Na}^+$  benötigt. Der Wechsel von  $\text{Na}^+$ -haltiger zu  $\text{Na}^+$ -freier Tris-Ringerlösung bewirkte

bei 6 Präparationen keine Veränderung des  $\text{pH}_i$ . In 6 anderen Präparationen hingegen stieg der  $\text{pH}_i$  leicht an (0,1-0,3 *ratio-units*), erreichte aber nach 2 min einen konstanten  $\text{pH}_i$ . In Abwesenheit von extrazellulärem  $\text{Na}^+$  war bei  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -



**Abb. 3.0** Effekte von  $\text{Na}^+$ -freiem Ringer bzw. badseitig applizierten Hemmstoffen auf die  $\text{pH}_i$ -Erholung von einer intrazellulären Ansäuerung mittels 20 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  in Ausführungsgängen von Loben isolierter Speicheldrüsen. **(A)** Effekt von 1  $\mu\text{M}$  Concanamycin A (ConA),  $n = 5$ . **(B)** Effekt von  $\text{Na}^+$ -freiem Ringer (0Na<sup>+</sup>),  $n = 12$ . **(C)** Effekt von 1  $\mu\text{M}$  Concanamycin A und  $\text{Na}^+$ -freiem Ringer,  $n = 6$ . **(D)** Effekt von 2,5  $\mu\text{g/ml}$  Oligomycin (Oligo.) und  $\text{Na}^+$ -freiem Ringer,  $n = 3$ . **(E)** Effekt von 1  $\mu\text{M}$  Concanamycin A und 50  $\mu\text{M}$  EIPA,  $n = 6$ . **(F)** Statistische Auswertung der  $\text{pH}_i$ -Erholungsraten der ersten 3 min, Ein-Wege ANOVA und Dunnett's *post hoc* Tests, Kontrolle vs. Behandlung, \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , Mittelwerte + SE, ( $n$ ).

Applikation eine transiente Alkalisierung zu beobachten, ehe die prominente Ansäuerung noch während der Anwesenheit von  $\text{NH}_4\text{Cl}$  folgte (siehe auch Abb. 3.0B,C,D). Wiederum beeinflusste  $\text{Na}^+$  nicht die Stärke der Ansäuerung sondern die  $\text{pH}_i$ -Erholungsrate. Die  $\text{pH}_i$ -Erholungsrate war mit  $0,14 \pm 0,02 \text{ ratio-units min}^{-1}$  ( $n = 21$ ) signifikant um etwa 61 % niedriger als die unter Kontrollbedingungen beobachtete  $\text{pH}_i$ -Erholungsrate (Ein-Wege ANOVA,  $P < 0,01$ , Abb. 3.0F). Dennoch erfolgte eine nahezu vollständige Erholung des  $\text{pH}_i$ .

Diese Experimente zeigten, dass die Hemmung basolateral lokalisierter,  $\text{Na}^+$ -abhängiger Transportmechanismen oder die Hemmung der apikal lokalisierten  $\text{V-H}^+$ -ATPase die  $\text{pH}_i$ -Erholung nur verlangsamte, aber nicht vollständig blockierte. Es wurde deshalb auch getestet, ob die kombinierte Blockierung beider Transportmechanismen zu einer vollständigen Hemmung der  $\text{pH}_i$ -Erholung führt. Es zeigte sich, dass die Badzugabe von  $1 \mu\text{M}$  Concanamycin A in  $\text{Na}^+$ -freier Lösung zu einer nahezu vollständigen Unterdrückung der  $\text{pH}_i$ -Erholung nach Ansäuerung führte (Abb. 3.0C). Die  $\text{pH}_i$ -Erholungsrate war mit  $0,01 \pm 0,01 \text{ ratio-units min}^{-1}$  ( $n = 6$ ) signifikant um etwa 96 % niedriger als die unter Kontrollbedingungen beobachtete  $\text{pH}_i$ -Erholungsrate (Ein-Wege ANOVA,  $P < 0,01$ , Abb. 3.0F). Diese Hemmung der  $\text{pH}_i$ -Erholung war reversibel, da nach Auswaschen des Concanamycin A und Zugabe von  $\text{Na}^+$ -haltiger Tris-Ringerlösung die  $\text{pH}_i$ -Erholung innerhalb von 5-10 min nahezu vollständig erfolgte.

Dieses Experiment zeigte, dass Concanamycin A als spezifischer Hemmstoff der  $\text{V-H}^+$ -ATPase in  $\text{Na}^+$ -freier Ringerlösung auf der basolateralen Seite des Ausführungsepithels die  $\text{pH}_i$ -Erholung nach Ansäuerung nahezu vollständig blockiert. Ein weiterer Hinweis auf die Beteiligung der  $\text{V-H}^+$ -ATPase an der  $\text{pH}_i$ -Erholung ergab sich aus der Untersuchung der ATP-Abhängigkeit der  $\text{pH}_i$ -Erholung unter  $\text{Na}^+$ -freien Bedingungen. In diesen Experimenten wurde Oligomycin als spezifischer Hemmstoff der mitochondrialen ATP-Synthase verwendet (WHITTAM *et al.* 1964). Während der Präinkubation mit  $2,5 \mu\text{g/ml}$  Oligomycin erfolgte eine langsame  $\text{pH}_i$ -Abnahme (Abb. 3.0D). Nach  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -induzierter intrazellulärer Ansäuerung konnte in  $\text{Na}^+$ -freier Tris-Ringerlösung mit Oligomycin keine  $\text{pH}_i$ -Erholung mehr beobachtet werden. Die  $\text{pH}_i$ -Erholungsrate betrug lediglich  $0,04 \pm 0,01 \text{ ratio-units min}^{-1}$  ( $n = 3$ , Abb. 3.0F). Die Blockierung der



pH<sub>i</sub>-Erholung war irreversibel und der pH<sub>i</sub> nahm nach Auswaschen des Oligomycins weiter ab.

Zusammengenommen zeigten diese Experimente auch, dass die Epithelzellen der Ausführgänge im basolateralen Anteil ihrer Plasmamembran einen Na<sup>+</sup>-abhängigen Transporter besitzen müssen. Um diesen Na<sup>+</sup>-abhängigen Transportmechanismus zu identifizieren, wurde das Amiloridderivat EIPA (5-(*N*-Ethyl-*N*-isopropyl)-amilorid) verwendet. EIPA ist ein spezifischer Hemmstoff des Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup>-Antiporters (NHE) (PETZEL 2000, GIANNAKOU & DOW 2001). Wenn der NHE an der pH<sub>i</sub>-Erholung beteiligt ist, sollte EIPA die Wirkung einer Na<sup>+</sup>-freien Ringerlösung imitieren. Da EIPA im UV-Licht fluoresziert, wurde die BCECF-Fluoreszenz bei den Anregungswellenlängen 450 nm und 480 nm gemessen und die *ratio* F<sub>480</sub>/F<sub>450</sub> berechnet. Die aus der *ratio* F<sub>480</sub>/F<sub>450</sub> berechneten pH<sub>i</sub>-Erholungsraten nach einem NH<sub>4</sub>Cl-Puls unterschieden sich statistisch nicht von den pH<sub>i</sub>-Erholungsraten nach einem NH<sub>4</sub>Cl-Puls, die aus der *ratio* F<sub>470</sub>/F<sub>410</sub> berechnet wurden (*t*-Test, P > 0,05). Die pH<sub>i</sub>-Erholungsraten waren also miteinander vergleichbar. Die pH<sub>i</sub>-Erholung konnte nach NH<sub>4</sub>Cl-induzierter Ansäuerung durch Badapplikation von 1 μM Concanamycin A in Kombination mit 50 μM EIPA nahezu vollständig gehemmt werden (Abb. 3.0E). Die pH<sub>i</sub>-Erholungsrate war mit 0,05 ± 0,01 *ratio-units* min<sup>-1</sup> (n = 6) signifikant um etwa 87 % niedriger als die unter Kontrollbedingungen beobachtete pH<sub>i</sub>-Erholungsrate (Ein-Wege ANOVA, P < 0,01, Abb. 3.0F). Diese Hemmung war reversibel, denn eine langsame pH<sub>i</sub>-Erholung konnte nach Auswaschen der Hemmstoffe beobachtet werden. Der Concanamycin A-insensitive, Na<sup>+</sup>-abhängige Anteil an der pH<sub>i</sub>-Erholung beruhte demnach auf einem EIPA-sensitiven Transportprozess.

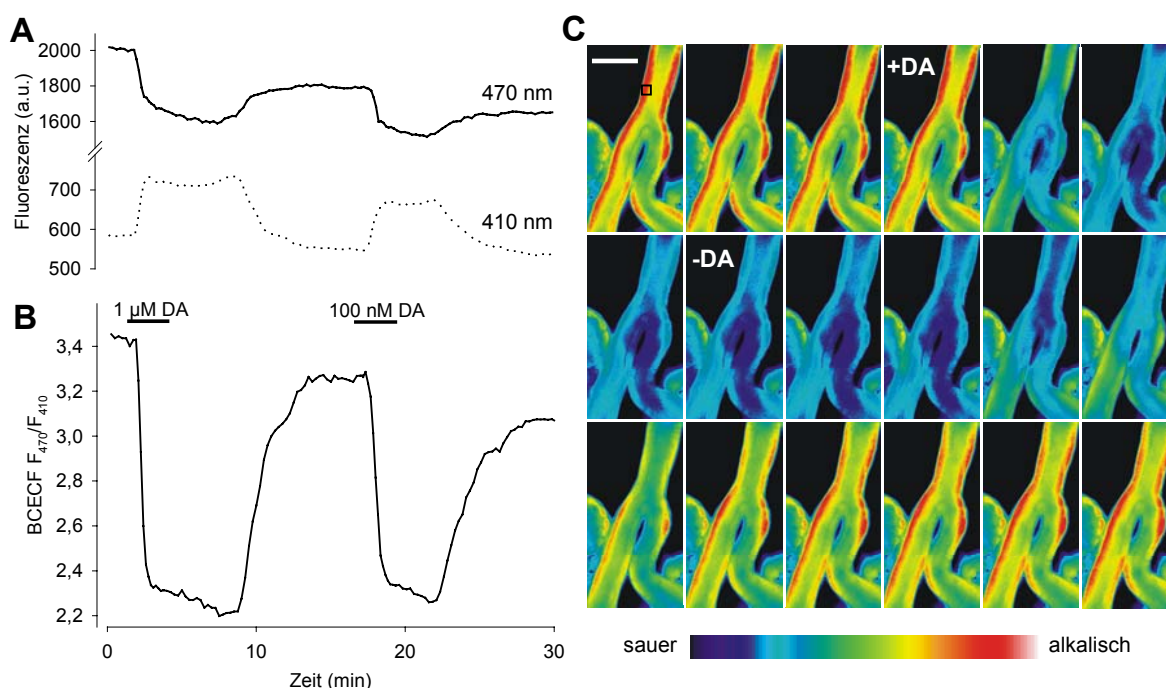
### 3.3 DA-induzierte pH<sub>i</sub>-Änderungen

#### 3.3.1 Intrazelluläre Ansäuerung in den Ausführgängen isolierter Loben

Die Beteiligung der apikal lokalisierten V-H<sup>+</sup>-ATPase an DA-induzierten Transportvorgängen in den Epithelzellen der Ausführgänge wurde mit Hilfe von mikrofluorometrischen Messungen des pH<sub>i</sub> untersucht, da der H<sup>+</sup>-Transport durch

die V-H<sup>+</sup>-ATPase zu Veränderungen des pH<sub>i</sub> führt. Die Versuche erfolgten an isolierten Loben mit Ausführgängen und Acini und soweit nicht anders angegeben in HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-freier Tris-Ringerlösung.

Die Badapplikation von 1 μM DA bewirkte einen Abfall der BCECF *ratio* F<sub>470</sub>/F<sub>410</sub> (Abb. 3.0B). Zur Analyse der DA-induzierten pH<sub>i</sub>-Änderungen wurden zunächst die Fluoreszenzintensitäten bei den Anregungswellenlängen 470 nm und 410 nm ausgewertet. Bei Stimulierung mit 1 μM DA sank das Fluoreszenzsignal bei 470 nm, während gleichzeitig das Signal bei 410 nm stieg (Abb. 3.0A). Diese gegenläufigen Änderungen kennzeichneten eine Verschiebung des BCECF-Absorptionsspektrums zu kürzeren Wellenlängen. Da sich bei Ansäuerung das Absorptionsspektrum von BCECF aufgrund einer Protonierung des BCECF-Moleküls zu kürzeren Wellenlängen verschiebt, entsprach die sinkende BCECF *ratio* demnach einer intrazellulären Ansäuerung.



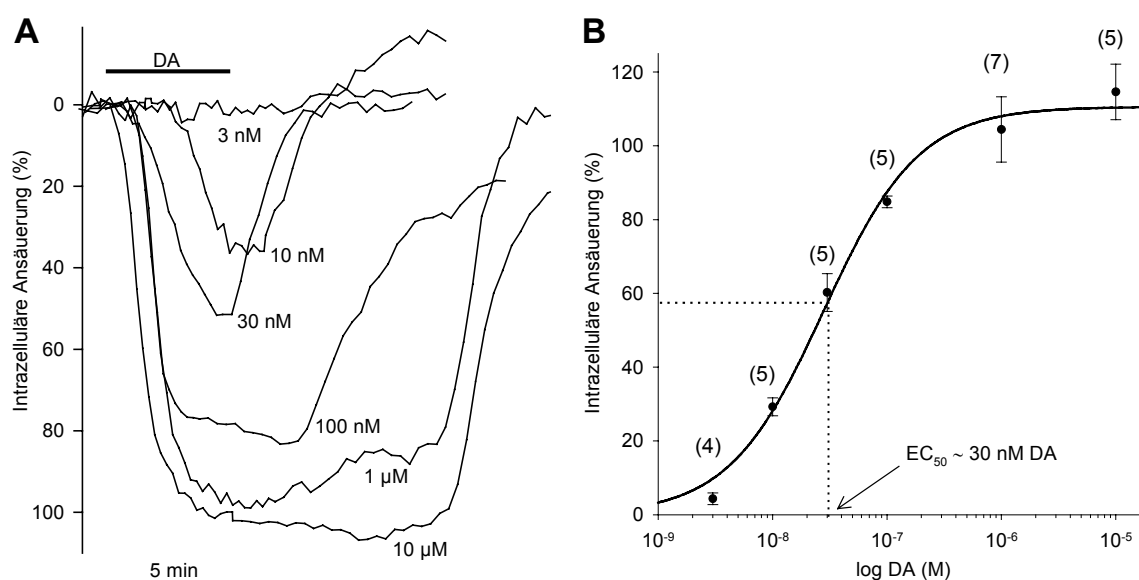
**Abb. 3.0** DA-induzierte intrazelluläre Ansäuerung in den Ausführgängen isolierter Loben der Speicheldrüse. (A,B) Effekt zweier nacheinander erfolgter Stimulierungen mit 1 μM bzw. 100 nM DA auf pH<sub>i</sub>. Darstellung der Fluoreszenzintensitäten bei den Anregungswellenlängen 410 nm und 470 nm sowie der BCECF *ratio*,  $n = 5$ . (C) Serie von Falschfarbenbildern der F<sub>470</sub>/F<sub>410</sub> *ratio* eines Ausführgangs, die pH<sub>i</sub>-Änderungen darstellt, welche durch 1 μM DA hervorgerufen wurden. Das im ersten Bild gezeigte Kästchen markiert die Region für die Intensitätsmessungen in A & B. Zeitintervall zwischen den Einzelbildern = 45 s, Balken = 100 μm.

Aufgrund des verwendeten Pumpensystems und des Totraums im Schlauchsystem konnte nicht eindeutig bestimmt werden, wann die DA-haltige Ringerlösung das Präparat erreichte. Der Beginn der intrazellulären Ansäuerung

erfolgte aber ca. 10-30 s nach DA-Zugabe. Ausgehend vom Beginn des  $\text{pH}_i$ -Abfalls erfolgte eine erste schnelle Ansäuerung innerhalb von  $1,6 \pm 0,1$  min ( $n = 31$ ) bis zum Erreichen eines neuen in etwa konstanten  $\text{pH}_i$ . Oftmals konnte eine zweite, wesentlich langsamere Ansäuerung beobachtet werden, die auch nach dem Auswaschen von DA einige Minuten anhielt (siehe Abb. 3.0A,C). Nach dem Auswaschen des DA kehrte  $\text{pH}_i$  innerhalb von ca. 5-10 min zum Ruhe- $\text{pH}_i$  zurück. Die  $\text{pH}_i$ -Erholungsrate innerhalb der ersten 3 min nach Beginn der  $\text{pH}_i$ -Erholung betrug  $0,24 \pm 0,02$  *ratio-units*  $\text{min}^{-1}$  ( $n = 20$ ). In einigen Präparaten wurde der Ausgangs- $\text{pH}_i$  nicht vollständig erreicht oder sogar überschritten (vgl. Abb. 3.0A,B,C).

Die Analyse des räumlich-zeitlichen Musters der DA-induzierten  $\text{pH}_i$ -Änderungen ergab, dass die intrazelluläre Ansäuerung gleichzeitig im gesamten untersuchten Bereich des vermessenen Ausführungsgangs erfolgte (vgl. Abb. 3.0C, Bild 4 & 5). Es konnten keine Hinweise auf  $\text{pH}_i$ -Oszillationen oder  $\text{pH}_i$ -Wellen gefunden werden.

In Abb. 3.0 ist die Abhängigkeit der intrazellulären Ansäuerung von der DA-Konzentration dargestellt. Aufgrund der Variabilität zwischen den einzelnen Präparationen erfolgte, wie in Abb. 3.0B dargestellt, zunächst immer eine Kontrollstimulierung mit  $1 \mu\text{M}$  DA. Danach wurde eine zweite Stimulierung mit

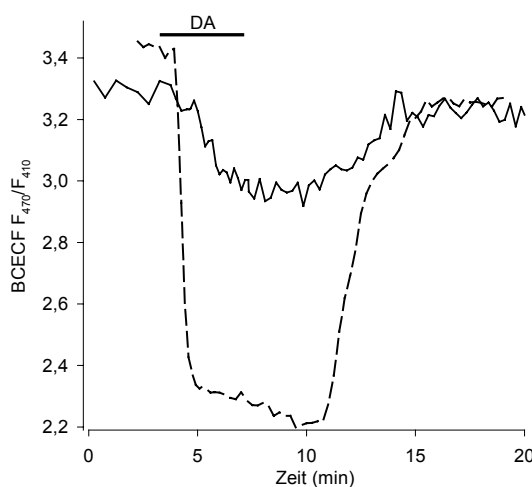


**Abb. 3.0** Konzentrationsabhängigkeit der DA-induzierten intrazellulären Ansäuerung in den Ausführungsgängen isolierter Loben der Speicheldrüse. **(A)** Originalregistrierungen von Ansäuerungen durch Applikation von DA verschiedener Konzentrationen bezogen auf eine Kontrollstimulierung mit  $1 \mu\text{M}$  DA (= 100 %). **(B)** Dosis-Wirkungskurve. Die Werte sind auf eine Kontrollstimulierung mit  $1 \mu\text{M}$  DA (= 100 %) normiert. Mittelwerte  $\pm$  SE, ( $n$ ).

variabler DA-Konzentration durchgeführt. Die dabei registrierte Ansäuerung wurde auf die zuvor beobachtete Ansäuerung bei der Kontrollstimulierung mit  $1 \mu\text{M}$  DA normiert. Der Schwellenwert für die DA-induzierte Ansäuerung lag bei ca.  $3 \text{ nM}$  DA (Abb. 3.0B). Bei dieser Konzentration war eine Ansäuerung zu beobachten, die nur  $4,3 \pm 1,6 \%$  ( $n = 4$ ) der Ansäuerung bei  $1 \mu\text{M}$  DA entsprach. Die halbmaximale Ansäuerung ( $\text{EC}_{50}$ ) war bei ca.  $30 \text{ nM}$  DA zu beobachten, die Sättigung ab etwa  $1 \mu\text{M}$  DA. In Abb. 3.0A ist zu erkennen, dass bei steigender DA-Konzentration nicht nur der Betrag der Ansäuerung, sondern auch die Kinetik änderte. Die anfängliche Rate der Ansäuerung nahm konzentrationsabhängig zu und die Zeit zwischen Auswaschen des DA bis zum Beginn der  $\text{pH}_i$ -Erholung verlängerte sich.

### 3.3.2 Schwächere intrazelluläre Ansäuerung in isolierten Ausführgängen

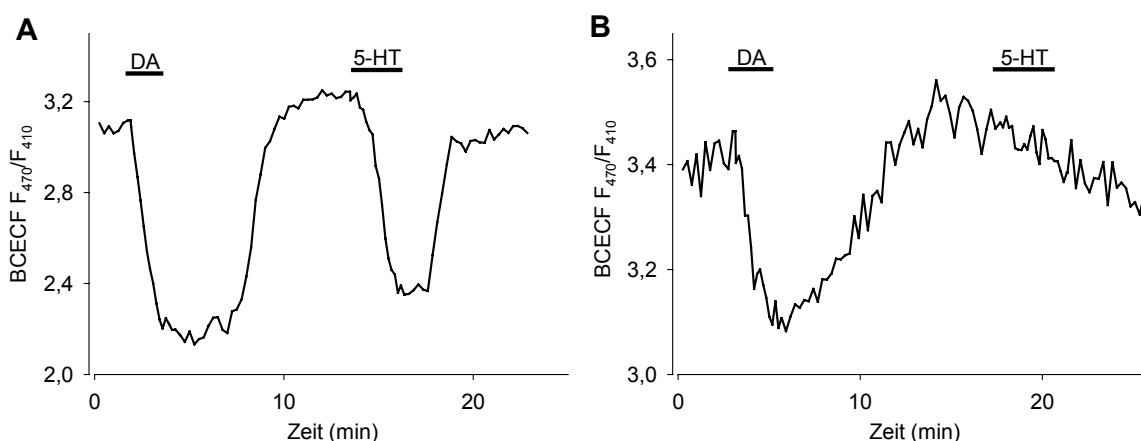
DA-induzierte  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Änderungen konnten in den Epithelzellen der Ausführgänge nur beobachtet werden, wenn Ausführgänge zusammen mit den Acini (isolierte Loben) stimuliert wurden (siehe Kap. 3.1.3). Die Aktivität der Acini war demnach Voraussetzung für die  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Änderungen. Deshalb wurde der Einfluss der Acini auf die DA-induzierten  $\text{pH}_i$ -Änderungen in den Ausführgängen ebenfalls untersucht. Dazu wurden isolierte Ausführgänge ohne Acini in  $\text{HCO}_3^-$ -freier Tris-Ringerlösung verwendet. Die Stimulierung mit  $1 \mu\text{M}$  DA bewirkte ebenfalls intrazellulär eine reversible Ansäuerung (Abb. 3.0). Diese war allerdings



**Abb. 3.0** DA-induzierte intrazelluläre Ansäuerung ( $1 \mu\text{M}$  DA) in einem isolierten Ausführgang ohne Acini,  $n = 9$ . Zum Vergleich ist die Ansäuerung ( $1 \mu\text{M}$  DA) in einem Ausführgang eines isolierten Lobus mit Acini aus Abb. 3.0B als gestrichelte Linie dargestellt.

wesentlich schwächer als die DA-induzierte Ansäuerung in Ausführungsgängen mit Acini. Anscheinend beeinflusste die Aktivität der Acini in den Epithelzellen der Ausführungsgänge auch die DA-induzierten  $\text{pH}_i$ -Änderungen.

Ausführungsgänge in der unmittelbaren Nähe der Acini sind sowohl dopaminerg als auch serotonerg innerviert (BAUMANN *et al.* 2002). Deshalb wurde auch getestet, ob 5-HT einen Einfluss auf den  $\text{pH}_i$  hat (Abb. 3.0). 1  $\mu\text{M}$  5-HT stimuliert in isolierten Speicheldrüsen sowohl die Flüssigkeits- als auch die Proteinsekretion (JUST & WALZ 1996, RIETDORF *et al.* 2005). Die Badapplikation von 1  $\mu\text{M}$  5-HT bewirkte in den Ausführungsgangzellen isolierter Loben mit Acini intrazellulär eine Ansäuerung, deren Stärke  $90,0 \pm 15,6\%$  ( $n = 5$ ) der 1  $\mu\text{M}$  DA-induzierten Ansäuerung betrug. Bei Verwendung isolierter Ausführungsgänge ohne Acini zeigte sich dagegen kein Einfluss von 1  $\mu\text{M}$  5-HT auf  $\text{pH}_i$  ( $n = 5$ ).

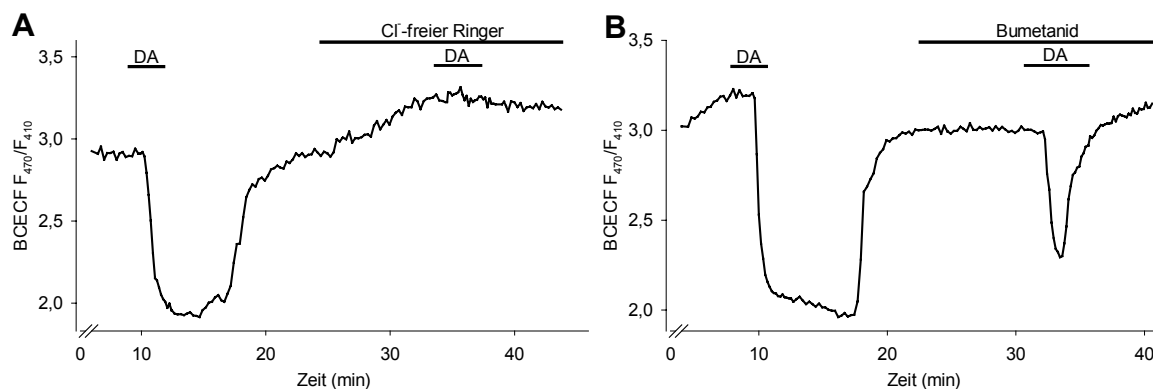


**Abb. 3.0** Einfluss von 1  $\mu\text{M}$  DA und 1  $\mu\text{M}$  5-HT auf den  $\text{pH}_i$  in den Epithelzellen isolierter Ausführungsgänge (A) mit Acini ( $n = 5$ ) und (B) ohne Acini ( $n = 5$ ).

### 3.4 DA-induzierte intrazelluläre Ansäuerung in den Ausführungsgängen isolierter Loben

#### 3.4.1 Abhängigkeit vom $\text{Na}^+ \text{-K}^+ \text{-2Cl}^-$ -Symporter in $\text{HCO}_3^-$ -freier Ringerlösung

In nachfolgenden Experimenten wurde genauer untersucht, welche Mechanismen in den Ausführungsgängen isolierter Loben für die DA-induzierte intrazelluläre Ansäuerung verantwortlich sind. In  $\text{Cl}^-$ -freier Tris-Ringerlösung war die DA-



**Abb. 3.0**  $\text{Cl}^-$ -Abhängigkeit der DA-induzierten Ansäuerung ( $1 \mu\text{M}$  DA) in den Ausführungsgängen isolierter Loben der Speicheldrüse in  $\text{HCO}_3^-$ -freier Tris-Ringerlösung. **(A)** Hemmung der DA-induzierten Ansäuerung in Gegenwart von  $\text{Cl}^-$ -freier Ringerlösung,  $n = 4$ . **(B)** Transiente DA-induzierte Ansäuerung bei Badapplikation von  $10 \mu\text{M}$  Bumetanid,  $n = 6$ .

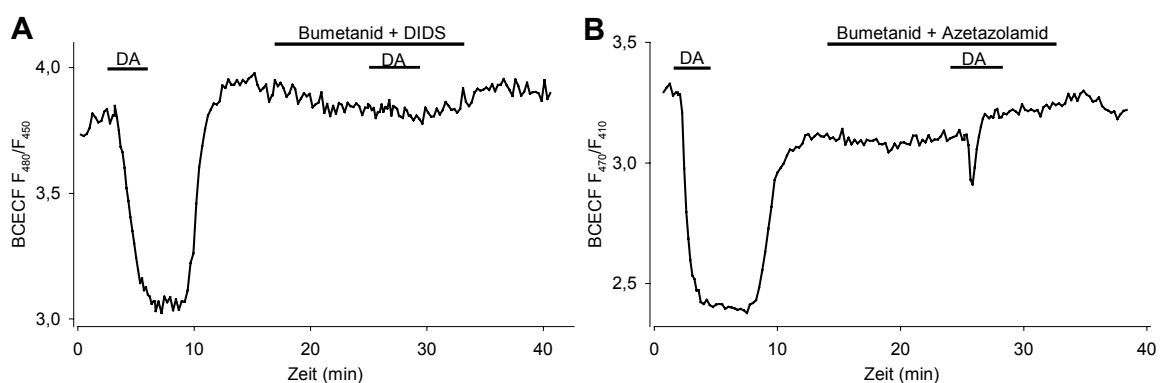
induzierte Ansäuerung komplett unterdrückt (Abb. 3.0A) ( $n = 4$ ). Dieses Experiment ließ auch vermuten, dass ein  $\text{Cl}^-$ -abhängiger-Transportmechanismus an der  $\text{pH}_i$ -Regulation beteiligt sein muss. Es wurde nämlich beobachtet, dass die Ausführungszellen bereits beim Wechsel zu  $\text{Cl}^-$ -freier Tris-Ringerlösung alkalisierten. Für diese Alkalisierung könnte zum Beispiel ein  $\text{Cl}^-$ - $\text{HCO}_3^-$ -Antiporter (AE) verantwortlich sein. Durch die Verstärkung des auswärts gerichteten Konzentrationsgradienten für  $\text{Cl}^-$  über der basolateralen Membran durch Entfernen von extrazellulärem  $\text{Cl}^-$  würde durch die Aktivität eines AE intrazelluläres  $\text{Cl}^-$  gegen extrazelluläres  $\text{HCO}_3^-$  ausgetauscht werden. Das Ergebnis wäre ein Anstieg des  $\text{pH}_i$ , der auch tatsächlich gemessen wurde.

Der NKCC ist auch ein  $\text{Cl}^-$ -abhängiger Transporter, der für die Speichelbildung essentiell ist. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die NKCC-Aktivität einen DA-induzierten  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg in den Ausführungsgängen zur Folge hat (siehe Kap. 3.1.2). Die Badapplikation des NKCC-Hemmstoffs Bumetanid ( $10 \mu\text{M}$ ) allein beeinflusste  $\text{pH}_i$  nicht (Abb. 3.0B). Die Hemmung des NKCC führte aber nur noch zu einer transienten DA-induzierten Ansäuerung ( $n = 6$ ), konnte diese aber nicht vollständig blockieren. Die maximale Ansäuerung in Gegenwart von Bumetanid war mit  $56,6 \pm 10,6 \%$  ( $n = 6$ ) der Ansäuerung bei Abwesenheit von Bumetanid signifikant niedriger (gepaarter  $t$ -Test,  $P < 0,05$ ). Noch während der DA-Stimulierung kehrte der  $\text{pH}_i$  zum Ausgangswert zurück.

### 3.4.2 Einfluss des $\text{Cl}^-$ - $\text{HCO}_3^-$ -Antiporters und der Carboanhydrase in $\text{HCO}_3^-$ -freier Ringerlösung

Durch die Hemmung des NKCC konnte die DA-induzierte Ansäuerung reduziert, aber nicht wie in  $\text{Cl}^-$ -freier Tris-Ringerlösung vollständig unterdrückt werden. Dieses Ergebnis ließ vermuten, dass an der Ausbildung der DA-induzierten  $\text{pH}_i$ -Änderung ein weiterer  $\text{Cl}^-$ -abhängiger Transporter beteiligt ist. Ein  $\text{pH}_i$ -regulierender,  $\text{Cl}^-$ -abhängiger Transporter ist der  $\text{Cl}^-$ - $\text{HCO}_3^-$ -Antiporter (AE). Deshalb wurde der Einfluss des Stilben-Derivats DIDS (4,4-Diisothiocyanostilben-2,2-disulfonat) auf die DA-induzierte transiente Ansäuerung in Gegenwart von Bumetanid untersucht. DIDS ist ein gängiger Hemmstoff von Anionentransportern (CABANTCHIK & GREGER 1992) und wurde bereits erfolgreich zur Hemmung des AE bei Insekten eingesetzt (BOUDKO *et al.* 2001). Da DIDS im UV-Licht fluoresziert, wurde die BCECF-Fluoreszenz bei den Anregungswellenlängen 450 nm und 480 nm gemessen und die *ratio*  $F_{480}/F_{450}$  berechnet. Die Badapplikation von 500  $\mu\text{M}$  DIDS zusammen mit 10  $\mu\text{M}$  Bumetanid beeinflusste den  $\text{pH}_i$  nicht (Abb. 3.0A). Die DA-induzierte transiente Ansäuerung war unter diesen Bedingungen aber nahezu vollständig unterdrückt (Abb. 3.0A). Die maximale Ansäuerung in Gegenwart von Bumetanid und DIDS betrug lediglich  $10,2 \pm 5,2 \%$  ( $n = 6$ ) der Ansäuerung der 1  $\mu\text{M}$  DA-Kontrollstimulierung ohne Hemmstoffe und war signifikant niedriger als die Ansäuerung in Gegenwart von Bumetanid allein (gepaarter *t*-Test,  $P < 0,01$ ) (vgl. Abb. 3.0B & Abb. 3.0A).

Die Aktivität eines AE war möglich, obwohl die Experimente in nominal  $\text{HCO}_3^-$ -freier Tris-Ringerlösung durchgeführt wurden, denn diese Lösung ist nicht ganz



**Abb. 3.0** DA-induzierte intrazelluläre Ansäuerung (1  $\mu\text{M}$  DA) in den Ausführgängen isolierter Loben der Speicheldrüse in  $\text{HCO}_3^-$ -freier Tris-Ringerlösung. Der NKCC wurde durch Badapplikation von 10  $\mu\text{M}$  Bumetanid gehemmt. Hemmung der transienten Ansäuerung (**A**) durch Badapplikation von 500  $\mu\text{M}$  DIDS,  $n = 6$  und (**B**) durch Badapplikation von 500  $\mu\text{M}$  Acetazolamid,  $n = 8$ .

frei von  $\text{HCO}_3^-$ .  $\text{CO}_2$  aus der Luft löst sich in der Ringerlösung und produziert hier einige  $100 \mu\text{M}$   $\text{HCO}_3^-$  (DEITMER & SCHNEIDER 1998). Zudem produziert auch der zelluläre Stoffwechsel  $\text{CO}_2$ . Durch die Aktivität der Carboanhydrase wird daraus intrazelluläres  $\text{HCO}_3^-$  gebildet. Die Hemmung der Carboanhydrase mit  $500 \mu\text{M}$  Azetazolamid sollte deshalb die intrazelluläre  $\text{HCO}_3^-$ -Verfügbarkeit für jeden  $\text{HCO}_3^-$ -abhängigen Transporter (z. B. AE) reduzieren. Die Badapplikation von  $500 \mu\text{M}$  Azetazolamid zusammen mit  $10 \mu\text{M}$  Bumetanid beeinflusste den  $\text{pH}_i$  nicht, konnte aber die DA-induzierte transiente Ansäuerung deutlich reduzieren (Abb. 3.0B). Die maximale Ansäuerung in Gegenwart von Bumetanid und Azetazolamid betrug  $22,1 \pm 4,7 \%$  ( $n = 8$ ) der Ansäuerung der  $1 \mu\text{M}$  DA-Kontrollstimulierung ohne Hemmstoffe und war signifikant niedriger als die Ansäuerung in Gegenwart von Bumetanid allein (gepaarter  $t$ -Test,  $P < 0,01$ ) (vgl. Abb. 3.0B & Abb. 3.0B).

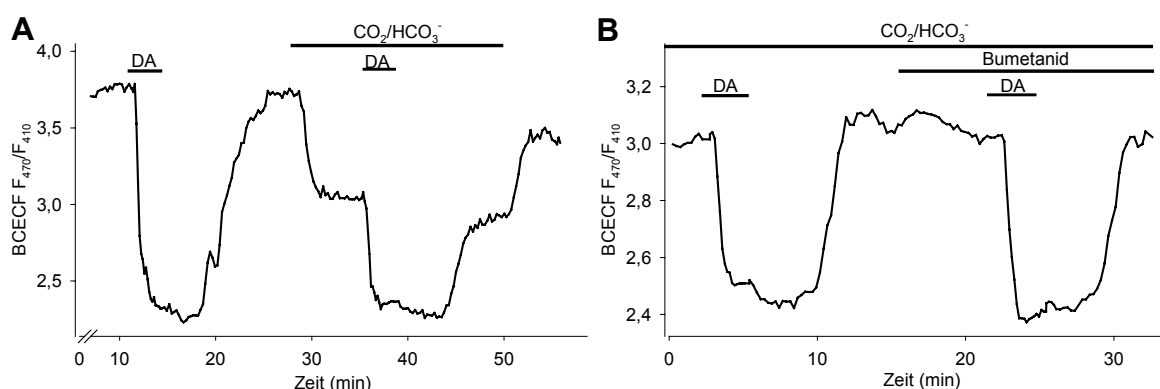
Die Badapplikation von  $500 \mu\text{M}$  DIDS ( $n = 9$ ) oder  $500 \mu\text{M}$  Azetazolamid ( $n = 4$ ), jeweils ohne Bumetanid-Hintergrund (keine Hemmung des NKCC), hatte jedoch keinen Einfluss auf die DA-induzierte intrazelluläre Ansäuerung (Daten nicht dargestellt). Es waren keine signifikanten Unterschiede in der anfänglichen Rate der Ansäuerung innerhalb der ersten Minute nach Beginn der Teststimulierung gegenüber der Kontrollstimulierung zu erkennen (DA:  $-0,51 \pm 0,05$  *ratio-units*  $\text{min}^{-1}$  vs. DA + DIDS:  $-0,38 \pm 0,05$  *ratio-units*  $\text{min}^{-1}$  bzw. DA:  $-0,61 \pm 0,10$  *ratio-units*  $\text{min}^{-1}$  vs. DA + Azetazolamid:  $-0,50 \pm 0,02$  *ratio-units*  $\text{min}^{-1}$ , gepaarter  $t$ -Test,  $P > 0,05$ ). Die absoluten Beträge der Ansäuerung bei der Teststimulierung entsprachen ebenfalls denen der Kontrollstimulierung (DA + DIDS:  $99,1 \pm 8,2 \%$  bzw. DA + Azetazolamid:  $99,1 \pm 15,6 \%$ , gepaarter  $t$ -Test,  $P > 0,05$ ). Die stabile Ansäuerung kehrte erst nach Auswaschen von DA und des jeweiligen Hemmstoffs zum Ausgangs- $\text{pH}_i$  zurück.

### 3.4.3 Abhängigkeit der Ansäuerung von der Aktivität des $\text{Na}^+$ - $\text{H}^+$ -Antiporters und des $\text{Cl}^-$ - $\text{HCO}_3^-$ -Antiporters in $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -gepufferter Ringerlösung

Die oben beschriebenen Experimente hatten gezeigt, dass in den Epithelzellen der Ausführgänge in  $\text{HCO}_3^-$ -freier Tris-Ringerlösung eine prominente DA-induzierte Ansäuerung nur in Verbindung mit der Aktivität des NKCC zu



beobachten war. Nachfolgend wurde auch der Einfluss von  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -gepufferter Ringerlösung auf die DA-induzierten  $\text{pH}_i$ -Änderungen untersucht. Der Wechsel der Badlösung von Tris-gepufferter Ringerlösung zu  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -gepufferter Ringerlösung resultierte in einer Ansäuerung des  $\text{pH}_i$ . Innerhalb von 1-2 min stellte sich jedoch ein konstanter  $\text{pH}_i$  ein. Erst nach dem erneuten Wechsel zur Tris-Ringerlösung war eine rasche Rückkehr des  $\text{pH}_i$  zum Ausgangswert zu beobachten (Abb. 3.0A). Die Ansäuerung durch  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$  war das Ergebnis der Diffusion von  $\text{CO}_2$  in die Epithelzellen, wobei durch Dissoziation der Kohlensäure Protonen entstehen.



**Abb. 3.0 (A)** Einfluss der  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -gepufferter Ringerlösung auf die DA-induzierte intra-zelluläre Ansäuerung ( $1 \mu\text{M}$  DA) in den Ausführungsgängen isolierter Loben der Speicheldrüse,  $n = 5$ . **(B)** Kein Einfluss der Badapplikation von  $10 \mu\text{M}$  Bumetanid auf die Ansäuerung ( $1 \mu\text{M}$  DA),  $n = 5$ .

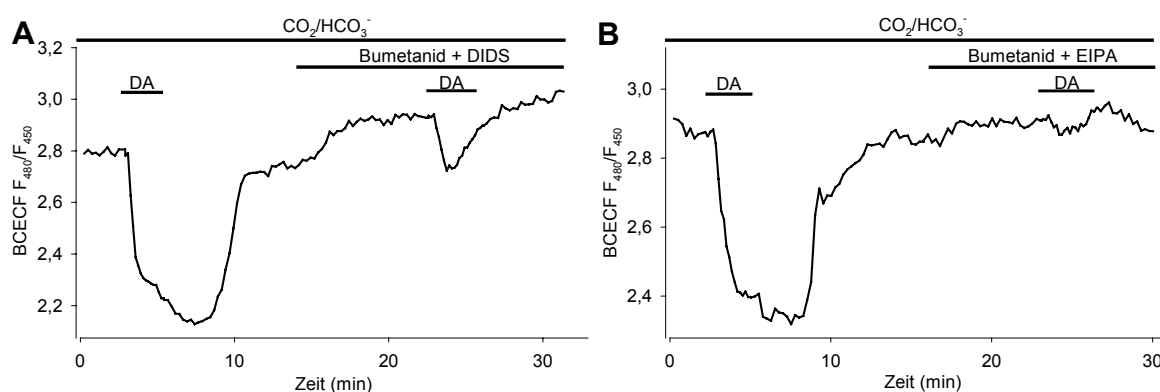
Auch in Gegenwart von  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$  in der Ringerlösung induzierte die Badapplikation von  $1 \mu\text{M}$  DA eine intrazelluläre Ansäuerung in den Ausführungsgängen isolierter Loben (Abb. 3.0A). Die anfängliche Rate der Ansäuerung innerhalb der ersten Minute nach Beginn der DA-Stimulierung war aber mit  $-0,34 \pm 0,05 \text{ ratio-units min}^{-1}$  signifikant kleiner als die Ansäuerungsrate von  $-0,57 \pm 0,09 \text{ ratio-units min}^{-1}$  bei DA-Stimulierung in Tris-Ringerlösung ( $n = 5$ , gepaarter  $t$ -Test,  $P < 0,05$ ). Der absolute Betrag der Ansäuerung in  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -gepufferter Ringerlösung betrug auch nur  $59,0 \pm 4,6 \%$  der Ansäuerung in Tris-Ringerlösung (gepaarter  $t$ -Test,  $P < 0,05$ ).

Im Gegensatz zu den Untersuchungen in Tris-gepufferter Ringerlösung konnte bei Hemmung des NKCC mit  $10 \mu\text{M}$  Bumetanid in  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -gepufferter Ringerlösung keine transiente, DA-induzierte Ansäuerung beobachtet werden (Abb. 3.0B). Vielmehr war eine stabile Ansäuerung zu sehen, die erst nach Auswaschen des DA zum Ausgangswert zurückkehrte. Der absolute Betrag der

Ansäuerung war mit  $107,0 \pm 11,5$  % des Betrags der Kontrollstimulierung nicht signifikant verschieden ( $n = 6$ , gepaarter  $t$ -Test,  $P > 0,05$ ).

Andererseits konnte ein deutlicher Effekt von DIDS, des Hemmstoffs von Anionentransportern registriert werden (Abb. 3.0A). Die Badapplikation von  $500 \mu\text{M}$  DIDS in Gegenwart von  $10 \mu\text{M}$  Bumetanid führte in  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -gepufferter Ringerlösung nur noch zu einer transienten DA-induzierten Ansäuerung, die lediglich  $28,0 \pm 8,4$  % der Ansäuerung in der Kontrolle erreichte ( $n = 5$ , gepaarter  $t$ -Test,  $P < 0,01$ ). Das gleiche Ergebnis konnte bei Verwendung des NHE-Hemmstoffs EIPA ( $50 \mu\text{M}$ ) beobachtet werden (Abb. 3.0B). Hierbei erreichte die transiente Ansäuerung nur noch  $17,0 \pm 12,3$  % der Ansäuerung in der Kontrolle ( $n = 5$ , gepaarter  $t$ -Test,  $P < 0,01$ ). Da DIDS und EIPA bei den hier verwendeten Konzentrationen verschiedene Transporter hemmen, wurde eine kombinierte Aktivität zweier Transporter vermutet. Der NKCC dient der Erhöhung von  $[\text{Na}^+]_i$  und  $[\text{Cl}^-]_i$ . In Gegenwart von  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$  in der Ringerlösung könnte diese Funktion einer gekoppelten Aktivität des DIDS-sensitiven AE und des EIPA-sensitiven NHE zugeschrieben werden.

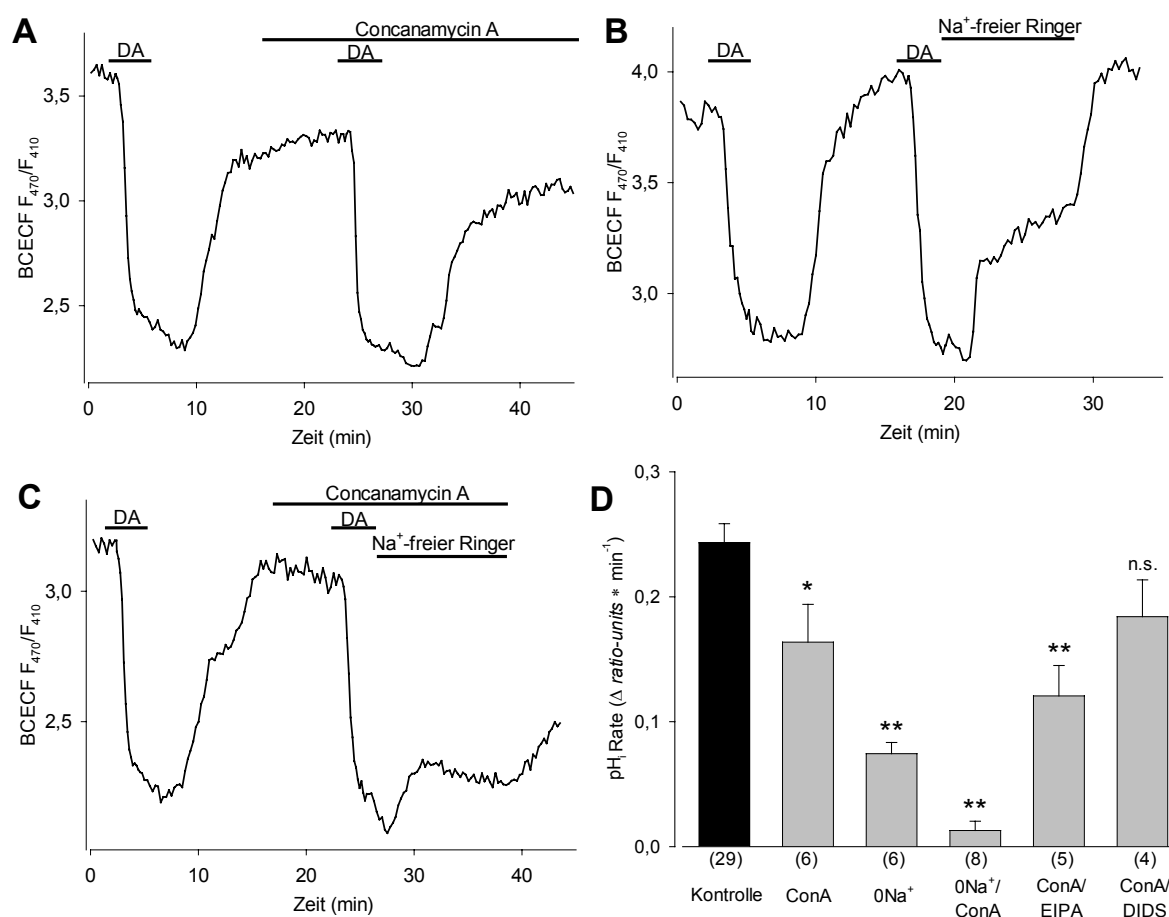
Die Aktivität der Carboanhydrase spielte hierbei eine Rolle bei der Bereitstellung von intrazellulärem  $\text{HCO}_3^-$  für die AE-Aktivität. Ihre Hemmung mit  $500 \mu\text{M}$  Azetazolamid führte in Gegenwart von  $10 \mu\text{M}$  Bumetanid nur noch zu einer transienten intrazellulären Ansäuerung bei  $1 \mu\text{M}$  DA-Stimulierung, die noch während der DA-Stimulierung zum Ruhe-pH<sub>i</sub> zurückkehrte. Sie erreichte nur  $45,6 \pm 11,6$  % der Ansäuerung der  $1 \mu\text{M}$  DA-Kontrollstimulierung ( $n = 5$ , gepaarter  $t$ -Test,  $P < 0,05$ ).



**Abb. 3.0** DA-induzierte intrazelluläre Ansäuerung ( $1 \mu\text{M}$  DA) in den Ausführgängen isolierter Loben der Speicheldrüse in  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -gepufferter Ringerlösung. Der NKCC wurde durch Badapplikation von  $10 \mu\text{M}$  Bumetanid gehemmt. Hemmung der Ansäuerung (**A**) durch Badapplikation von  $500 \mu\text{M}$  DIDS,  $n = 5$  und (**B**) durch Badapplikation von  $50 \mu\text{M}$  EIPA,  $n = 5$ .

### 3.4.4 Beteiligung der V-H<sup>+</sup>-ATPase und Na<sup>+</sup>-abhängiger Transporter an der pH<sub>i</sub>-Erholung

Unter Verwendung der NH<sub>4</sub>Cl-Vorpuls-Methode konnte bereits eine Beteiligung der apikalen V-H<sup>+</sup>-ATPase und eines basolateralen NHE bei der pH<sub>i</sub>-Erholung nach experimentell erzeugter intrazellulärer Ansäuerung in den Ausführungsgängen nachgewiesen werden. Deshalb wurde der Beitrag der V-H<sup>+</sup>-ATPase und des NHE zur pH<sub>i</sub>-Erholung auch nach einer DA-induzierten Ansäuerung in den Ausführungsgängen isolierter Loben untersucht. Diese Experimente erfolgten in HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-freier Tris-Ringerlösung. Die Badapplikation von 1 μM Concanamycin A allein bewirkte keine Veränderung des pH<sub>i</sub> und beeinflusste auch die DA-induzierte Ansäuerung nicht (Abb. 3.0A). Die anfängliche pH<sub>i</sub>-Erholungsrate nach



**Abb. 3.0** pH<sub>i</sub>-Erholung nach einer DA-induzierten intrazellulären Ansäuerung (1 μM DA) in den Ausführungsgängen isolierter Loben der Speicheldrüse. **(A)** Effekt von 1 μM Concanamycin A (ConA), badseitig appliziert, *n* = 6. **(B)** Effekt von Na<sup>+</sup>-freiem Ringer (0Na<sup>+</sup>), *n* = 6. **(C)** Effekt von 1 μM Concanamycin A und Na<sup>+</sup>-freiem Ringer, *n* = 8. **(D)** Statistische Auswertung der pH<sub>i</sub>-Erholungsraten der ersten 3 min. ConA/EIPA: Effekt von 1 μM Concanamycin A und 50 μM EIPA. ConA/DIDS: Effekt von 1 μM Concanamycin A und 500 μM DIDS. Ein-Wege ANOVA und Dunnett's *post hoc* Tests, Kontrolle vs. Behandlung, \* *P* < 0,05, \*\* *P* < 0,01, (*n*), Mittelwerte + SE.

Auswaschen des DA war aber mit  $0,16 \pm 0,03$  *ratio-units*  $\text{min}^{-1}$  ( $n = 6$ ) signifikant um etwa 33 % niedriger als die unter Kontrollbedingungen beobachtete  $\text{pH}_i$ -Erholungsrate (Ein-Wege ANOVA,  $P < 0,05$ ) (Abb. 3.0D).

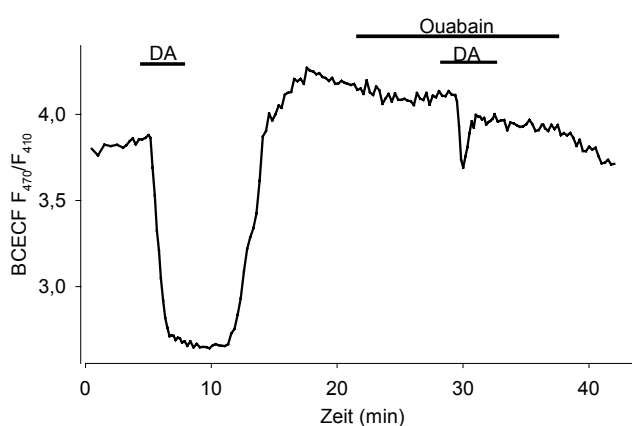
Zur Untersuchung der  $\text{Na}^+$ -Abhängigkeit der  $\text{pH}_i$ -Erholung konnte die DA-Stimulierung nicht in  $\text{Na}^+$ -freier Ringerlösung durchgeführt werden, da die DA-induzierte Ansäuerung NKCC-abhängig ist. Erst beim Auswaschen des DA wurde von einer  $\text{Na}^+$ -haltigen zu einer  $\text{Na}^+$ -freien Tris-Ringerlösung gewechselt. In fünf von sechs Experimenten konnte daraufhin eine erste schnelle  $\text{pH}_i$ -Erholung beobachtet werden, die aber nur etwa ein Drittel der DA-induzierten Ansäuerung aufhob (Abb. 3.0B). Die sich danach anschließende  $\text{pH}_i$ -Erholung war mit  $0,07 \pm 0,01$  *ratio-units*  $\text{min}^{-1}$  ( $n = 6$ ) signifikant um etwa 70 % niedriger als die unter Kontrollbedingungen beobachtete  $\text{pH}_i$ -Erholungsrate (Ein-Wege ANOVA,  $P < 0,01$ ) (Abb. 3.0D). Erst durch den Wechsel zu  $\text{Na}^+$ -haltiger Tris-Ringerlösung konnte der Ausgangs- $\text{pH}_i$  wieder erreicht werden.

Die Badapplikation von  $1 \mu\text{M}$  Concanamycin A in  $\text{Na}^+$ -freier Ringerlösung nach einer DA-induzierten Ansäuerung führte zunächst, bedingt durch die Wegnahme des extrazellulären  $\text{Na}^+$ , zu einer  $\text{pH}_i$ -Erholung (Abb. 3.0C). Diese stoppte aber nach 1-2 min und es war keine weitere  $\text{pH}_i$ -Erholung zu beobachten. Die  $\text{pH}_i$ -Erholungsrate war mit  $0,01 \pm 0,01$  *ratio-units*  $\text{min}^{-1}$  ( $n = 8$ ) signifikant um etwa 95 % niedriger als die unter Kontrollbedingungen beobachtete  $\text{pH}_i$ -Erholungsrate (Ein-Wege ANOVA,  $P < 0,01$ ) (Abb. 3.0D).

Um den basolateralen,  $\text{Na}^+$ -abhängigen Transportmechanismus bei der  $\text{pH}_i$ -Erholung nach DA-induzierter Ansäuerung zu identifizieren, wurden Hemmstoffe  $\text{Na}^+$ -abhängiger Transporter zusammen mit  $1 \mu\text{M}$  Concanamycin A badseitig appliziert. Bei Verwendung des NHE-Hemmstoffs EIPA ( $50 \mu\text{M}$ ) war die  $\text{pH}_i$ -Erholungsrate mit  $0,12 \pm 0,02$  *ratio-units*  $\text{min}^{-1}$  ( $n = 5$ ) signifikant um etwa 50 % niedriger als die unter Kontrollbedingungen beobachtete  $\text{pH}_i$ -Erholungsrate (Ein-Wege ANOVA,  $P < 0,01$ ) (Abb. 3.0D). Die Hemmung der  $\text{pH}_i$ -Erholung war bei Applikation von Concanamycin A und EIPA größer (50 %) als bei Applikation von Concanamycin A allein (33 %), was auf einen EIPA-sensitiven Anteil bei der  $\text{pH}_i$ -Erholung hinweist. Bei Verwendung von  $500 \mu\text{M}$  DIDS, das auch  $\text{Na}^+$ -abhängige  $\text{HCO}_3^-$ -Transporter hemmt (BORON 2001, ROMERO *et al.* 2004), war tendenziell

auch eine Reduktion der  $\text{pH}_i$ -Erholungsrate zu beobachten. Diese war aber (wahrscheinlich wegen der geringen Stichprobe) nicht signifikant verschieden von der Kontrolle und deutete anscheinend nur auf den Concanamycin A-sensitiven Anteil hin (Ein-Wege ANOVA,  $P > 0,05$ ) (Abb. 3.0D). Mit Hilfe von EIPA oder DIDS war der Effekt des Concanamycin A in  $\text{Na}^+$ -freier Ringerlösung nicht vollständig zu imitieren. Demnach waren die  $\text{V-H}^+$ -ATPase und mehrere  $\text{Na}^+$ -abhängige Transportmechanismen (teilweise EIPA-sensitiv und DIDS-insensitiv) an der  $\text{pH}_i$ -Erholung nach einer DA-induzierten intrazellulären Ansäuerung beteiligt.

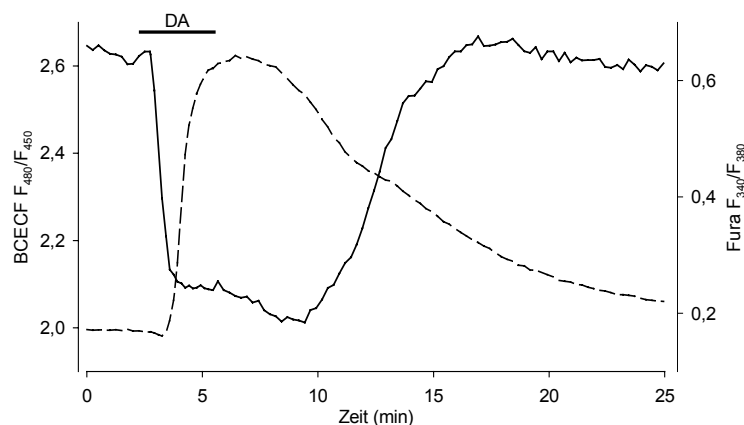
Die Messungen zur  $\text{pH}_i$ -Erholung nach DA-induzierter Ansäuerung in den Ausführungsgängen isolierter Loben zeigten, dass die Ansäuerung nicht durch  $1 \mu\text{M}$  Concanamycin A gehemmt werden konnte (vgl. Abb. 3.0A,C). Die Aktivität der  $\text{V-H}^+$ -ATPase war demnach zur Generierung der Ansäuerung nicht nötig. Eine mögliche Energetisierung der beteiligten Transportprozesse ist aber prinzipiell auch durch die basolaterale  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase möglich. Die Hemmung der  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase mit  $100 \mu\text{M}$  Ouabain allein beeinflusste den  $\text{pH}_i$  nicht. Die DA-induzierte Ansäuerung war aber in Anwesenheit von Ouabain nur noch transient und betrug maximal  $20,2 \pm 4,5 \%$  der Ansäuerung unter Kontrollbedingungen ( $n = 6$ , gepaarter  $t$ -Test,  $P < 0,01$ ) (Abb. 3.0). Die Aktivität der basolateralen  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase war demnach Voraussetzung für die DA-induzierte Ansäuerung in den Ausführungsgängen.



**Abb. 3.0** Hemmung der DA-induzierten intrazellulären Ansäuerung ( $1 \mu\text{M}$  DA) in den Ausführungsgängen isolierter Loben der Speicheldrüse in  $\text{HCO}_3^-$ -freier Tris-Ringerlösung in Gegenwart von  $100 \mu\text{M}$  Ouabain,  $n = 6$ .

### 3.4.5 Beziehung zwischen DA-induziertem $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg und DA-induzierter intrazellulärer Ansäuerung

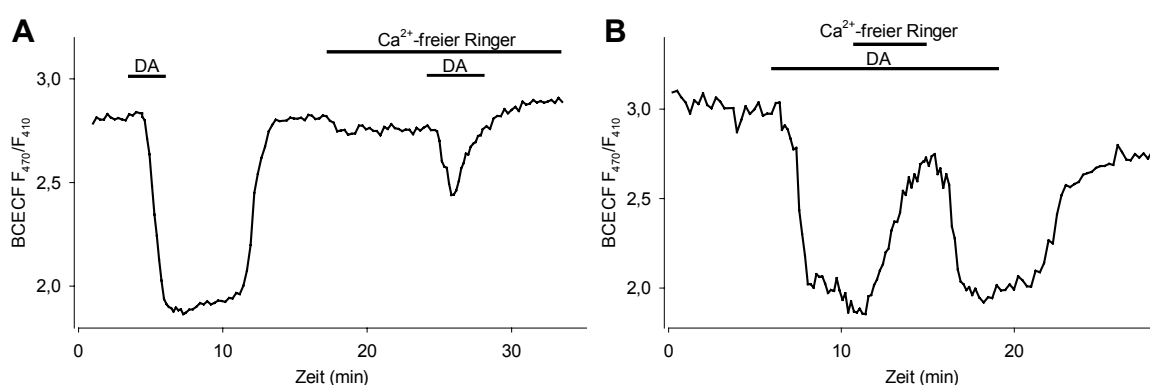
Die bisher beschriebenen Experimente hatten gezeigt, dass der DA-induzierte  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg sowie der DA-induzierte  $pH_i$ -Abfall in isolierten Ausführgängen in Tris-Ringerlösung nur dann messbar waren, wenn (1.) die Ausführgänge noch Acini besaßen und (2.) der NKCC funktional war. Deshalb wurde auch untersucht, welche zeitliche Beziehung zwischen den DA-induzierten Änderungen der  $[Ca^{2+}]_i$  und des  $pH_i$  besteht. Die Frage war, ob zwischen beiden Parametern eine kausale Beziehung besteht. Bei der simultanen Messung von  $pH_i$  und  $[Ca^{2+}]_i$  in den Ausführgängen isolierter Loben war bei Stimulierung mit  $1 \mu M$  DA eine rasche intrazelluläre Ansäuerung zu beobachten. Der DA-induzierte  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg begann erst  $48,6 \pm 5,6$  s ( $n = 7$ ) nach Einsetzen der Ansäuerung (Abb. 3.0). Zu diesem Zeitpunkt war das Maximum der Ansäuerung bereits nahezu vollständig erreicht. Nach dem Auswaschen des DA war die  $pH_i$ -Erholung schneller abgeschlossen als die  $[Ca^{2+}]_i$ -Erholung.



**Abb. 3.0** Simultane Messung von DA-induzierten Änderungen ( $1 \mu M$  DA) von  $pH_i$  (durchgezogene Linie) und  $[Ca^{2+}]_i$  (gestrichelte Linie) in den Ausführgängen isolierter Loben der Speicheldrüse,  $n = 7$ .

LANG & WALZ (1999) hatten gezeigt, dass der  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg vollständig auf einen  $Ca^{2+}$ -Influx aus dem Extrazellulärraum zurückzuführen ist und durch  $La^{3+}$  blockiert wird. Ergebnisse dieser Doktorarbeit schlagen eine DA-induzierte Umkehr der Transportrichtung des NCE in den  $Ca^{2+}$ -Influx-Modus vor. Interessanterweise war auch die DA-induzierte intrazelluläre Ansäuerung  $Ca^{2+}$ -abhängig (Abb. 3.0). Das Entfernen von extrazellulärem  $Ca^{2+}$  führte nur noch zu einer transienten DA-

induzierten Ansäuerung. Die maximale Ansäuerung war mit  $53,5 \pm 9,0\%$  signifikant niedriger als in der Kontrolle ( $n = 6$ , gepaarter  $t$ -Test,  $P < 0,05$ ). Bezüglich ihrer Kinetik war die DA-Antwort in  $\text{Ca}^{2+}$ -freier Ringerlösung der Antwort bei NKCC-Hemmung sehr ähnlich (vgl. Abb. 3.0B & Abb. 3.0A). Das Entfernen von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  während der DA-Stimulierung führte zu einer intrazellulären Alkalisierung. Diese war reversibel, da sie bei erneuter Zugabe von  $\text{Ca}^{2+}$  wieder in einer stabilen Ansäuerung resultierte. Extrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$  war demnach nicht nur für die Initiierung der Ansäuerung, sondern auch zur Aufrechterhaltung einer stabilen Ansäuerung nötig.



**Abb. 3.0**  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit der DA-induzierten Ansäuerung ( $1 \mu\text{M}$  DA) in den Ausführungsgängen isolierter Loben der Speicheldrüse. **(A)** Transiente DA-induzierte Ansäuerung in Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$ -freier Ringerlösung,  $n = 6$ . **(B)** Unterdrückung der DA-induzierten Ansäuerung beim Wechsel zur  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Ringerlösung während der DA-Stimulierung,  $n = 5$ .

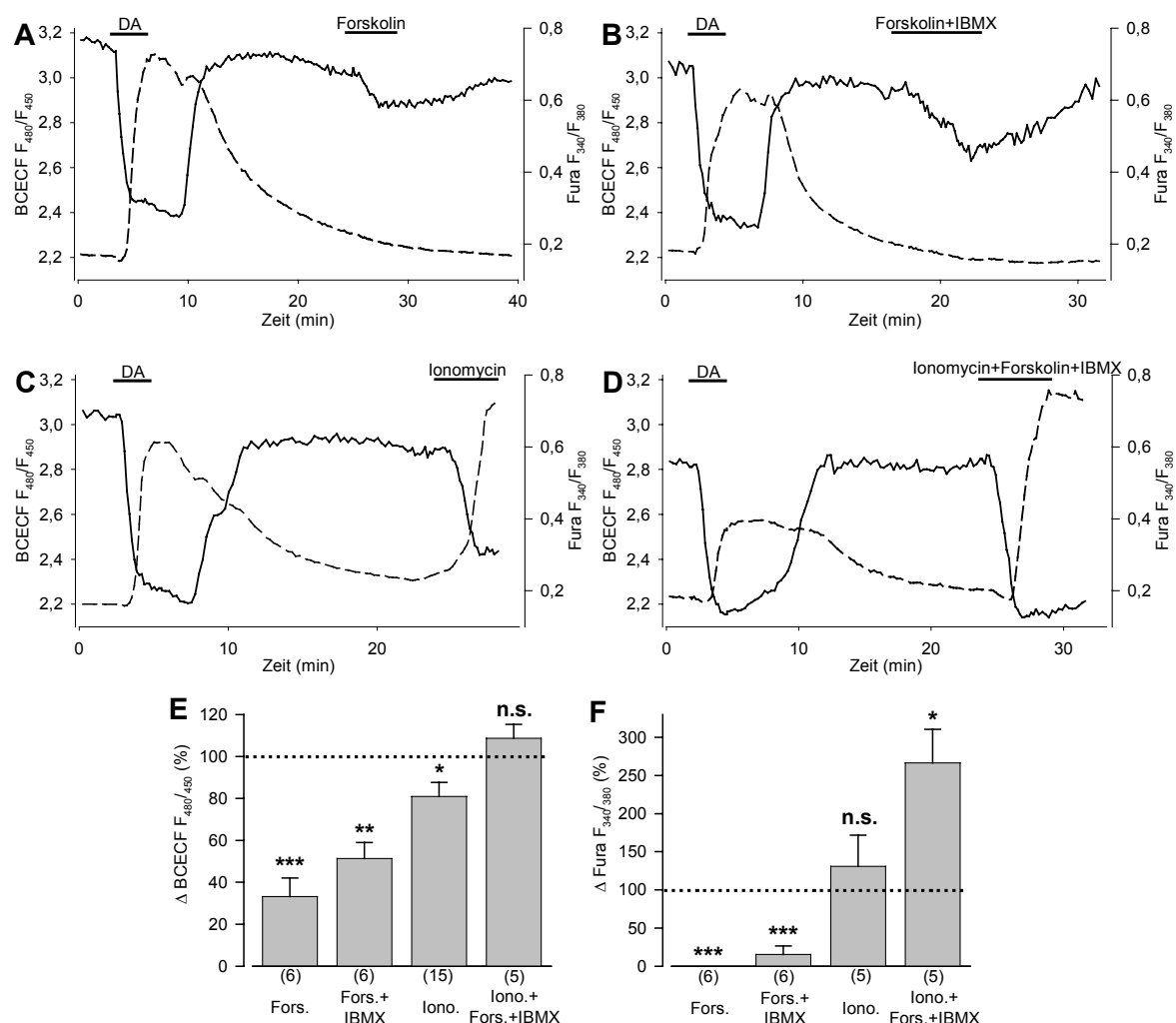
Der Stimulus-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx in die Zelle kann in vielen Systemen durch  $\text{La}^{3+}$  gehemmt werden (KWAN *et al.* 1990). Ähnlich wie beim DA-induzierten  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg konnte bei Badapplikation von  $100 \mu\text{M}$   $\text{La}^{3+}$  die DA-induzierte intrazelluläre Ansäuerung drastisch unterdrückt werden ( $n = 6$ ). In 3 Präparationen war eine schwache, transiente Ansäuerung zu sehen, während in 3 anderen Präparationen keine Ansäuerung zu beobachten war (Daten nicht dargestellt).

### 3.4.6 Ansäuerung nach einem Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ und der $[\text{cAMP}]_i$

Weiterhin wurde die Beteiligung der intrazellulären Botenstoffe  $\text{Ca}^{2+}$  und cAMP an der DA-induzierten intrazellulären Ansäuerung in den Ausführungsgängen isolierter Loben untersucht, um Informationen darüber zu erhalten, welche Signalkaskaden stromabwärts des DA-Rezeptors für die Aktivierung der beteiligten Transporter

verantwortlich sind. Zu diesem Zweck wurden bei Simultanmessungen der  $\text{pH}_i$  und  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in Tris-Ringerlösung Substanzen eingesetzt, die potentiell zu einer Erhöhung der  $[\text{cAMP}]_i$  oder der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  führen. Die Amplituden der DA-induzierten Änderungen beider Parameter wurden auf diejenigen einer zuvor erfolgten Kontrollstimulierung mit  $1 \mu\text{M}$  DA normiert.

Zur Erhöhung der  $[\text{cAMP}]_i$  wurden der Adenylatzyklase-Aktivator Forskolin und der Phosphodiesterase-Hemmstoff IBMX (3-Isobutyl-1-methylxanthin) eingesetzt. Die Badapplikation von  $100 \mu\text{M}$  Forskolin verursachte eine langsame Ansäuerung, die aber im Vergleich zur Kontrolle nur  $33,2 \pm 8,9 \%$  betrug. Forskolin beeinflusste die  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  aber nicht ( $n = 6$ , gepaarter  $t$ -Test,  $P < 0,001$ ) (Abb. 3.0A,E,F). Durch



**Abb. 3.0** Imitierung der DA-induzierten Ansäuerung ( $1 \mu\text{M}$  DA) in Ausführgängen isolierter Loben der Speicheldrüse durch die Erhöhung der  $[\text{cAMP}]_i$  und/oder  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Simultanmessungen von  $\text{pH}_i$  (durchgezogene Linien) und  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (gestrichelte Linien). **(A)** Effekt von  $100 \mu\text{M}$  Forskolin (Fors.),  $n = 6$ . **(B)** Effekt von  $100 \mu\text{M}$  Forskolin und  $500 \mu\text{M}$  IBMX,  $n = 6$ . **(C)** Effekt von  $10 \mu\text{M}$  Ionomycin (Iono.),  $n = 5$ . **(D)** Effekt von  $100 \mu\text{M}$  Forskolin,  $500 \mu\text{M}$  IBMX und  $10 \mu\text{M}$  Ionomycin,  $n = 5$ . Zusammenfassung der Effekte auf **(E)**  $\text{pH}_i$  und **(F)**  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Die Werte wurden auf eine jeweils zuvor erfolgte Kontrollstimulierung mit  $1 \mu\text{M}$  DA (= 100 %, gestrichelte Linien) normalisiert. Gepaarter  $t$ -Test, Kontrolle vs. Behandlung, \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$ , Mittelwerte + SE, ( $n$ ).



Badapplikation von 100  $\mu\text{M}$  Forskolin zusammen mit 500  $\mu\text{M}$  IBMX konnte die Ansäuerung verstärkt werden, war aber mit  $51,3 \pm 7,6 \%$  immer noch signifikant niedriger als in der Kontrolle ( $n = 6$ , gepaarter  $t$ -Test,  $P < 0,01$ ) (Abb. 3.0B,E). Es wurde zudem nur ein vernachlässigbar geringer Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg registriert (Abb. 3.0B,F).

Zur Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  wurde der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophor Ionomycin eingesetzt. Die Badapplikation von 10  $\mu\text{M}$  Ionomycin verursachte eine rasche Ansäuerung, die in ihrer Kinetik der DA-induzierten Ansäuerung ähnelte. Dennoch erreichte sie nur  $81,0 \pm 6,7 \%$  der Kontrolle ( $n = 15$ , gepaarter  $t$ -Test,  $P < 0,05$ ) (Abb. 3.0C,E). Zudem bewirkte Ionomycin einen  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg, der in seinem Betrag dem DA-induzierten  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg entsprach ( $n = 5$ , gepaarter  $t$ -Test,  $P > 0,05$ ) (Abb. 3.0C,F). Es konnte aber nicht unterschieden werden, ob der Anstieg nur aus der Aktivität des  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophors oder auch aus DA-induzierten Prozessen resultierte.

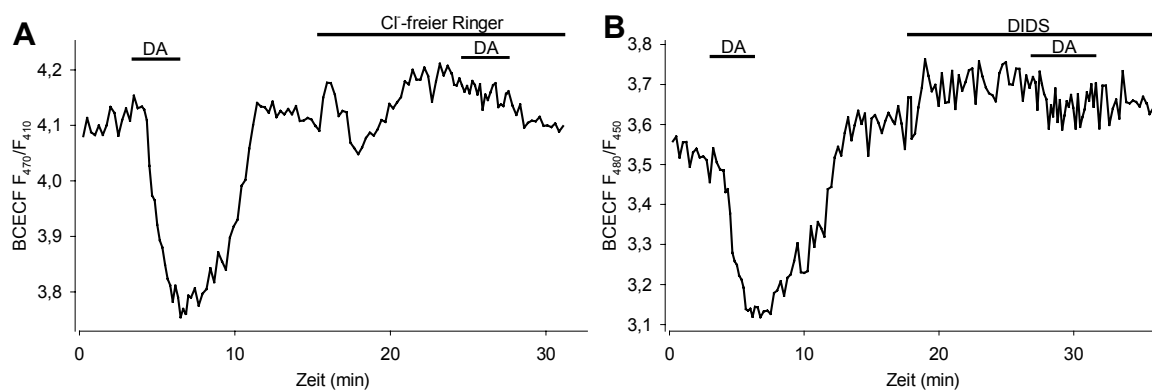
Erst durch eine simultane Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  und der  $[\text{cAMP}]_i$  konnte eine Ansäuerung beobachtet werden, die sich mit  $108,7 \pm 6,6 \%$  nicht von der DA-induzierten Ansäuerung unterschied ( $n = 5$ , gepaarter  $t$ -Test,  $P > 0,05$ ) (Abb. 3.0D,E). Der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg war mit  $266,6 \pm 44,1 \%$  deutlich höher als bei der Kontrolle ( $n = 5$ , gepaarter  $t$ -Test,  $P < 0,05$ ) (Abb. 3.0D,F).

### 3.5 DA-induzierte intrazelluläre Ansäuerung in isolierten Ausführgängen

#### 3.5.1 Abhängigkeit vom $\text{Cl}^-$ - $\text{HCO}_3^-$ -Antiporter

Ein Problem bei der Interpretation der  $\text{pH}_i$ -Messungen in Ausführgängen mit Acini war, dass der Wirkungsort (Ausführgang vs. Acini) der Pharmaka bzw. der Ringerlösungen nicht eindeutig war. Diese konnten direkt auf die Ausführgänge wirken. Es bestand aber auch die Möglichkeit, dass die direkten Effekte an den Acini auftraten, die dann indirekt zu Veränderungen in den Ausführgängen führten. Deshalb wurden Untersuchungen an isolierten Ausführgängen ohne Acini in  $\text{HCO}_3^-$ -freier Tris-Ringerlösung durchgeführt. Es sollte getestet werden, warum die DA-induzierte intrazelluläre Ansäuerung in isolierten Ausführgängen ohne Acini wesentlich geringer war als in Ausführgängen mit Acini (siehe Abb. 3.0).

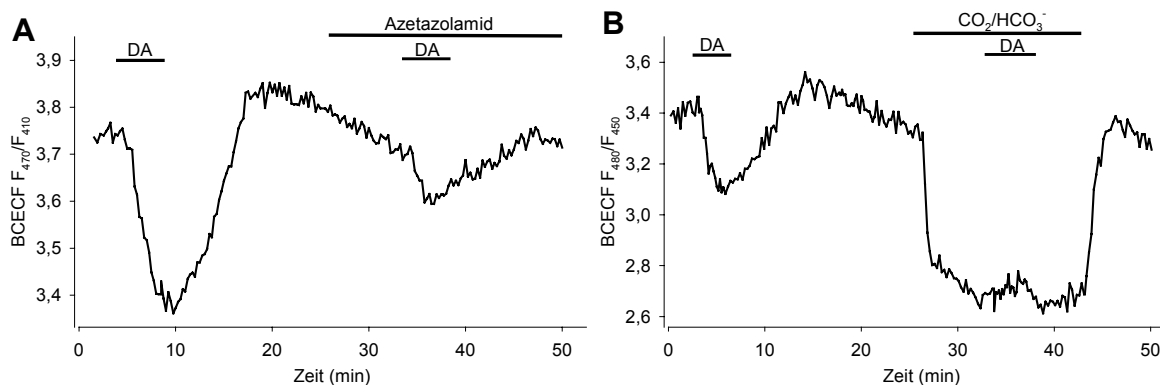
Auch in isolierten Ausführgängen ohne Acini konnte in  $\text{Cl}^-$ -freier und  $\text{HCO}_3^-$ -freier Tris-Ringerlösung die DA-induzierte intrazelluläre Ansäuerung komplett unterdrückt werden (Abb. 3.0A,  $n = 6$ ). Beim Wechsel zu  $\text{Cl}^-$ -freier Ringerlösung kam es zunächst zu uneinheitliche Schwankungen des  $\text{pH}_i$ , die möglicherweise Artefakte aufgrund des Lösungstauschs waren. Danach war intrazellulär eine Alkalisierung zu registrieren, die wiederum auf die Aktivität eines  $\text{Cl}^-$ -abhängigen  $\text{pH}_i$ -Regulationsmechanismus wie dem AE hindeutete.



**Abb. 3.0**  $\text{Cl}^-$ -Abhängigkeit der DA-induzierten Ansäuerung ( $1 \mu\text{M}$  DA) in isolierten Ausführgängen der Speicheldrüse. Hemmung der DA-induzierten Ansäuerung (**A**) in Gegenwart von  $\text{Cl}^-$ -freier Ringerlösung  $n = 6$ , und (**B**) bei Badapplikation von  $500 \mu\text{M}$  DIDS,  $n = 8$ .

Der NKCC war an der DA-induzierten Ansäuerung nicht beteiligt, da dessen Hemmung mit  $10 \mu\text{M}$  Bumetanid keinen Einfluss auf die Ansäuerung hatte. In Anwesenheit von Bumetanid betrug die DA-induzierte Ansäuerung ( $1 \mu\text{M}$  DA)  $109,9 \pm 12,0 \%$  der Ansäuerung der Kontrollstimulierung ( $n = 6$ , gepaarter  $t$ -Test,  $P > 0,05$ ). Andererseits konnte die DA-induzierte Ansäuerung durch die Badapplikation von  $500 \mu\text{M}$  DIDS um  $64,4 \pm 3,7 \%$  gehemmt werden ( $n = 8$ , gepaarter  $t$ -Test,  $P < 0,001$ ) (Abb. 3.0B). Anscheinend war in isolierten Ausführgängen die Aktivität eines DIDS-sensitiven  $\text{Cl}^-$ - $\text{HCO}_3^-$ -Antiporters Ursache für die DA-induzierte Ansäuerung.

Intrazelluläres  $\text{HCO}_3^-$  für die Aktivität des AE könnte durch die Aktivität der Carboanhydrase verfügbar sein. Die Hemmung der Carboanhydrase mit  $500 \mu\text{M}$  Azetazolamid reduzierte tatsächlich die DA-induzierte Ansäuerung, die nur noch  $45,1 \pm 19,7 \%$  der Ansäuerung der Kontrollstimulierung betrug ( $n = 7$ , gepaarter  $t$ -Test,  $P < 0,01$ ) (Abb. 3.0A).



**Abb. 3.0** Einfluss von  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$  auf die DA-induzierte Ansäuerung ( $1 \mu\text{M}$  DA) in den isolierten Ausführungsgängen der Speicheldrüse. **(A)** Hemmung der DA-induzierten Ansäuerung durch Badapplikation von  $500 \mu\text{M}$  Azetazolamid,  $n = 7$ . **(B)** Unterdrückung der DA-induzierten Ansäuerung in  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -gepufferter Ringerlösung,  $n = 5$ .

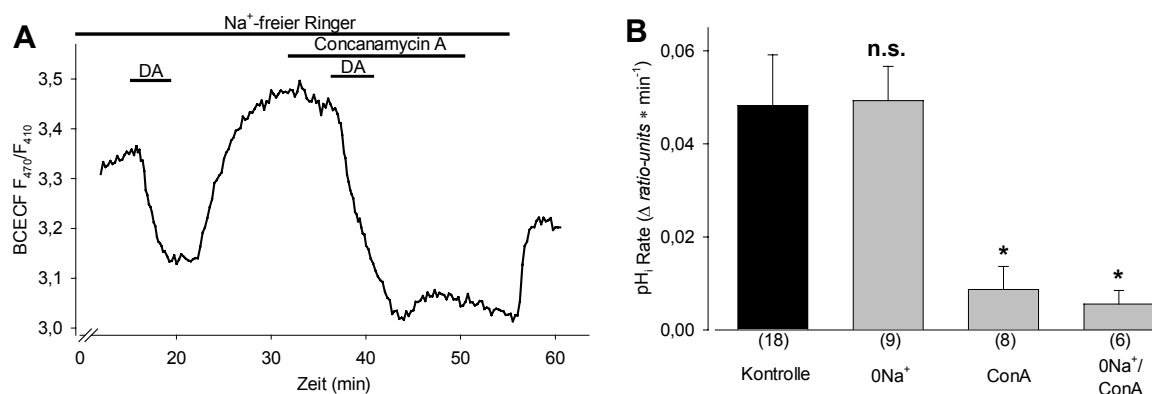
Die DA-induzierte Ansäuerung wurde auch in  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -gepufferter Ringerlösung untersucht. Beim Wechsel von Tris- zu  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -gepufferter Ringerlösung war die bereits beschriebene typische intrazelluläre Ansäuerung zu beobachten, die innerhalb von 1-2 min zu einem neuen konstanten  $\text{pH}_i$  führte (siehe Abb. 3.0A). Die Stimulierung mit  $1 \mu\text{M}$  DA führte im Gegensatz zur Kontrollstimulierung in Tris-Ringerlösung zu keiner weiteren Veränderung des  $\text{pH}_i$  ( $n = 5$ , gepaarter  $t$ -Test,  $P < 0,001$ ) (Abb. 3.0B).

### 3.5.2 Abhängigkeit der $\text{pH}_i$ -Erholung von der Aktivität der $\text{V-H}^+$ -ATPase

Nachfolgend wurden die Mechanismen der  $\text{pH}_i$ -Erholung nach DA-induzierter Ansäuerung in isolierten Ausführungsgängen ohne Acini in Tris-gepufferter Ringerlösung untersucht.  $\text{Na}^+$ -freie Ringerlösung beeinflusste weder die DA-induzierte Ansäuerung ( $1 \mu\text{M}$  DA) noch die  $\text{pH}_i$ -Erholung nach dem Auswaschen des DA (Abb. 3.0,  $n = 9$ ).

Die Badapplikation von  $1 \mu\text{M}$  Concanamycin A in  $\text{Na}^+$ -freier Ringerlösung führte dagegen dazu, dass die DA-induzierte Ansäuerung ( $1 \mu\text{M}$  DA) zunächst stärker war. Nach dem Auswaschen des DA kehrte der  $\text{pH}_i$  jedoch nicht mehr zum Ruhe- $\text{pH}_i$  zurück. Die anfängliche  $\text{pH}_i$ -Erholungsrate war mit  $0,006 \pm 0,003 \text{ ratio-units min}^{-1}$  ( $n = 6$ ) signifikant um etwa 89 % niedriger als die unter Kontrollbedingungen beobachtete  $\text{pH}_i$ -Erholungsrate von  $0,048 \pm 0,011 \text{ ratio-units min}^{-1}$  ( $n = 18$ ) (Ein-Wege ANOVA,  $P < 0,05$ ) (Abb. 3.0B).

Nach erneuter Zugabe von extrazellulärem  $\text{Na}^+$  war eine rasche  $\text{pH}_i$ -Erholung zu sehen, die aber nicht bis zum Ausgangs- $\text{pH}_i$  erfolgte. Die Hemmung der  $\text{pH}_i$ -Erholung in Gegenwart von Concanamycin A konnte auch in  $\text{Na}^+$ -haltiger Ringerlösung beobachtet werden. Die  $\text{V-H}^+$ -ATPase wirkte also maßgeblich an der Erholung von einer DA-induzierten intrazellulären Ansäuerung in isolierten Ausführgängen ohne Acini mit.



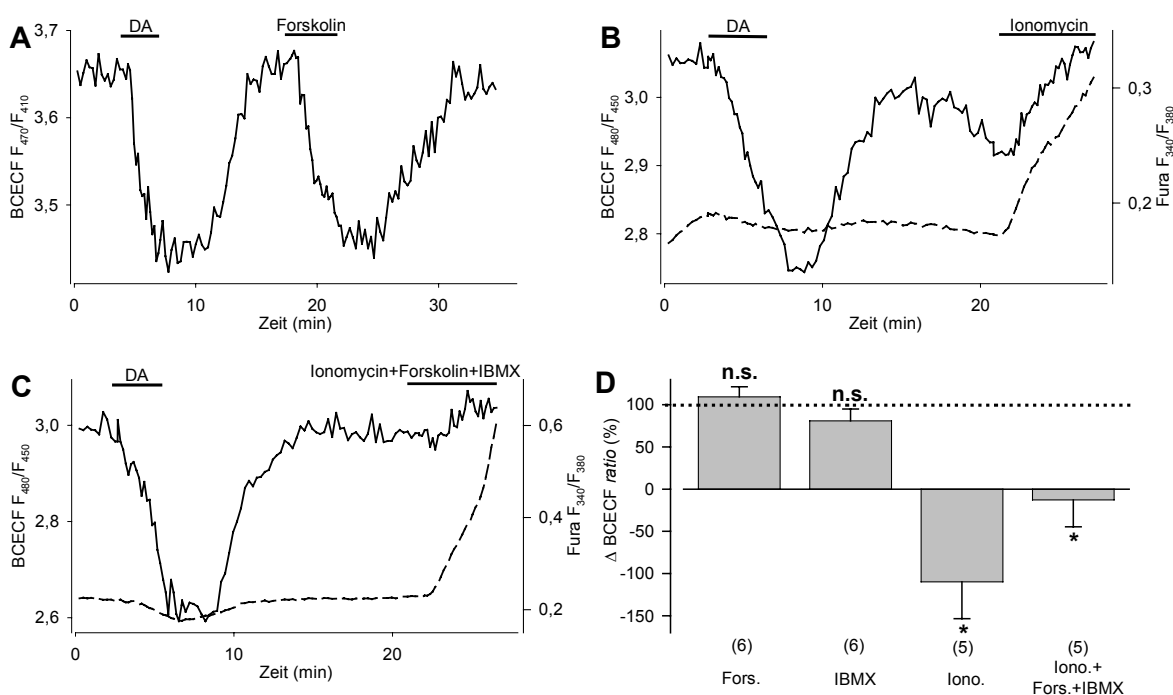
**Abb. 3.0**  $\text{pH}_i$ -Erholung nach einer DA-induzierten Ansäuerung ( $1 \mu\text{M}$  DA) in isolierten Ausführgängen der Speicheldrüse in  $\text{HCO}_3^-$ -freier Tris-Ringerlösung. **(A)** Originalregistrierung der Effekte von  $\text{Na}^+$ -freiem Ringer ( $0\text{Na}^+$ ) und  $1 \mu\text{M}$  Concanamycin A (ConA, badseitig appliziert). **(B)** Statistische Auswertung der  $\text{pH}_i$ -Erholungsraten der ersten 3 min. Ein-Wege ANOVA und Dunnett's *post hoc* Tests, Kontrolle vs. Behandlung, \*  $P < 0,05$ , (n), Mittelwerte + SE.

### 3.5.3 Ansäuerung nach einem Anstieg der $[\text{cAMP}]_i$

Weiterhin wurde die Beteiligung der intrazellulären Botenstoffe  $\text{Ca}^{2+}$  und cAMP an der DA-induzierten intrazellulären Ansäuerung in isolierten Ausführgängen ohne Acini untersucht. Durch die Badapplikation von  $100 \mu\text{M}$  Forskolin oder  $500 \mu\text{M}$  IBMX konnte die DA-induzierte Ansäuerung mit  $109,3 \pm 12,0 \%$  ( $n = 6$ ) bzw.  $80,9 \pm 14,0 \%$  ( $n = 6$ ) der Ansäuerung der Kontrolle vollständig imitiert werden (gepaarter *t*-Test,  $P > 0,05$ ) (Abb. 3.0A,D).

Bei der Verwendung von Ionomycin zur Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  wurden in den Ausführgängen simultan  $\text{pH}_i$  und  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  gemessen. Wie bereits gezeigt, bewirkte die Stimulierung mit  $1 \mu\text{M}$  DA in isolierten Ausführgängen ohne Acini keine Veränderungen der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Die Badapplikation von  $10 \mu\text{M}$  Ionomycin führte zwar zu einem erwarteten Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , nicht aber zu einer Ansäuerung. Vielmehr wurde in den Ausführgängen eine intrazelluläre Alkalisierung beobachtet (Abb. 3.0B,D). Diese Alkalisierung war anscheinend das Ergebnis eines

elektroneutralen Austauschs von  $\text{Ca}^{2+}$  und  $2\text{H}^+$ , den Ionomycin katalysiert (KAUFFMAN *et al.* 1980). Die gleichzeitige Erhöhung von  $[\text{cAMP}]_i$  und  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  durch kombinierte Badapplikation von  $100 \mu\text{M}$  Forskolin,  $500 \mu\text{M}$  IBMX und  $10 \mu\text{M}$  Ionomycin resultierte in einer schwächeren intrazellulären Alkalisierung (Abb. 3.0C,D). Offenbar wurde die Ionomycin-induzierte Alkalisierung durch die Forskolin- und IBMX-induzierte Ansäuerung teilweise kompensiert. Eine Erhöhung der  $[\text{cAMP}]_i$  in den Ausführungsgängen allein konnte demnach die DA-induzierte Ansäuerung imitieren, während eine Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  den DA-Effekt nicht imitieren konnte.

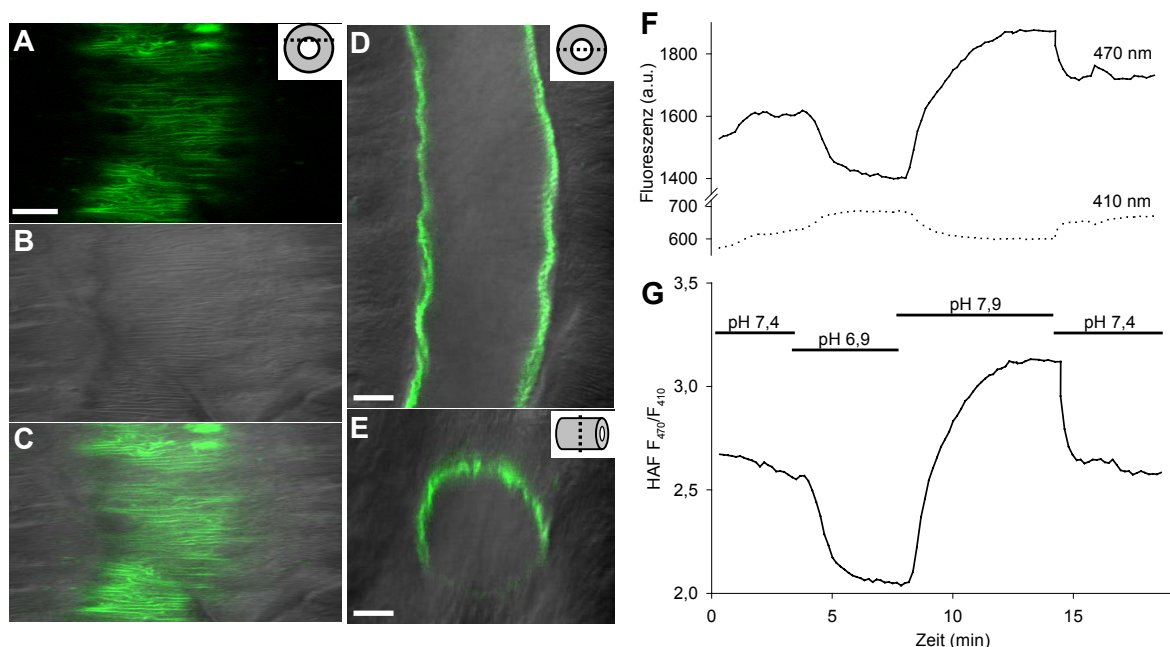


**Abb. 3.0** Imitierung der DA-induzierten Ansäuerung ( $1 \mu\text{M}$  DA) in isolierten Ausführungsgängen der Speicheldrüse durch die Erhöhung von  $[\text{cAMP}]_i$ , nicht aber durch die Erhöhung von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Messungen von  $\text{pH}_i$  (durchgezogene Linien), teilweise simultan auch  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (gestrichelte Linien). (A) Effekt von  $100 \mu\text{M}$  Forskolin (Fors.),  $n = 6$ . (B) Effekt von  $10 \mu\text{M}$  Ionomycin (Iono.),  $n = 5$ . (C) Effekt von  $100 \mu\text{M}$  Forskolin,  $500 \mu\text{M}$  IBMX und  $10 \mu\text{M}$  Ionomycin,  $n = 5$ . (D) Zusammenfassung der Effekte auf  $\text{pH}_i$ . Die Werte sind auf eine jeweils zuvor erfolgte Kontrollstimulierung mit  $1 \mu\text{M}$  DA (= 100 %, gestrichelte Linie) normiert. Darstellung bei Iono. und Iono.+Fors.+IBMX kennzeichnet Alkalisierung. Gepaarter  $t$ -Test, Kontrolle vs. Behandlung, \*  $P < 0,05$ , Mittelwerte + SE, ( $n$ ).

### 3.6 Messung des pH an der Oberfläche des Ausführungsglumens (pH<sub>s</sub>)

#### 3.6.1 Lokalisation und pH-Empfindlichkeit von HAF im Ausführungsglumen

Die Beteiligung der apikal lokalisierten V-H<sup>+</sup>-ATPase an der Speichelmodifikation in den Ausführungsgängen wurde mit einem Fluoreszenzfarbstoff untersucht, der es ermöglichte, pH-Änderungen extrazellulär im Ausführungsglumen zu registrieren. Wenn durch die Aktivität der V-H<sup>+</sup>-ATPase Protonen in das Ausführungsglumen transportiert werden, sollte dies zu Änderungen des luminalen pH führen. Es konnte eine Methode zur Messung lokaler pH-Änderungen an der lumenseitigen Oberfläche der Ausführungsgangepithelzellen (pH<sub>s</sub>) etabliert werden. Dazu wurde der pH-empfindliche Fluoreszenzfarbstoff HAF verwendet. Eine Voraussetzung für lokale pH<sub>s</sub>-Messungen ist die ausschließliche Lokalisation des HAF an der luminalen Epitheloberfläche. Für die luminalen pH Messungen wurde HAF mit Hilfe einer Mikroelektrode in das Ausführungsglumen injiziert. Die HAF-Verteilung im Ausführungsglumen wurde anschließend konfokalmikroskopisch an den isolierten Ausführungsgängen untersucht (Abb. 3.0A-E). In optischen Längsschnitten



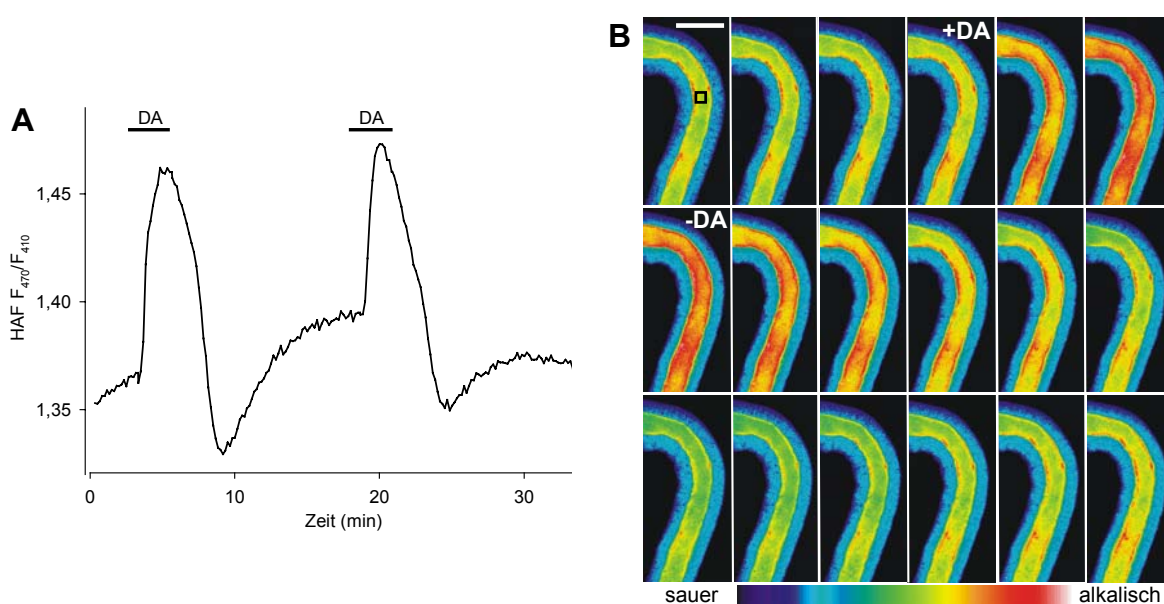
**Abb. 3.0 (A-E)** Konfokalmikroskopische Aufnahmen von Ausführungsgängen isolierter Speicheldrüsen, denen 30  $\mu\text{M}$  HAF in das Ausführungsglumen injiziert wurde. Die optische Schnittebene ist jeweils oben rechts dargestellt, Balken = 10  $\mu\text{m}$ . **(A-C)** HAF-Fluoreszenz, differentieller Interferenzkontrast (DIK) und Überlagerung beider Aufnahmen eines tangentialen Längsschnitts. **(D)** HAF-Fluoreszenz und DIK eines medianen Längsschnitts. **(E)** HAF-Fluoreszenz und DIK eines Querschnitts. **(F,G)** Inkubation isolierter Ausführungsgänge mit 30  $\mu\text{M}$  HAF. Registrierung der pH-Empfindlichkeit von basolateral eingebautem HAF mittels Perfusion von Ringerlösungen mit unterschiedlichem pH. Darstellung der Fluoreszenzintensitäten bei den Anregungswellenlängen 410 nm und 470 nm sowie der HAF *ratio*.

im Bereich der apikalen Membran des Ausführungsepithels konnte eine streifenartige Verteilung der HAF-Fluoreszenz beobachtet werden. Eine streifen- bis spiralförmige Struktur war auch im differentiellen Interferenzkontrast zu erkennen. Diese Struktur war die kutikuläre Auskleidung des Ausführungslumens (Intima). Mediane optische Längsschnitte sowie Querschnitte zeigten ebenfalls eine HAF-Fluoreszenz nur an der Lumenoberfläche. Es konnte keine HAF-Fluoreszenz innerhalb der Epithelzellen detektiert werden. HAF zeigte demnach eine distinkte Lokalisation an der luminalen Ausführungsoberfläche. Es konnte aber nicht entschieden werden, ob HAF lediglich an der kutikulären Intima gebunden war oder tatsächlich in die apikale Membran der Epithelzellen inseriert war. Für die Messung der luminalen  $\text{pH}_s$ -Änderungen ist diese Frage aber nicht von Bedeutung, denn unabhängig von der genauen Lokalisation wird HAF  $\text{pH}_s$ -Änderungen in unmittelbarer Nachbarschaft zur apikalen Membran registrieren.

Im nächsten Schritt wurde die pH-Empfindlichkeit der luminalen HAF-Fluoreszenz untersucht. Dazu wurden isolierte Ausführungsgänge 3 min lang in 30  $\mu\text{M}$  HAF inkubiert, so dass sich HAF in die basolaterale Membran einlagern konnte. Änderungen des pH in der Ringerlösung resultierten in antiparallelen Änderungen der Fluoreszenzsignale bei den beiden Anregungswellenlängen 470 nm und 410 nm (Abb. 3.0F). Bei einer Alkalisierung nahm das Signal bei 470 nm zu, während das Signal bei 410 nm abnahm. Dies war ein Hinweis auf die Verschiebung des Absorptionsspektrums hin zu längeren Wellenlängen bei Alkalisierung. Zudem war eine pH-unabhängige Drift der Fluoreszenzintensitäten hin zu höheren Intensitäten zu beobachten. Das Ausmaß dieser Drift war variabel und anscheinend auf den Einbau weiterer HAF-Moleküle während des Experiments zurückzuführen. In der berechneten HAF *ratio*  $F_{470}/F_{410}$  war diese Drift nicht sichtbar. Bei einer Alkalisierung nahm  $F_{470}/F_{410}$  zu, während  $F_{470}/F_{410}$  bei einer Ansäuerung abnahm (Abb. 3.0G). Die pH-Empfindlichkeit des HAF konnte nicht an Ausführungsgängen untersucht werden, bei denen HAF luminal injiziert und somit in die apikale Membran eingebaut wurde. Änderungen des pH in der Ringerlösung führten aufgrund des dazwischen liegenden Epithels keineswegs zu Änderungen der HAF-Fluoreszenz im Lumen ( $n = 5$ ).

### 3.6.2 DA-induzierte biphasische $\text{pH}_s$ -Änderungen

Der Effekt der DA-Stimulierung auf  $\text{pH}_s$  wurde an isolierten, HAF-injizierten Ausführungsgängen ohne Acini untersucht.  $F_{470}/F_{410}$  variierte in nicht-stimulierten Ausführungsgängen zwischen einzelnen Präparationen und war auch entlang des Lumens eines Ausführungsgangs leicht unterschiedlich (siehe Abb. 3.0B). Die Ursache ist wahrscheinlich im unterschiedlichen Ausmaß der HAF-Einlagerung in die apikale Membran bzw. in die Intima zu suchen. Die Stimulierung isolierter Ausführungsgänge mit  $1 \mu\text{M}$  DA führte zu biphasischen  $\text{pH}_s$ -Änderungen (Abb. 3.0A).



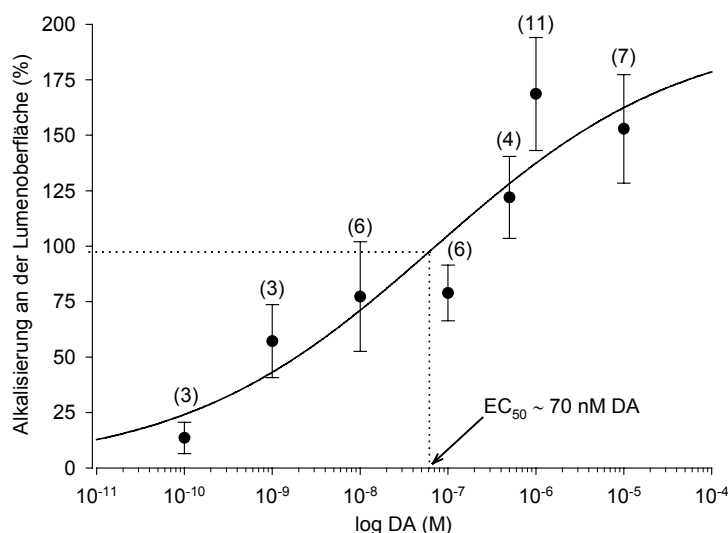
**Abb. 3.0** DA-induzierte  $\text{pH}$ -Änderungen ( $1 \mu\text{M}$  DA) an der Oberfläche des Lumens ( $\text{pH}_s$ ) isolierter Ausführungsgänge der Speicheldrüse. **(A)** Effekt zweier nacheinander erfolgter DA-Stimulierungen auf  $\text{pH}_s$ . Darstellung der HAF *ratio*,  $n = 11$ . **(B)** Serie von Falschfarbenbildern der  $F_{470}/F_{410}$  *ratio* eines Ausführungsgangs, die DA-induzierte  $\text{pH}_s$ -Änderungen darstellt. Das im ersten Bild gezeigte Kästchen markiert die Region für die Messung in A. Blaue Farben kennzeichnen die Autofluoreszenz des Epithels. Intervall = 60 s, Balken = 50  $\mu\text{m}$ .

Die HAF *ratio*  $F_{470}/F_{410}$  stieg 30-60 s nach Badapplikation von  $1 \mu\text{M}$  DA an und kennzeichnete damit eine Alkalisierung. Die DA-induzierte luminale Alkalisierung erfolgte gleichzeitig im gesamten untersuchten Bereich des gemessenen Ausführungsgangs (Abb. 3.0B). Mit Hilfe der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie wurden auch HAF-Fluoreszenzsignale aus Nichtfokusebenen detektiert, so dass die HAF-Fluoreszenz scheinbar im gesamten Ausführungslumen sichtbar war. Bei den meisten Präparationen blieb der  $\text{pH}_s$ -Anstieg während der DA-Stimulierung erhalten. Manchmal war der  $\text{pH}_s$ -Anstieg aber transient und ging bereits während



der DA-Stimulierung leicht zurück. Nach dem Auswaschen des DA erfolgte ein rapider  $\text{pH}_s$ -Abfall. Diese luminale Ansäuerung erfolgte zumeist bis unterhalb des Ausgangs- $\text{pH}_s$ . Nach etwa 5-15 min war ein neuer Ruhewert erreicht. Die luminale Ansäuerung nach dem Auswaschen von DA war in ihrer Kinetik und Stärke aber zwischen einzelnen Präparationen variabel.

Die DA-induzierte luminale Alkalisierung war konzentrationsabhängig (Abb. 3.0). Zur Eliminierung individueller Schwankungen wurde bei allen Experimenten zuerst eine Kontrollstimulierung mit  $1 \mu\text{M}$  DA durchgeführt. Die nachfolgende Teststimulierung konnte somit auf die Kontrollstimulierung normiert werden (siehe Abb. 3.0A). Die Dosis-Wirkungskurve zeigt, dass eine zweite Stimulierung mit DA effektiver war als die erste. Die Alkalisierung einer zweiten Stimulierung mit  $1 \mu\text{M}$  DA entsprach  $169 \pm 26 \%$  ( $n = 11$ ) der Alkalisierung der ersten Stimulierung mit  $1 \mu\text{M}$  DA. Anscheinend war der Effekt der Teststimulierung von der vorherigen Kontrollstimulierung beeinflusst. Der Schwellenwert für die DA-induzierte luminale Alkalisierung lag bei  $< 0,1 \text{ nM}$  DA. Der halbmaximale Effekt ( $\text{EC}_{50}$ ) von DA konnte bei einer Konzentration von ca.  $70 \text{ nM}$  DA beobachtet werden. Der maximale Effekt ist bei Konzentrationen  $\geq 10 \mu\text{M}$  DA erreicht.



**Abb. 3.0** Dosis-Wirkungskurve der DA-induzierten Alkalisierung an der Oberfläche des Lumens isolierter Ausführungsgänge der Speicheldrüse. Die Werte sind auf eine jeweils zuvor erfolgte Kontrollstimulierung mit  $1 \mu\text{M}$  DA (= 100 %) normalisiert. Mittelwerte  $\pm$  SE, ( $n$ ).

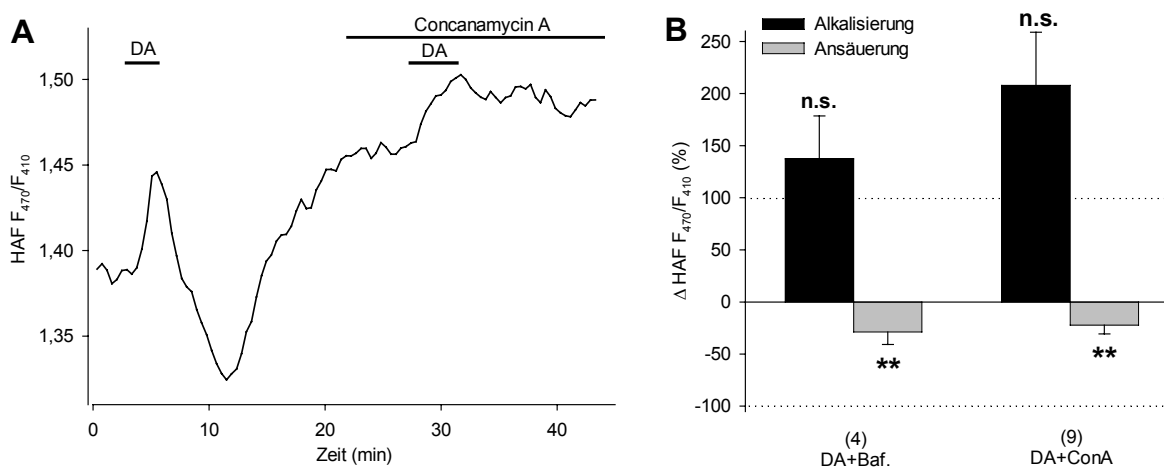
Ausführungsgänge in der unmittelbaren Nähe der Acini sind dopaminerg und serotonerg innerviert (BAUMANN *et al.* 2002). Es konnte in dieser Arbeit bereits gezeigt werden, dass  $1 \mu\text{M}$  5-HT in den Ausführungsgängen isolierter Loben mit Acini

eine intrazelluläre Ansäuerung bewirkt (siehe Kap. 3.3.2). Deshalb wurde auch getestet, ob die Badapplikation von  $1 \mu\text{M}$  5-HT einen Einfluss auf  $\text{pH}_s$  hat. Die Stimulierung isolierter Ausführgänge mit  $1 \mu\text{M}$  5-HT beeinflusste  $\text{pH}_s$  aber nicht ( $n = 6$ ).

Die bisherigen Experimente zur  $\text{pH}_s$ -Messung erfolgten in einer  $\text{HCO}_3^-$ -gepufferten Ringerlösung. Die DA-induzierten biphasischen  $\text{pH}_s$ -Änderungen konnten aber auch bei Verwendung von Tris-gepuffert Ringerlösung ohne  $\text{HCO}_3^-$  beobachtet werden ( $n = 7$ ). Es konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Extrazelluläres  $\text{HCO}_3^-$  (im mM-Bereich) war demnach keine essentielle Voraussetzung für die DA-induzierten  $\text{pH}_s$ -Änderungen. Deshalb erfolgten einige der folgenden Experimente auch in Tris-Ringerlösung.

### 3.6.3 Beteiligung der V- $\text{H}^+$ -ATPase an den DA-induzierten $\text{pH}_s$ -Änderungen

Zur Untersuchung einer Beteiligung der V- $\text{H}^+$ -ATPase an den DA-induzierten  $\text{pH}_s$ -Änderungen wurde diese mit Concanamycin A blockiert. Kontrollexperimente zeigten keinen Einfluss einer Tris-Ringerlösung mit 0,1 % DMSO, dem Lösungsmittel für Concanamycin A, auf den  $\text{pH}_s$  und die DA-induzierten luminalen  $\text{pH}_s$ -Änderungen ( $n = 3$ ). Die Badapplikation von  $1 \mu\text{M}$  Concanamycin A hatte keinen Einfluss auf die DA-induzierte luminale Alkalisierung (Abb. 3.0). Allerdings



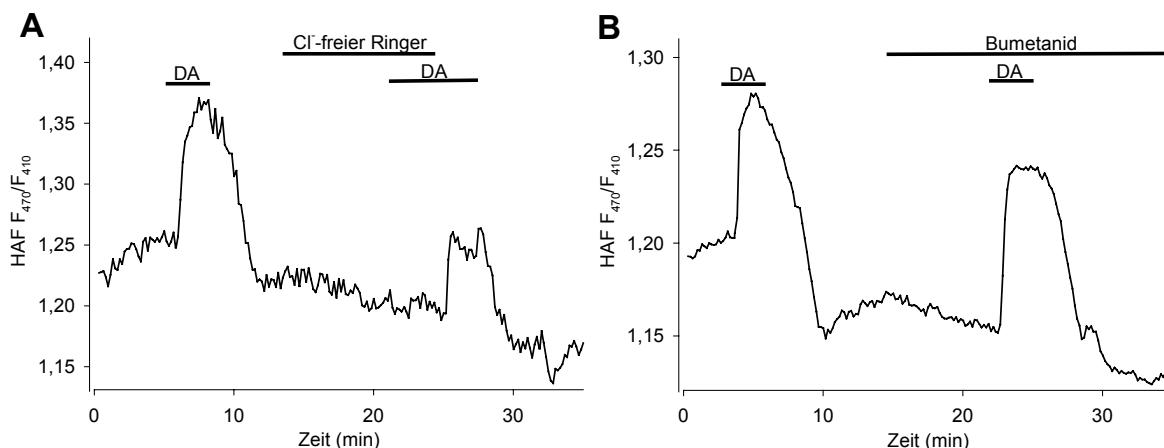
**Abb. 3.0** Einfluss von  $1 \mu\text{M}$  Concanamycin A (ConA) bzw.  $1 \mu\text{M}$  Bafilomycin A (Baf.) auf DA-induzierte pH-Änderungen ( $1 \mu\text{M}$  DA) an der Oberfläche des Lumens isolierter Ausführgänge der Speicheldrüse. **(A)** Originalregistrierung. **(B)** Statistische Auswertung. Die Werte sind auf eine jeweils zuvor erfolgte Kontrollstimulierung mit  $1 \mu\text{M}$  DA (= 100 %, gestrichelte Linien) normalisiert. Gepaarter  $t$ -Test, Kontrolle vs. Behandlung, \*\*  $P < 0,01$ , Mittelwerte + SE, ( $n$ ).

konnte in Anwesenheit von Concanamycin A nach dem Auswaschen des DA die luminale Ansäuerung signifikant gehemmt werden (gepaarter *t*-Test,  $P < 0,01$ ). Die Wirkung von Bafilomycin A, einem weiteren hochspezifischen Hemmstoff der V-H<sup>+</sup>-ATPase (BOWMAN *et al.* 1988, DRÖSE & ALTENDORF 1997), wurde ebenfalls getestet. Auch in Gegenwart von 1  $\mu\text{M}$  Bafilomycin A konnte die DA-induzierte luminale Ansäuerung unterdrückt werden (gepaarter *t*-Test,  $P < 0,01$ ), während die DA-induzierte luminale Alkalisierung unbeeinflusst war (Abb. 3.0B). Diese Ergebnisse zeigten eindeutig, dass eine DA-induzierte Aktivierung der V-H<sup>+</sup>-ATPase zu einer luminalen Ansäuerung führt.

### 3.6.4 Cl<sup>-</sup>-Abhängigkeit der DA-induzierten pH<sub>s</sub>-Änderungen

Weiterhin wurde der Einfluss Cl<sup>-</sup>-abhängiger Transportprozesse auf die DA-induzierten luminalen pH<sub>s</sub>-Änderungen untersucht. Der Effekt von Cl<sup>-</sup>-freier Tris-Ringerlösung auf den pH<sub>s</sub> war variabel. Bei 5 Präparationen war kein Effekt zu sehen, während bei 4 anderen Präparationen eine pH<sub>s</sub>-Abnahme zu beobachten war. In Cl<sup>-</sup>-freier Ringerlösung waren die DA-induzierten pH<sub>s</sub>-Änderungen vollständig blockiert (Abb. 3.0A). Erst nach Zugabe von Cl<sup>-</sup>-haltiger Tris-Ringerlösung konnten wieder DA-induzierte biphasische pH<sub>s</sub>-Änderungen beobachtet werden. Die Hemmung des NKCC mit 10  $\mu\text{M}$  Bumetanid hatte keinen Einfluss auf den DA-induzierten Effekt (Abb. 3.0B). Der NKCC als wichtiger Cl<sup>-</sup>-abhängiger Transporter bei der Speichelbildung und -modifikation spielte demnach keine Rolle bei den DA-induzierten pH<sub>s</sub>-Änderungen.

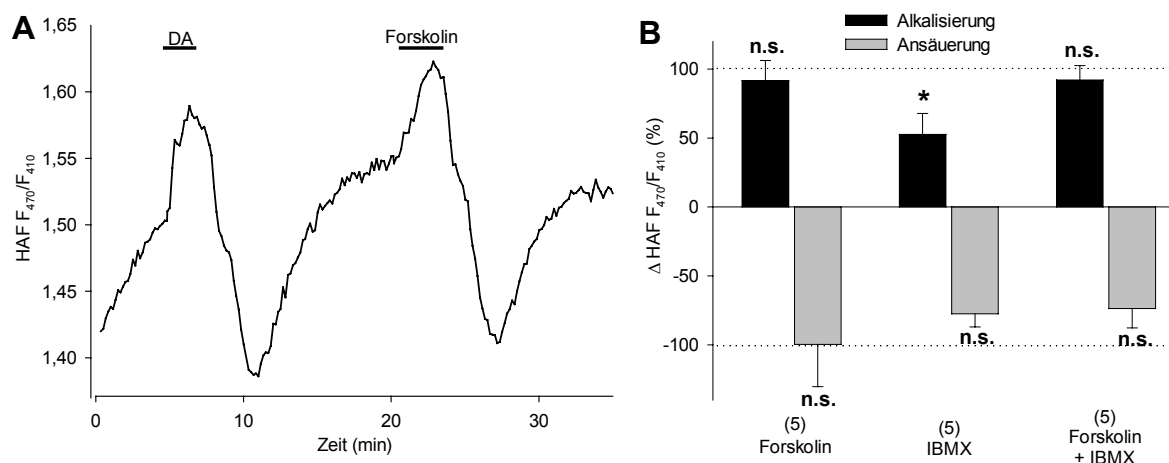
Andere Cl<sup>-</sup>-abhängige Transportprozesse sind zumeist auch HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-abhängig. Der Vergleich der DA-induzierten pH<sub>s</sub>-Änderungen bei Verwendung von Tris-Ringerlösung oder HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Ringerlösung ergab aber keine Unterschiede. Die Anwesenheit von HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> im mM-Bereich in der Ringerlösung war für die DA-induzierten luminalen pH-Änderungen nicht nötig. Eine weitere Quelle für HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> sowie H<sup>+</sup> ist die Aktivität der Carboanhydrase. JUST & WALZ (1994a) konnten die Carboanhydrase im apikalen Bereich der Ausführungszellen lokalisieren. Die Badapplikation von 500  $\mu\text{M}$  Methazolamid, einem spezifischen Hemmstoff der Carboanhydrase (MAREN 1967), beeinflusste aber weder pH<sub>s</sub> noch die DA-induzierten pH<sub>s</sub>-Änderungen ( $n = 5$ ).



**Abb. 3.0**  $\text{Cl}^-$ -Abhängigkeit der DA-induzierten  $\text{pH}_s$ -Änderungen ( $1 \mu\text{M}$  DA) an der Oberfläche des Lumens ( $\text{pH}_s$ ) isolierter Ausführgänge der Speicheldrüse. **(A)** Hemmung der DA-induzierten  $\text{pH}_s$ -Änderungen in Gegenwart von  $\text{Cl}^-$ -freier Ringerlösung,  $n = 9$ . **(B)** Keine Unterdrückung der DA-induzierten  $\text{pH}_s$ -Änderungen bei Badapplikation von  $10 \mu\text{M}$  Bumetanid,  $n = 5$ .

### 3.6.5 Beteiligung des intrazellulären Botenstoffs cAMP

Zur Untersuchung der Frage, ob der cAMP-Signalweg an den DA-induzierten  $\text{pH}_s$ -Änderungen beteiligt ist, wurden Substanzen eingesetzt, die potentiell zu einer Erhöhung der  $[\text{cAMP}]_i$  führen. Die Badapplikation von  $100 \mu\text{M}$  des Adenylatzyklase-Aktivators Forskolin imitierte die DA-induzierten biphasischen  $\text{pH}_s$ -Änderungen vollständig (Abb. 3.0A,B). Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der Kinetik und Stärke der Forskolin-induzierten Alkalisierung



**Abb. 3.0** Imitierung der DA-induzierten  $\text{pH}$ -Änderungen ( $1 \mu\text{M}$  DA) an der Oberfläche des Lumens isolierter Ausführgänge der Speicheldrüse ( $\text{pH}_s$ ) durch die Erhöhung der  $[\text{cAMP}]_i$ . **(A)** Originalregistrierung des Effekts von  $100 \mu\text{M}$  Forskolin auf  $\text{pH}_s$ . **(B)** Zusammenfassung der Effekte von  $100 \mu\text{M}$  Forskolin,  $100 \mu\text{M}$  IBMX und der Kombination beider Stoffe. Die Werte sind auf eine jeweils zuvor erfolgte Kontrollstimulierung mit  $1 \mu\text{M}$  DA (= 100 %, gestrichelte Linien) normalisiert. Gepaarter  $t$ -Test, Kontrolle vs. Behandlung, \*  $P < 0,05$ , Mittelwerte + SE, ( $n$ ).

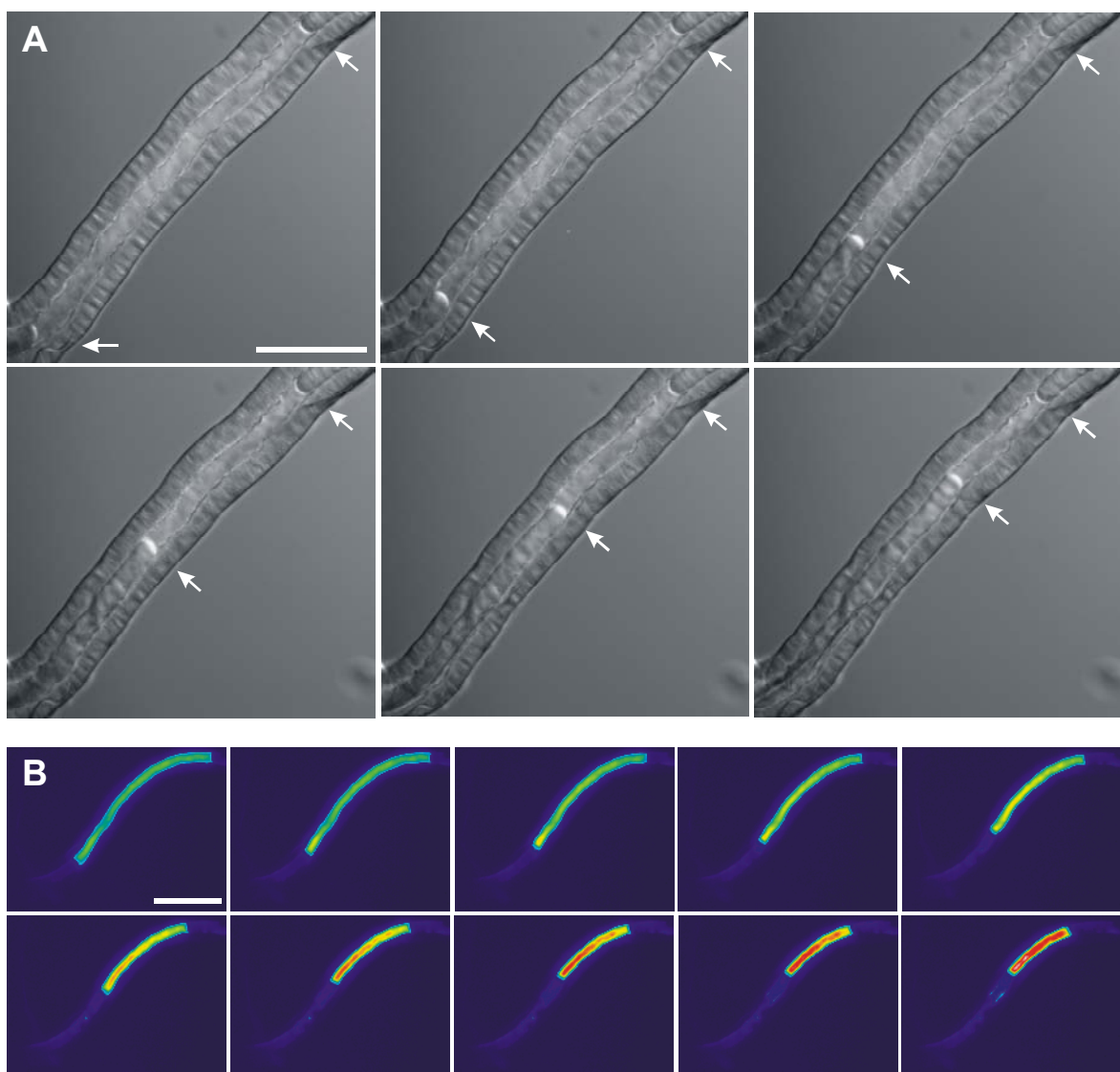
bzw. Ansäuerung gegenüber einer zuvor erfolgten DA-Kontrollstimulierung festgestellt werden ( $n = 5$ , gepaarter  $t$ -Test,  $P > 0,05$ ). Auch die Badapplikation des Phosphodiesterase-Hemmstoffs IBMX ( $100 \mu\text{M}$ ) führte zu einer biphasischen  $\text{pH}_s$ -Änderung, wobei die Alkalisierung aber signifikant geringer ausfiel als die einer DA-Kontrollstimulierung ( $n = 5$ , gepaarter  $t$ -Test,  $P < 0,05$ ). Die Kombination von Forskolin und IBMX hingegen resultierte in biphasischen  $\text{pH}_s$ -Änderungen, die sich von denen der DA-Kontrollstimulierung nicht unterschieden ( $n = 5$ , gepaarter  $t$ -Test,  $P > 0,05$ ). Diese Ergebnisse zeigten, dass cAMP als intrazellulärer Botenstoff zwischen DA-Stimulus und den luminalen  $\text{pH}$ -Änderungen vermitteln könnte.

### 3.7 Transepithelialer Wassertransport in isolierten Ausführgängen

#### 3.7.1 Wasserresorption in unstimulierten Ausführgängen

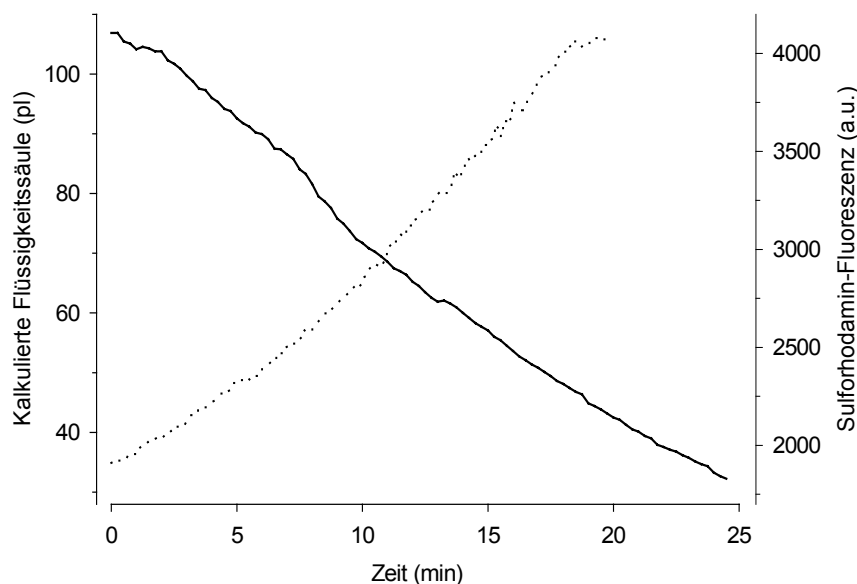
Transepitheliale Wasserbewegungen in den Ausführgängen der Speicheldrüse beeinflussen entscheidend das Volumen und die Osmolarität des Endspeichels. Die Frage, ob und in welchem Umfang Wasser in den Ausführgängen resorbiert bzw. sezerniert wird, konnte aber bisher nicht geklärt werden. Zur Klärung dieser Frage wurde eine einfache Methode zum Nachweis transepithelialer Wasserbewegungen entwickelt. Hierbei wurden zwei Paraffinöltropfen in einigem Abstand zueinander in das Lumen eines isolierten Ausführgangs injiziert. Mittels der DIK-Mikroskopie konnte von den injizierten Öltropfen eine Bildserie über einen Zeitraum von 20-30 min aufgenommen werden. Dabei zeigte sich, dass sich die Öltropfen ohne Zugabe eines Stimulus in  $\text{HCO}_3^-$ -Ringerlösung kontinuierlich aufeinander zu bewegten. Bei manchen Präparationen kam es auch vor, dass sich nur einer der beiden Öltropfen in Richtung des anderen bewegte (Abb. 3.0A). Zur quantitativen Auswertung wurde das Volumen der Wassersäule zwischen beiden Öltropfen berechnet. Dabei wurde davon ausgegangen, dass die Wassersäule zylindrisch ist. Zunächst wurde an 4-6 Stellen im gleichmäßigen Abstand innerhalb der Wassersäule der Durchmesser des Lumens gemessen und daraus der mittlere Durchmesser berechnet. Dies erfolgte zu verschiedenen Zeitpunkten. Es ergab sich, dass die Änderungen des Lumendurchmessers während des Experiments gegenüber den Änderungen des Abstands der beiden Öltropfen

zueinander vernachlässigbar gering waren. Es konnte deshalb zur Vereinfachung der mittlere Durchmesser zu Beginn des Experiments zur Berechnung des Volumens herangezogen werden. Des Weiteren konnte die genaue Fläche des abgebildeten Lumens zwischen beiden Öltropfen zu jedem Zeitpunkt ausgemessen werden. Die Verkleinerung dieser Fläche kennzeichnete bei nahezu gleich bleibendem Lumendurchmesser die Bewegung der Öltropfen aufeinander zu. Das aus Durchmesser und Fläche berechnete Volumen der Wassersäule nahm über der Zeit in unstimulierten Ausführgängen mit konstanter Rate ab (Abb. 3.0). Die Abnahme des Volumens der Wassersäule kennzeichnete eine



**Abb. 3.0** Visualisierung der Wasserresorption aus dem Lumen isolierter, unstimulierter Ausführgänge der Speicheldrüse mit Hilfe der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie. **(A)** Serie von DIK-Bildern, die Bewegungen zweier injizierter Paraffinöltropfen (Pfeile) im Lumen darstellen. Intervall = 5 min, Balken = 100  $\mu\text{m}$ . **(B)** Serie von Falschfarbenbildern der Fluoreszenzintensität des zwischen zwei Paraffinöltropfen injizierten Farbstoffs Sulforhodamin (Intensität: grün = niedrig, rot = hoch). Zeitintervall = 2 min, Balken = 100  $\mu\text{m}$ .

Wasserresorption aus dem Lumen der isolierten Ausführgänge. Die Rate der Wasserresorption betrug  $1,26 \pm 0,24 \text{ pl min}^{-1}$  ( $n = 13$ ). Diese Resorption stoppte unter Kontrollbedingungen (unstimuliert) nicht und konnte bis zum Aufeinandertreffen der beiden Öltropfen beobachtet werden.



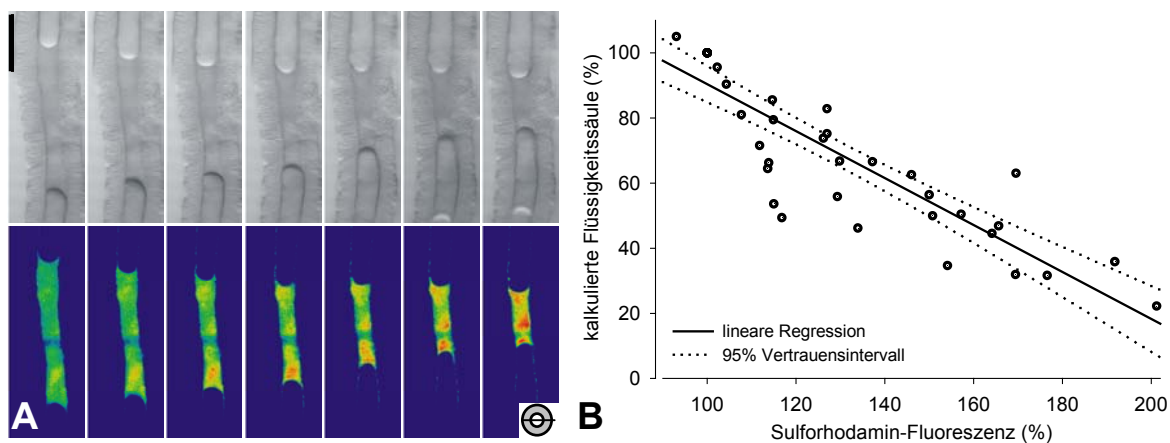
**Abb. 3.0** Messung der Wasserresorption aus dem Lumen isolierter, unstimulierter Ausführgänge der Speicheldrüse. **Durchgezogene Linie:** Die Abnahme des Volumens zwischen zwei ins Lumen injizierten Paraffinöltropfen wurde aus einer Bildserie von DIK-Aufnahmen berechnet. Gemessen wurden der Lumendurchmesser sowie die von den Öltropfen eingeschlossene Lumenfläche. Das Volumen wurde unter der Annahme zylindrischer Geometrie bestimmt,  $n = 13$ . **Gestrichelte Linie:** Anstieg der Fluoreszenzintensität von Sulforhodamin bei der Anregungswellenlänge 560 nm. Der Farbstoff war zwischen beide Öltropfen injiziert.  $n = 6$ .

Zusätzlich wurde der Fluoreszenzfarbstoff Sulforhodamin als Volumenmarker verwendet. Da DA-induzierte pH-Änderungen im Lumen isolierter Ausführgänge beobachtet wurden (siehe Kap. 3.6.2), wurde zunächst die pH-Empfindlichkeit des Sulforhodamins getestet. Dazu wurden  $100 \mu\text{M}$  Sulforhodamin in Tris-Ringerlösung mit unterschiedlichen pH-Werten (pH 5 - pH 9) gelöst. Von diesen Lösungen wurden Absorptionsspektren im Bereich von 450 - 700 nm sowie Emissionsspektren im Bereich von 590 - 700 nm aufgenommen (Universal-Mikrospektralphotometer UMSP80, Zeiss, Jena). Für den hier untersuchten pH-Bereich konnten keine Unterschiede in den Absorptions- und Emissionsspektren beobachtet werden. Sulforhodamin war unter diesen Bedingungen pH-unempfindlich.

Nach der Injektion des Sulforhodamin in das Lumen zwischen beide Öltropfen konnte mittels der Verwendung der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie die Fluoreszenzintensität des Farbstoffs bei der Anregungswellenlänge von 560 nm

registriert werden. Es zeigte sich, dass die Fluoreszenzintensität in unstimulierten, isolierten Ausführgängen in  $\text{HCO}_3^-$ -Ringerlösung kontinuierlich anstieg. Gleichzeitig verkleinerte sich die fluoreszierende Fläche (Abb. 3.0B & Abb. 3.0).

Mit Hilfe der konfokalen Laser-Rastermikroskopie konnten DIK-Bildserien und Fluoreszenzbildserien simultan aufgenommen werden. Aus den registrierten Daten konnte eine signifikante Korrelation zwischen der Abnahme des Volumens und dem Anstieg der Fluoreszenzintensität ermittelt werden ( $r^2 = 0,7685$ ,  $P < 0,0001$ , Abb. 3.0). Die Analyse optischer Schnitte durch die Präparate zeigte zudem, dass Sulforhodamin weder entlang der Öltropfen noch transepithelial aus der Flüssigkeitssäule entwich. Lediglich durch die Vorwärtsbewegung der Öltropfen war manchmal ein vernachlässigbar geringer Teil des Farbstoffes zwischen Intima und Öltropfen eingeschlossen, der daraufhin die Umrisse der Öltropfen erkennen ließ (Abb. 3.0B & Abb. 3.0A). Die Berechnung des Volumens zwischen zwei injizierten Öltropfen oder die Messung der Fluoreszenz eines Volumenmarkers sind demnach geeignete Methoden zur Untersuchung von transepitheliale Wassertransport in isolierten Ausführgängen der Speicheldrüse.

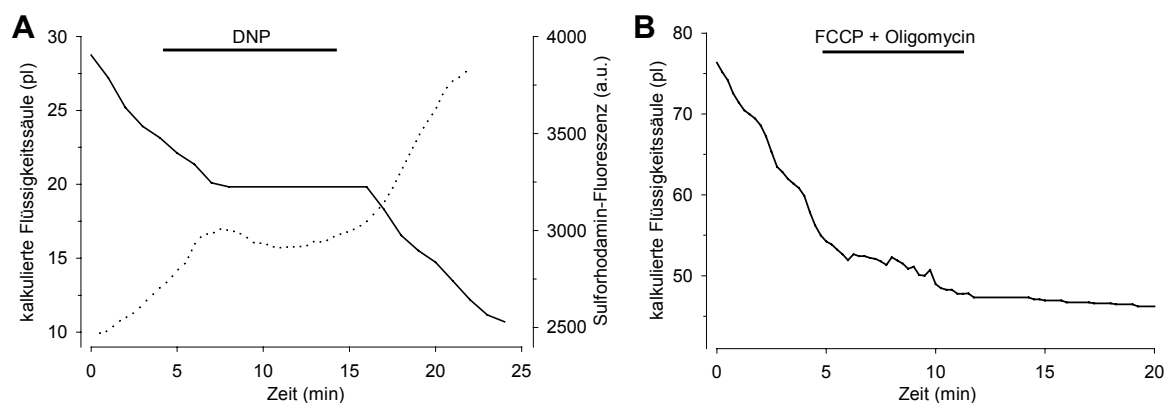


**Abb. 3.0** Korrelation zwischen der berechneten Flüssigkeitssäule zwischen den beiden Öltropfen im Lumen isolierter, unstimulierter Ausführgänge und der dazugehörigen Fluoreszenzintensität des Volumenmarkers Sulforhodamin. **(A)** Serie von konfokalen DIK-Bildern und den dazugehörigen Falschfarbenbildern der Sulforhodamin-Fluoreszenz (Intensität: grün = niedrig, rot = hoch). Optische Schnittebene unten rechts. Intervall = 4 min, Balken = 50  $\mu\text{m}$ . **(B)** Korrelationsanalyse aus 7 unabhängigen Messungen. Alle Werte wurden auf den Zeitpunkt 0 min (= 100 %) normiert. Spearman's  $r^2 = 0,7685$ ,  $P < 0,0001$ .



### 3.7.2 ATP-Abhängigkeit der Wasserresorption

Wassertransport erfolgt grundsätzlich passiv entlang eines osmotischen Gradienten. Der Aufbau eines solchen Gradienten benötigt Energie. Deshalb wurde die ATP-Abhängigkeit der Wasserresorption in isolierten Ausführgängen untersucht. Zunächst wurde der Protonophor 2,4-Dinitrophenol (DNP), ein Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien, im Bad appliziert. Mit Hilfe der Aufnahme von DIK-Bildserien und der Berechnung des Volumens zwischen beiden Öltropfen konnte in Anwesenheit von 1 mM DNP bei 10 von 15 Präparationen eine reversible Hemmung der Volumenabnahme beobachtet werden (Abb. 3.0A). Bei 5 der 15 Präparationen beeinflusste DNP die kontinuierliche Volumenabnahme nicht. Alternativ konnte durch die Messung der Fluoreszenzintensität des Volumenmarkers Sulforhodamin bei 5 von 5 Präparationen ebenfalls eine reversible Hemmung des Intensitätsanstiegs registriert werden (Abb. 3.0A).



**Abb. 3.0** ATP-Abhängigkeit der Wasserresorption aus dem Lumen isolierter, unstimulierter Ausführgänge der Speicheldrüse. **(A)** Reversible Hemmung der Wasserresorption bei Badapplikation von 1 mM DNP. Darstellung der Volumenänderung zwischen zwei Öltropfen (durchgezogene Linie,  $n = 10$ ) und der Fluoreszenzänderung von Sulforhodamin (gestrichelte Linie,  $n = 5$ ). **(B)** Irreversible Hemmung der Volumenabnahme zwischen zwei Öltropfen bei Badapplikation von 1  $\mu$ M FCCP und 2,5  $\mu$ g/ml Oligomycin,  $n = 7$ .

Die mitochondriale ATP-Synthese konnte zudem durch die kombinierte Badapplikation von 1  $\mu$ M FCCP (Carbonylcyanid-4-(trifluoromethoxy)-phenylhydrazon) und 2,5  $\mu$ g/ml Oligomycin blockiert werden. Auch durch die Badapplikation dieser beiden Stoffe wurde bei 7 von 12 Präparationen die Volumenabnahme zwischen zwei Öltropfen im Ausführgang blockiert (Abb. 3.0B). Dieser Effekt war aber irreversibel, denn es konnte nach dem Auswaschen der

beiden Substanzen keine weitere Volumenabnahme beobachtet werden. Bei 5 der 12 Präparationen konnte kein Effekt von FCCP und Oligomycin auf die Wasserresorption beobachtet werden.

### 3.7.3 Mechanismen der Wasserresorption

Mit Hilfe von pharmakologischen Experimenten sollte untersucht werden, welche Transporter für die Wasserresorption verantwortlich sind. Die Analyse der Wasserresorption erfolgte durch Berechnung des Volumens oder durch Messung der Fluoreszenz des Volumenmarkers Sulforhodamin zwischen zwei injizierten Öltröpfen im Lumen isolierter Ausführgänge. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tab. 3.0 zusammengefasst. Die ATP-Abhängigkeit der Wasserresorption in isolierten Ausführgängen ließ eine Beteiligung von Ionentransport-ATPasen vermuten. In den Epithelzellen der Ausführgänge sind in der basolateralen Membran eine  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  und in der apikalen Membran eine  $\text{V-H}^+\text{-ATPase}$  immunzytochemisch nachgewiesen worden (JUST & WALZ 1994b). Ihre Beteiligung an der Wasserresorption wurde untersucht. Die Hemmung der  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  mit Ouabain beeinflusste die Resorption nicht.

Für die pharmakologische Hemmung der  $\text{V-H}^+\text{-ATPase}$  wurden die beiden hochspezifischen Hemmstoffe Bafilomycin A und Concanamycin A verwendet. Aufgrund der Lokalisation der  $\text{V-H}^+\text{-ATPase}$  in der apikalen Membran der Epithelzellen wurden beide Hemmstoffe bei badseitiger und lumenseitiger Applikation getestet. Bei letzterer wurde zunächst für ca. 5 min die Wasserresorption ohne Hemmstoff registriert. Danach wurde die Messung kurz (ca. 5 min) unterbrochen, um mit einer Glaskapillare den Hemmstoff mit wenigen Druckluftpulsen zwischen beide Öltröpfen zu injizieren. Dadurch wurde das Volumen zwischen beiden Öltröpfen wieder vergrößert. Die Konzentration der Hemmstoffe im Lumen war natürlich deutlich niedriger als in der Glaskapillare. Durch die Wasserresorption und unter der Annahme, dass die Hemmstoffe nicht aktiv transportiert werden, sollte sich die Konzentration aber schrittweise wieder erhöhen. Die Badapplikation beeinflusste bei beiden Hemmstoffen die Wasserresorption nicht. Auch bei lumenseitiger Applikation konnte bei der Mehrzahl der Präparationen kein Effekt auf die Wasserresorption beobachtet

**Tab. 3.0** Übersicht über pharmakologische Experimente zur Untersuchung der Beteiligung von Transportprozessen an der Wasserresorption in isolierten, unstimulierten Ausführungsgängen der Speicheldrüse. Die Analyse der Wasserresorption erfolgte durch Berechnung des Volumens oder durch Messung der Fluoreszenz von Sulforhodamin zwischen zwei Öltropfen im Ausführungslumen. Applikationsdauer: badseitig 7-12 min, luminal 15-35 min.

Zielprotein	Hemmstoff	Applika- tion <sup>1)</sup>	Effekt auf Wasserresorption (n)	n
Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -ATPase	100 µM Ouabain	b	kein Effekt	6
	1 mM Ouabain	b	kein Effekt	5
V-H <sup>+</sup> -ATPase	10 µM Bafilomycin A	b	kein Effekt	6
	1 µM Bafilomycin A	l	kein Effekt (7), irreversible Hemmung (2)	9
	10 µM Concanamycin A	b	kein Effekt	4
	10 µM Concanamycin A	l	kein Effekt (5), irreversible Hemmung (2)	7
Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -ATPase + V-H <sup>+</sup> -ATPase	200 µM Ouabain + 1 µM Concanamycin A	b	kein Effekt	4
NKCC	10 µM Bumetanid	b	kein Effekt (6), ir- / reversible Hemmung (1/1)	8
K <sup>+</sup> -Kanäle	K <sup>+</sup> -freier Ringer + 6 mM BaCl <sub>2</sub>	b	irreversible Hemmung	5
Ca <sup>2+</sup> -abhängige Transportprozesse	100 µM LaCl <sub>3</sub>	b	kein Effekt (3), irreversible Hemmung (1)	4
Na <sup>+</sup> -Kanäle, NHE, NCE	1 mM Amilorid	b	irreversible Hemmung	4
NHE	100 µM EIPA	b	kein Effekt (7), ir- / reversible Hemmung (2/1)	10

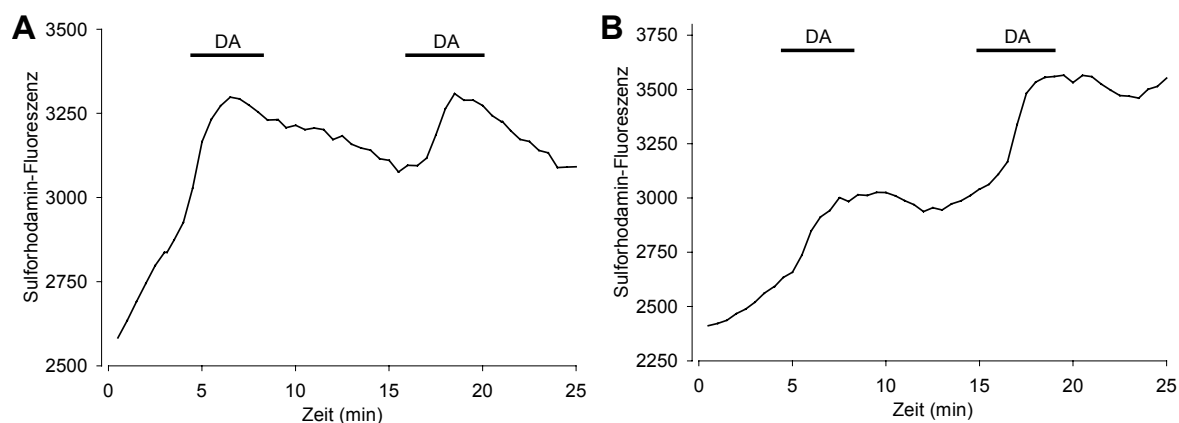
<sup>1)</sup> b: badseitig appliziert, l: luminal zwischen beide Öltropfen injiziert

werden. Lediglich 4 von 16 Präparationen zeigten nach der Injektion eine irreversible Hemmung der Resorption. Auch die kombinierte Hemmung von Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase und V-H<sup>+</sup>-ATPase mit Ouabain und Concanamycin A erbrachte keine Auswirkung auf die Wasserresorption.

Die Ergebnisse zur Untersuchung der Beteiligung weiterer für die Ausführungszellen postulierter Transportprozesse zeigten keine Effekte auf die Wasserresorption. Lediglich die Badapplikation von BaCl<sub>2</sub> in K<sup>+</sup>-freier Ringerlösung oder von Amilorid zeigten eine eindeutige irreversible Hemmung der Wasserresorption (Tab. 3.0).

### 3.7.4 DA-induzierte Veränderungen der Wasserresorption

Die bisherigen Ergebnisse ermöglichen leider noch keine Erklärung der Mechanismen der Wasserresorption in isolierten Ausführgängen. Deshalb sollte die Untersuchung des Einflusses einer DA-Stimulierung auf die Wasserresorption weitere Informationen liefern. DA beeinflusste die Wasserresorption in Tris-Ringerlösung, aber die Effekte waren sehr variabel ( $n = 18$ ). Die Badapplikation von  $1 \mu\text{M}$  DA führte zu einem mehr oder weniger stark ausgeprägten transienten Anstieg der Sulforhodamin-Fluoreszenz, der danach zu einem irreversiblen Stopp der Fluoreszenzänderung oder sogar einer Abnahme der Fluoreszenz führte (Abb. 3.0A). Bei Verwendung von  $\text{HCO}_3^-$ -Ringerlösung konnte der Effekt des DA etwas deutlicher beobachtet werden (Abb. 3.0B). Dennoch waren die Änderungen sehr variabel ( $n = 12$ ).



**Abb. 3.0** Effekte der Badapplikation von  $1 \mu\text{M}$  DA auf die Wasserresorption in isolierten Ausführgängen der Speicheldrüse in (A) Tris-Ringerlösung ( $n = 18$ ) und (B)  $\text{HCO}_3^-$ -Ringerlösung ( $n = 12$ ).

### 3.8 $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase- und $\text{V-H}^+$ -ATPase-Aktivität in den Speicheldrüsen

Die Untersuchung der DA-induzierten Veränderungen der Aktivität der  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase und der  $\text{V-H}^+$ -ATPase erfolgte zusätzlich mit einer biochemischen Methode. Hierzu wurden erste Pilotexperimente durchgeführt, die eine Grundlage für weiterführende Versuche darstellen. Es wurden die Aktivitäten beider ATPasen in Abwesenheit bzw. Anwesenheit ihrer spezifischen Hemmstoffe in homogenisierten Speicheldrüsen bestimmt. Die Bestimmung der Gesamt-ATPase-Aktivität erfolgte in Abwesenheit aller Hemmstoffe. Die Ouabain-empfindliche

ATPase-Aktivität entsprach der Differenz aus Gesamt-ATPase-Aktivität und ATPase-Aktivität in Gegenwart von Ouabain und kennzeichnete die Aktivität der Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase. Die Bafilomycin A-empfindliche ATPase-Aktivität errechnete sich nach dem gleichen Schema und repräsentierte die Aktivität der V-H<sup>+</sup>-ATPase.

**Tab. 3.0** Übersicht über die Versuche zur Messung der ATPase-Aktivitäten in Homogenaten isolierter Speicheldrüsen. Behandlung mit Ringerlösung (Kontrolle) oder mit Testsubstanz. Die Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase-Aktivität wurde als 1 mM Ouabain-empfindliche ATPase-Aktivität gemessen. Die V-H<sup>+</sup>-ATPase-Aktivität wurde als 1 µM Bafilomycin A-empfindliche ATPase-Aktivität gemessen. Gepaarter *t*-Test, Kontrolle vs. Behandlung, \* P < 0,05, \*\* P < 0,01, \*\*\* P < 0,001, Mittelwerte + SE.

Behandlung	n	Gesamt-ATPase-Aktivität	Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -ATPase-Aktivität	V-H <sup>+</sup> -ATPase-Aktivität
		nM P <sub>i</sub> / Drüse / h		
<i>DA</i>				
Kontrolle	8	275,7 ± 6,6	237,4 ± 5,6	26,9 ± 4,5
1 µM DA		277,4 ± 11,3	242,0 ± 10,5	24,4 ± 7,9
<i>5-HT</i>				
Kontrolle	10	277,8 ± 19,8	239,9 ± 18,7	15,3 ± 5,7
1 µM 5-HT		277,3 ± 18,4	242,7 ± 17,1	26,7 ± 5,6
<i>DA-Rezeptor Antagonisten</i>				
Kontrolle	6	258,8 ± 18,8	205,5 ± 18,6	39,7 ± 7,9
100 µM cis(Z)-Flupentixol		165,7 ± 7,2 **	134,0 ± 12,0 *	37,0 ± 7,4
Kontrolle	6	236,7 ± 17,2	192,7 ± 16,3	28,1 ± 7,3
100 µM Chlorpromazin		218,5 ± 11,6	199,1 ± 10,7	27,7 ± 4,3
Kontrolle	6	206,5 ± 9,1	161,2 ± 6,5	32,3 ± 5,4
100 µM S(+)-Butaclamol		213,5 ± 10,5	190,4 ± 9,0 *	31,2 ± 9,1
<i>Niedrig-NaCl Medium</i>				
Kontrolle	6	220,0 ± 15,3	173,6 ± 10,9	27,7 ± 9,5
Niedrig-NaCl Medium		153,8 ± 15,1 **	100,1 ± 11,4 ***	25,5 ± 6,6
Niedrig-NaCl-Medium	6	190,3 ± 12,7	135,9 ± 11,2	41,8 ± 4,0
Niedrig-NaCl-Medium + 1 µM DA		192,6 ± 15,8	139,9 ± 16,9	43,4 ± 3,8

Der Vergleich der Gesamt-ATPase-Aktivitäten in isolierten Speicheldrüsen unter Kontrollbedingungen in den verschiedenen Versuchen zeigte, dass diese stark schwankten (von 206,5 ± 9,1 nM P<sub>i</sub> Drüse<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> bis 277,8 ± 19,8 nM P<sub>i</sub> Drüse<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, Tab. 3.0), weshalb zu jedem Versuch eigene, gepaarte Kontrollen gemessen wurden. Die Aktivität der Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase betrug unter Kontrollbedingungen etwa 78-86 % der Gesamt-ATPase-Aktivität und machte den Großteil der ATPase-Aktivität im unstimulierten Zustand aus. In Gegenwart von Bafilomycin A konnte die V-H<sup>+</sup>-ATPase-Aktivität mit einem halbmaximalen Effekt bei IC<sub>50</sub> ~ 2 nM gehemmt werden (Daten nicht gezeigt). In Gegenwart von 1 µM Bafilomycin A, einer sättigenden Konzentration, betrug die V-H<sup>+</sup>-ATPase-Aktivität unter Kontrollbedingungen etwa 6-16 % der Gesamt-ATPase-Aktivität und hatte nur einen kleinen Anteil an der ATPase-Aktivität. Zusammen waren ca. 92-96 % des

detektierten  $P_i$  das Ergebnis der Aktivität von  $Na^+K^+$ -ATPase und  $V-H^+$ -ATPase in unstimulierten, isolierten Speicheldrüsen.

Weder die Stimulierung mit  $1 \mu M$  DA noch die Stimulierung mit  $1 \mu M$  5-HT bewirkten eine Veränderung der Gesamt-ATPase-Aktivität in den Homogenaten isolierter Speicheldrüsen. Auch die Aktivitäten von  $Na^+K^+$ -ATPase und  $V-H^+$ -ATPase blieben unverändert (gepaarter  $t$ -Test,  $P > 0,05$ , Tab. 3.0).

Die sekretorische Aktivität der Speicheldrüse von *P. americana* wird durch dopaminerge und serotonerge Neurone kontrolliert, deren Axone ein dichtes Geflecht um die Speicheldrüse herum bilden (BAUMANN *et al.* 2004). Es kann deshalb vermutet werden, dass es bei der Homogenisation isolierter Speicheldrüsen zur mechanischen Freisetzung von DA und 5-HT kommt. Dies hätte dann zur Folge, dass es keine Unterschiede zwischen unbehandelten und mit DA oder 5-HT behandelten Ansätzen geben würde, wie es auch beobachtet wurde. Zur Unterdrückung der Wirkung von mechanisch freigesetztem DA wurden drei DA-Rezeptor Antagonisten verwendet (Tab. 3.0), die bereits als Hemmstoffe der DA-induzierten Speichelsekretion in isolierten Speicheldrüsen von *P. americana* beschrieben wurden (MARG *et al.* 2004). Bei Behandlung der isolierten Speicheldrüsen mit  $100 \mu M$  cis(Z)-Flupenthixol war eine signifikante Abnahme der Gesamt-ATPase-Aktivität um ca. 36 % zu beobachten, die vollständig auf eine Reduktion der Aktivität der  $Na^+K^+$ -ATPase zurückzuführen war (gepaarter  $t$ -Test,  $P < 0,05$  bzw.  $P < 0,01$ ). Die Verwendung von  $100 \mu M$  Chlorpromazin dagegen bewirkte keine Veränderungen der gemessenen ATPase-Aktivitäten. Bei Verwendung von  $100 \mu M$  S(+)-Butaclamol konnte keine Veränderung der Gesamt-ATPase-Aktivität beobachtet werden. Dennoch führte dies bei gleich bleibender  $V-H^+$ -ATPase-Aktivität zu einer unerwarteten Erhöhung der  $Na^+K^+$ -ATPase-Aktivität (gepaarter  $t$ -Test,  $P < 0,05$ ). Der Einfluss der drei verwendeten DA-Rezeptor Antagonisten auf die ATPase-Aktivitäten in homogenisierten Drüsen war unterschiedlich. Dies ist verwunderlich, da alle drei Antagonisten die DA-induzierte Speichelsekretion bei gleicher Konzentration ähnlich stark hemmten (MARG *et al.* 2004). Die mechanische Freisetzung von DA bei der Homogenisation spielte aber anscheinend keine entscheidende Rolle.

Zur Aktivierung der Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase in den Vesikeln des Homogenats wird dem Medium Na<sub>2</sub>ATP zugegeben. Dementsprechend kann nur die Aktivierung der Population von Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPasen erfolgen, deren ATP-Bindungsstellen dem Extrazellularraum zugewandt sind. In dieser Anordnung transportiert die Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase Na<sup>+</sup> in die Vesikel hinein, während K<sup>+</sup> aus den Vesikeln heraus transportiert wird. Die hohe NaCl-Konzentration von 140 mM in den Reaktionsansätzen könnte zu einer Sättigung der Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase-Aktivität führen, so dass keine DA-induzierte Erhöhung ihrer Aktivität beobachtet werden kann. Zur Untersuchung dieser Hypothese wurde das Na/K-Verhältnis in der Testlösung verändert (von 140 mM NaCl + 37,5 mM KCl zu 5 mM NaCl + 120 mM KCl + 52,5 mM Saccharose = Niedrig-NaCl-Medium). Bei Verwendung von Niedrig-NaCl-Medium konnte eine signifikante Abnahme der Gesamt-ATPase-Aktivität beobachtet werden, die tatsächlich mit einer Abnahme der Aktivität der Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase zusammenhing (gepaarter *t*-Test, *P* < 0,01 bzw. *P* < 0,001) (Tab. 3.0). Dies zeigte den Einfluss der Na<sup>+</sup>-Konzentration auf die Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase-Aktivität. Dennoch konnte bei reduzierter Aktivität der Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase in Niedrig-NaCl-Medium kein DA-induzierter Anstieg ihrer Aktivität festgestellt werden.

Die Aktivität der V-H<sup>+</sup>-ATPase ist in unstimulierten, isolierten Speicheldrüsen gegenüber der Aktivität der Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase gering. Die Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase ist dabei in den peripheren Zellen der Acini sowie in den Ausführungszellen vorhanden, während die V-H<sup>+</sup>-ATPase nur in den Ausführungszellen vorhanden ist. In Homogenaten aus isolierten Ausführungsgängen ohne Acini sollte sich demnach der

**Tab. 3.0** Messung der DA-induzierten ATPase-Aktivitäten in Homogenaten isolierter Ausführungsgänge der Speicheldrüsen. Inkubation mit Ringerlösung (Kontrolle) oder mit Testsubstanz. Die Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase-Aktivität wurde als 1 mM Ouabain-empfindliche ATPase-Aktivität gemessen. Die V-H<sup>+</sup>-ATPase-Aktivität wurde als 1 μM Bafilomycin A-empfindliche ATPase-Aktivität gemessen. Gepaarter *t*-Test, Kontrolle vs. Behandlung, alle Tests *P* > 0,05, Mittelwerte + SE.

Behandlung	<i>n</i>	Gesamt-ATPase-Aktivität	Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -ATPase-Aktivität	V-H <sup>+</sup> -ATPase-Aktivität
		nM P <sub>i</sub> / mg Protein / h		
<i>DA - Acini mit Ausführungsgängen</i> <sup>1)</sup>				
Kontrolle	8	1,39 ± 0,05	1,20 ± 0,04	0,14 ± 0,02
1 μM DA		1,48 ± 0,05	1,29 ± 0,05	0,14 ± 0,04
<i>DA - isolierte Ausführungsgänge</i>				
Kontrolle	5	1,44 ± 0,05	0,96 ± 0,06	0,02 ± 0,04
1 μM DA		1,36 ± 0,06	0,93 ± 0,05	0,10 ± 0,05

<sup>1)</sup> Daten aus Tab. 3.2

Anteil der V-H<sup>+</sup>-ATPase-Aktivität an der Gesamt-ATPase-Aktivität vergrößern und sich somit vielleicht DA-induzierte Änderungen nachweisen lassen. Tab. 3.0 zeigt, dass der Anteil der Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase-Aktivität an der Gesamt-ATPase-Aktivität bei isolierten Ausführungsgängen ohne Acini im Vergleich zu isolierten Speicheldrüsen mit Acini und Ausführungsgängen geringer ist (von 86,3 % auf 66,7 %). Erstaunlicherweise traf dies auch für die V-H<sup>+</sup>-ATPase-Aktivität zu (von 10,0 % auf 1,4 %). Auch konnten bei Verwendung von isolierten Ausführungsgängen keine DA-induzierten Änderungen der ATPase-Aktivitäten beobachtet werden.



## 4 Diskussion

Speicheldrüsen sind bei Insekten weit verbreitete sekretorisch aktive Organe. Speichel ist eine wässrige Elektrolytlösung und kann eine Vielzahl von Proteinen enthalten. Speichel unterstützt bei Insekten den Nahrungstransport, dient der Reinigung der Mundwerkzeuge und leitet die Verdauung ein (WALKER 2003). Untersuchungen zur Physiologie der Speicheldrüse der Schabe *P. americana* lassen in groben Zügen die Teilprozesse der Speichelsekretion erkennen (WALZ *et al.* 2006). Diese lässt sich generell in zwei Phasen einteilen. Sekretorisch aktive Endstücke der Speicheldrüse (so genannte Acini) sezernieren einen isoosmotischen, NaCl-reichen Primärspeichel. In einem zweiten Schritt bewirkt die Modifikation des Primärspeichels in den Ausführgängen durch Na<sup>+</sup>-Rückresorption und K<sup>+</sup>-Sekretion die Bildung eines hypoosmotischen Endspeichels. Die Aktivierung der Speichelsekretion erfolgt bei den innervierten Speicheldrüsen von *P. americana* durch die Neurotransmitter DA und 5-HT, die an G-Protein gekoppelte Rezeptoren der Plasmamembran binden. Die koordinierte Aktivierung verschiedener Transportproteine in der basolateralen und apikalen Membran bewirkt schließlich den vektoriellen Elektrolyt- und Wassertransport. Über die beteiligten Transportprozesse und die bei der Stimulus-Sekretionskopplung aktivierten intrazellulären Signalwege ist nur wenig bekannt. Deshalb sollten diese beiden Aspekte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden.

### 4.1 DA-induzierter [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>-Anstieg in den Ausführgängen

Es wird angenommen, dass der Ca<sup>2+</sup>-Signalweg in den Epithelzellen der Ausführgänge an der Regulation der Modifikation des Primärspeichels beteiligt ist, weil der Neurotransmitter DA in diesen Zellen konzentrationsabhängig einen

graduierten  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg verursacht (LANG & WALZ, 1999). Die an der  $[Ca^{2+}]_i$ -Regulation beteiligten Mechanismen sind noch nicht untersucht. Es ist jedoch bekannt, dass dieser  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg in  $Ca^{2+}$ -freier Ringerlösung unterbleibt sowie durch Badapplikation von  $La^{3+}$  gehemmt werden kann. Beide Ergebnisse deuten darauf hin, dass der  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg durch einen  $Ca^{2+}$ -Influx über die basolaterale Membran verursacht wird (LANG & WALZ, 1999). Außerdem zeigten Messungen mit  $Na^+$ -empfindlichen Mikroelektroden, dass die Stimulierung mit DA zu einem massiven  $[Na^+]_i$ -Anstieg in den Epithelzellen führt (LANG & WALZ 2001). Dieser  $[Na^+]_i$ -Anstieg konnte durch Badapplikation von Furosemid, einem spezifischen Hemmstoff des NKCC, unterdrückt werden. Die Ursachen des DA-induzierten  $Ca^{2+}$ -Signals konnten in dieser Arbeit vollständig aufgeklärt werden. Ausgangspunkt hierfür war die folgende Überlegung:

Ein  $La^{3+}$ -empfindlicher  $Ca^{2+}$ -Transporter, der durch  $[Na^+]_i$  beeinflusst wird, ist der NCE (BLAUSTEIN & LEDERER 1999). Der NCE kann einen  $Ca^{2+}$ -Efflux (*forward mode*) oder einen  $Ca^{2+}$ -Influx (*reverse mode*) vermitteln. In den meisten Zelltypen tauscht der NCE 3  $Na^+$ -Ionen gegen 1  $Ca^{2+}$ -Ion aus (HINATA & KIMURA 2004), so dass seine Transportrichtung vom Membranpotential sowie von den Konzentrationsgradienten von  $Na^+$  und  $Ca^{2+}$  über der Plasmamembran abhängt. Es war also durchaus denkbar, dass der DA-induzierte  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg das Ergebnis der Aktivität des NCE ist, der im  $Ca^{2+}$ -Influx Modus arbeitet. Voraussetzung dafür wäre ein  $[Na^+]_i$ -Anstieg. Mehrere Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen diese Hypothese. Die simultane Messung von  $[Na^+]_i$  und  $[Ca^{2+}]_i$  zeigte, dass der DA-induzierte  $[Na^+]_i$ -Anstieg früher erfolgte als der  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg (Abb. 3.4B). Der  $[Na^+]_i$ -Anstieg könnte also durchaus die Ursache des  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegs sein. Zudem war der DA-induzierte  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg vollständig von der Aktivität des NKCC abhängig (Abb. 3.3B). Dieser Symporter konnte mit dem NKCC-spezifischen Schleifendiuretikum Bumetanid gehemmt werden. Unter diesen Bedingungen unterblieb die DA-induzierte  $[Ca^{2+}]_i$ -Änderung vollständig. Die funktionelle Abhängigkeit des DA-induzierten  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegs von extrazellulärem  $Na^+$  ließ zudem den Schluss zu, dass der NKCC in der basolateralen Membran lokalisiert ist. Da die Richtung des  $Ca^{2+}$ -Transports durch den NCE vom  $Na^+$  Konzentrationsgradienten beeinflusst wird, ist aufgrund der starken DA-induzierten Verminderung des  $Na^+$  Konzentrationsgradienten über der basolateralen Membran ein  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg durch die Aktivität des NCE im  $Ca^{2+}$ -Influx-Modus sehr gut

möglich. Deshalb sollte der  $[Ca^{2+}]_i$ -Influx durch die experimentelle Erhöhung des auswärts gerichteten  $Na^+$  Konzentrationsgradienten während einer DA-Stimulierung weiter verstärkt werden. Diese Voraussage bestätigte sich. Das Entfernen von extrazellulärem  $Na^+$  während der Stimulierung mit DA verursachte einen zusätzlichen  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg (Abb. 3.4C). Die Abhängigkeit des DA-induzierten  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegs von  $[Na^+]_i$  konnte auch durch die Hemmung der  $Na^+$ - $K^+$ -ATPase bestätigt werden. Die  $Na^+$ - $K^+$ -ATPase senkt die  $[Na^+]_i$  nach einer DA-Stimulierung (LANG & WALZ 2001). Bei einer Hemmung der  $Na^+$ - $K^+$ -ATPase mit Ouabain blieb der verminderte  $Na^+$  Konzentrationsgradient über der basolateralen Membran länger erhalten und verhinderte erwartungsgemäß auch die Erholung vom DA-induzierten  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg (Abb. 3.5).

Dass der DA-induzierte  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg durch den NCE verursacht wird, lässt sich auch aus der Berechnung des Umkehrpotentials für den NCE ( $E_{Na/Ca}$ ) fordern. Ein NCE-vermittelter  $Ca^{2+}$ -Influx würde erfolgen, wenn  $E_{Na/Ca}$  negativer als  $E_m$  ist. Für den Ruhezustand konnte bei einem Membranpotential von  $E_m = -65$  mV ein Umkehrpotential von  $E_{Na/Ca} = -117$  mV berechnet werden. Dies würde einen NCE-vermittelten  $Ca^{2+}$ -Influx im unstimulierten Zustand zur Folge haben. Dieser konnte aber nicht beobachtet werden. An dieser Stelle muss beachtet werden, dass die durch LANG & WALZ (2001) mittels  $Na^+$ -empfindlicher Mikroelektroden ermittelte und für die Berechnung von  $E_{Na/Ca}$  verwendete  $[Na^+]_i$  sehr variabel war ( $22,0 \pm 19,3$  mM,  $n = 6$ ). Wahrscheinlich wurde die  $[Na^+]_i$  überschätzt, da Mikroelektroden am Einstichsort lokal ein  $Na^+$ -Leck verursachen. Nimmt man eine etwas geringere  $[Na^+]_i$  von ca. 10-15 mM an, würde sich  $E_{Na/Ca}$  dem Membranpotential annähern und somit kein  $Ca^{2+}$ -Transport durch den NCE erfolgen. Zudem zeigten sich keine  $[Ca^{2+}]_i$ -Änderungen nach dem Entfernen von extrazellulärem  $Na^+$ . Der dadurch nach außen gerichtete  $Na^+$  Konzentrationsgradient hätte einen NCE-vermittelten  $Ca^{2+}$ -Influx favorisiert. Anscheinend spielt der NCE bei der Regulation von  $[Ca^{2+}]_i$  in den Ausführgängen im Ruhezustand nur eine geringe Rolle. Auch in anderen Zelltypen wie z.B. Gliazellen ist der NCE bei der Regulation der Ruhe- $[Ca^{2+}]_i$  unwichtig, da das Entfernen von extrazellulärem  $Na^+$  die  $[Ca^{2+}]_i$  nur in geringem Maße beeinflusst (GOLDMAN *et al.* 1994, KIRISCHUK *et al.* 1997, NETT & DEITMER 1998).

Während der DA-Stimulierung ist die Transportrichtung des NCE eindeutig definiert. Durch den starken  $[\text{Na}^+]_i$ -Anstieg und die Depolarisation des Membranpotentials konnte ein Umkehrpotential von  $E_{\text{Na/Ca}} = -224 \text{ mV}$  berechnet werden. Unter diesen Bedingungen muss ein NCE-vermittelter  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx während der DA-Stimulierung erfolgen.

Ein Stimulus-induzierter  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg durch den  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx-Modus des NCE als Folge eines reduzierten  $\text{Na}^+$  Konzentrationsgradienten über der Plasmamembran wurde bereits in zahlreichen anderen Zelltypen beschrieben. In Gliazellen kann durch den NCE-vermittelten  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx nach einem Stimulus-induziertem  $[\text{Na}^+]_i$ -Anstieg der  $\text{Na}^+$  Konzentrationsgradient wieder hergestellt werden. Dadurch wird die  $\text{Na}^+$ -abhängige Aufnahme des Neurotransmitters Glutamat gewährleistet und die extrazelluläre Glutamatkonzentration niedrig gehalten. In Astrozyten des Cerebrums der Ratte z. B. bewirken stimulierende Aminosäuren wie Glutamat einen  $[\text{Na}^+]_i$ -Anstieg als Folge der Aktivität eines Aminosäure- $\text{Na}^+$ -Symporters, wodurch der  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx-Modus des NCE aktiviert wird (JENSEN & CHIU 1990, FLOYD *et al.* 2005). Auch in Bergmann-Gliazellen des Cerebellums der Maus führt die Aktivierung ionotroper Glutamatrezeptoren mit Kainat zum Überladen der Zellen mit  $\text{Na}^+$ , wodurch eine Glutamataufnahme wegen des verringerten  $\text{Na}^+$  Konzentrationsgradientens behindert würde (KIRISCHUK *et al.* 1997). LENART *et al.* (2004) konnten an Astrozyten des Cerebrums der Maus zeigen, dass der Entzug von Sauerstoff oder Glucose zu einem NKCC-vermittelten  $[\text{Na}^+]_i$ -Anstieg führte, der die  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Homöostase beeinflusste.  $\text{Ca}^{2+}$  wurde in intrazellulären Speichern akkumuliert, was teilweise auf eine Aktivität des NCE zurückzuführen war. In den Enterozyten des distalen Colons der Ratte hält der NCE-vermittelte  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx bei Acetylcholin-Stimulierung die  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  hoch, um eine anhaltende,  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige  $\text{Cl}^-$ -Sekretion zu gewährleisten. Die Initiierung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx erfolgt nach einem  $\text{Na}^+$ -Influx durch unspezifische Kationenkanäle (SEIP *et al.* 2001). Weiterhin reguliert der  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx im Duodenum der Maus bei Acetylcholin-Stimulierung durch den NCE die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige  $\text{HCO}_3^-$ -Sekretion (DONG *et al.* 2005). Des weiteren konnte gezeigt werden, dass das künstliche Aufheben des  $\text{Na}^+$  Konzentrationsgradienten über der Plasmamembran z. B. durch Hemmung der  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase den NCE in den  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx-Modus umkehren kann (GOLOVINA *et al.* 2003, ROJAS *et al.* 2004).

Die Funktion des DA-induzierten und NCE-vermittelten Anstiegs der  $[Ca^{2+}]_i$  in den Epithelzellen der Ausführungsgänge in der Speicheldrüse von *P. americana* bleibt unklar. Eine Beteiligung an der Regulation der Speichelmodifikation ist aber weiterhin sehr wahrscheinlich (siehe Kap. 4.3.4).

Die graduierten Änderungen der  $[Ca^{2+}]_i$  in den Ausführungszellen der Speicheldrüse von *P. americana* sind bemerkenswert. Die Zellen sind ein markantes Beispiel für einen Zelltyp, in dem unter physiologischen Bedingungen allein der  $Ca^{2+}$ -Influx aus dem Extrazellularraum Stimulus-induzierte, Amplitudenmodulierte  $Ca^{2+}$ -Signale produziert. Dieses Ergebnis der Arbeit geht, wie nachfolgend erläutert, weit über die Systemphysiologie von Insekten-Speicheldrüsen hinaus.

$Ca^{2+}$  ist ein universeller intrazellulärer Botenstoff und reguliert eine Vielzahl physiologischer Funktionen. Für die spezifische und koordinierte Aktivierung zellulärer Prozesse durch Stimulus-induzierte  $[Ca^{2+}]_i$ -Änderungen ist die exakte zeitliche und räumliche Kodierung des Signals eine Grundvoraussetzung (TOESCU & VERKHRATSKY 1998, BERRIDGE *et al.* 2000, BOOTMAN *et al.* 2001). In elektrisch nicht erregbaren Zellen erfolgt die  $Ca^{2+}$ -Mobilisierung überwiegend durch die Aktivierung der intrazellulären Inositol-1,4,5-trisphosphat ( $IP_3$ ) Signalkaskade. Dabei bewirken niedrige Agonist-Konzentrationen intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Oszillationen. Diese  $Ca^{2+}$ -Oszillationen sind das Ergebnis der zyklischen  $Ca^{2+}$ -Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) und der Wiederaufnahme von  $Ca^{2+}$  in das ER (BERRIDGE 1993, FEWTRELL 1993). Höhere Agonist-Konzentrationen verursachen dagegen biphasische  $[Ca^{2+}]_i$ -Änderungen mit einem anfänglichen transienten  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg, der in Gegenwart des Agonisten in ein anhaltendes Plateau übergeht. Der transiente  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg wird durch eine  $Ca^{2+}$ -Freisetzung aus dem ER verursacht, die Plateauphase durch einen  $Ca^{2+}$ -Influx aus dem Extrazellularraum durch so genannte *store-operated  $Ca^{2+}$  channels*, die infolge der Entleerung des ERs aktiviert werden (PAREKH & PENNER 1997, PUTNEY 2001). In den meisten untersuchten Zelltypen besteht eine Korrelation zwischen der Agonist-Konzentration und der Frequenz der  $Ca^{2+}$ -Oszillationen (RAPP & BERRIDGE 1981, BERRIDGE 1988, CRAWFORD *et al.* 1991). Diese Eigenschaft des  $IP_3$ -Signalwegs ist die Grundlage der Frequenz-Modulation der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Signale.

$\text{Ca}^{2+}$ -Signale können aber auch Amplituden-moduliert sein. Graduierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale beeinflussen dann  $\text{Ca}^{2+}$ -empfindliche Prozesse, die sich in ihrer  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität unterscheiden (BERRIDGE 1997, TOESCU & VERKHRATSKY 1998). Auch die  $\text{IP}_3$ -vermittelte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung kann Amplituden-modulierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale produzieren, obwohl sie aufgrund ihrer  $\text{Ca}^{2+}$ -Empfindlichkeit ( $\text{Ca}^{2+}$  hat eine positive und negativ rückkoppelnde Wirkung auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung) regenerativ ist (BAUMANN & WALZ 1989, IINO 1990, BEZPROZVANNY *et al.* 1991).  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungs-Ereignisse sind nämlich hierarchisch organisiert. Ein schwacher Stimulus erzeugt ein Elementarereignis ( $\text{Ca}^{2+}$ -*blip*) durch Öffnen eines einzelnen  $\text{IP}_3$ -Rezeptor  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals. Die nächste Stufe ist das koordinierte Öffnen eines Clusters von  $\text{IP}_3$ -Rezeptoren ( $\text{Ca}^{2+}$ -*puff*). Abhängig von der Stärke des Stimulus kann durch unterschiedlich starkes Rekrutieren von Elementarereignissen ein graduiertes  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal produziert werden (BERRIDGE 1997, BERRIDGE *et al.* 2000). Trotzdem basieren Amplituden-modulierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale oftmals auf einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx aus dem Extrazellularraum (PAREKH & PENNER 1997, PUTNEY 2001). Amplituden-modulierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale sind nur für wenige Zelltypen beschrieben. Dazu gehören  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale in B Lymphozyten der Maus (DOLMETSCH *et al.* 1997), menschlichen Mast- und Endothelzellen (MACGLASHAN 1989, OIKE *et al.* 1994) sowie Photorezeptoren der Biene *Apis mellifera* (WALZ *et al.* 1994).

Die Epithelzellen der Ausführungsgänge der Schabenspeicheldrüse produzieren ebenfalls Amplituden-modulierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale. Der NCE-vermittelte  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx ist dabei nur von der  $[\text{Na}^+]_i$  und dem Membranpotential abhängig und somit ein effizienter Mechanismus für die Erzeugung von Amplituden-modulierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalen. Da  $[\text{Na}^+]_i$  in den Ausführungsgängen von der Aktivität des NKCC abhängig ist, ist eine enge funktionelle Assoziation von NCE und NKCC günstig. Nimmt man an, dass beide Transporter räumlich eng benachbart sind, würden geringe lokale NKCC-vermittelte  $[\text{Na}^+]_i$ -Änderungen ausreichen, um lokale  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale zu generieren (weiterführende Diskussion zur Lokalisation des NKCC in Kap. 4.3.3). Eine solche funktionelle Kopplung von NKCC und NCE wurde bereits bei der durch Ischämie verursachten intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Akkumulation in Astrozyten des Cerebrums der Maus beschrieben (LENART *et al.* 2004).

## 4.2 pH<sub>i</sub>-Regulation in den Ausführgängen

Der intrazelluläre pH-Wert (pH<sub>i</sub>) ist für eine Vielzahl zellulärer Prozesse von fundamentaler Bedeutung. So benötigen z. B. der Zellstoffwechsel, die Leitfähigkeit von Ionenkanälen, die Fähigkeit zur Kontraktion oder die Kontrolle des Zellwachstums und der Zelldifferenzierung einen konstanten pH<sub>i</sub> (MADSHUS 1988). Zur intrazellulären Ansäuerung führen z. B. eine erhöhte Stoffwechselaktivität oder der passive Influx von Protonen aufgrund des negativen Ruhemembranpotentials. In Epithelzellen ist die pH<sub>i</sub>-Regulation zudem eng mit dem transepithelialen Transport von verschiedenster Substanzen verknüpft. So erfolgt z. B. im Darm die Resorption von Oligopeptiden oder kurzkettigen Fettsäuren aus dem Lumen als Symport mit H<sup>+</sup> (CHU & MONTROSE 1997, HAYASHI & SUZUKI 1998). Deshalb ist die genaue Regulation des pH<sub>i</sub> von besonderer Bedeutung.

Verschiedene Mechanismen sind beschrieben, die einer intrazellulären Ansäuerung bzw. Alkalisierung entgegenwirken (BORON 1986, BORON 2004). Geringfügige Schwankungen des pH<sub>i</sub> können durch die intrazelluläre Pufferkapazität kompensiert werden. Die intrazelluläre Pufferkapazität umfasst alle im Zytosol der Zelle vorhandenen Puffersysteme, wozu Proteine oder Organellen sowie das CO<sub>2</sub>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-System zählen. Allerdings sind diese Puffersysteme in ihrer Kapazität begrenzt und können nur geringe pH<sub>i</sub>-Abweichungen ausgleichen. Größere Schwankungen des pH<sub>i</sub> werden durch den aktiven Transport von Säure/Base-Äquivalenten über die Zellmembran ausgeglichen. Intrazellulär ansäuernd wirkende Transportmechanismen (*acid loaders*) bewirken den Efflux von Basenäquivalenten wie HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> oder OH<sup>-</sup>. Zu ihnen gehören der Cl<sup>-</sup>-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Antiporter (AE) und der elektrogene Na<sup>+</sup>-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Symporter (1:3 NBCe). Intrazellulär alkalisierend wirkende Transportmechanismen (*acid extruders*) bewirken den Efflux von Protonen oder den Influx von Basenäquivalenten wie HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Zu ihnen gehören der Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup>-Antiporter (NHE), der Na<sup>+</sup>-getriebene Cl<sup>-</sup>-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Antiporter (NDCBE), der elektrogene Na<sup>+</sup>-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Symporter (1:2 NBCe) sowie die V-H<sup>+</sup>-ATPase. Während die V-H<sup>+</sup>-ATPase einen primär aktiven Transport darstellt, werden die anderen Transporter sekundär durch die Aktivität der Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase energetisiert, die den Konzentrationsgradienten für Na<sup>+</sup> über der basolateralen Membran aufrecht hält.

Die bei der  $\text{pH}_i$ -Regulation in den Ausführungszellen der Speicheldrüse beteiligten Prozesse wurden in dieser Arbeit untersucht. Hierzu wurde die ionale Zusammensetzung der Ringerlösung variiert und auch die Geschwindigkeit analysiert, in welcher sich die Zelle von einer intrazellulären Ansäuerung erholt. Es konnte belegt werden, dass sich in der basolateralen Membran der Ausführungszellen ein AE befindet, der als *acid loader* an der  $\text{pH}_i$ -Regulation beteiligt ist. In  $\text{Cl}^-$ -freier Tris-Ringerlösung konnte eine intrazelluläre Alkalisierung in den Ausführungszellen beobachtet werden (Abb. 3.12A & Abb. 3.21A). Die Ursache liegt darin, dass der AE in  $\text{Cl}^-$ -freier Ringerlösung aufgrund des auswärts gerichteten Konzentrationsgradienten für  $\text{Cl}^-$  als *acid extruder* fungiert (CALONGE & ILUNDÁIN 1998, NGUYEN *et al.* 2004). Ein weiterer Hinweis für die Anwesenheit eines AE ist die Tatsache, dass eine DA-induzierte intrazelluläre Ansäuerung in isolierten Ausführungsgängen durch  $500 \mu\text{M}$  DIDS blockiert werden konnte (Abb. 3.21B). So ist z. B. der AE im Mitteldarm von Moskitolarven von *Aedes aegypti* durch  $\text{DIDS} \geq 100 \mu\text{M}$  blockierbar (BOUDKO *et al.* 2001). DIDS gilt als gängiger Hemmstoff für Anionentransporter wie dem AE (CABANTCHIK & GREGER 1992), obgleich es auch den NDCBE und den NBC hemmt (BORON 2001). Die Anwesenheit eines NBC in der basolateralen Membran der Ausführungszellen ist aber unwahrscheinlich, da die DIDS-sensitive, DA-induzierte Ansäuerung in den isolierten Ausführungsgängen  $\text{Cl}^-$ -abhängig war (Abb. 3.21A). Zudem zeigte sich beim Wechsel von Tris-gepufferter Ringerlösung zu  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -gepufferter Ringerlösung eine intrazelluläre Ansäuerung, die konstant blieb. In Systemen mit NBC konnte dagegen beim Wechsel zu  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -gepufferter Ringerlösung nur eine transiente intrazelluläre Ansäuerung mit sich anschließender Alkalisierung beobachtet werden. Ursache dafür war die Diffusion von  $\text{CO}_2$  in die Zelle und der sich anschließende massive  $\text{HCO}_3^-$ -Influx über den NBC (DEITMER 1992, ISHIGURO *et al.* 2000). Die Anwesenheit eines  $\text{Na}^+$ -abhängigen AE (NDCBE) in der basolateralen Membran der Ausführungszellen ist ebenso unwahrscheinlich. Die DIDS-sensitive, DA-induzierte Ansäuerung in den isolierten Ausführungsgängen war nämlich unabhängig von extrazellulärem  $\text{Na}^+$  (Abb. 3.23A). Zudem zeigten sich in  $\text{Na}^+$ -freier Ringerlösung nur schwache bis keine  $\text{pH}_i$ -Änderungen (Abb. 3.7B).



Mit Hilfe der  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Vorpuls-Methode konnten weitere an der  $\text{pH}_i$ -Regulation beteiligte Transportproteine identifiziert werden. Die Badapplikation von  $\text{NH}_4\text{Cl}$  führt in den meisten Zelltypen zu einer charakteristischen  $\text{pH}_i$ -Änderung (BORON 2004). Die  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Zugabe führt dabei zunächst aufgrund der raschen Diffusion von  $\text{NH}_3$  in die Zelle schnell zu einer intrazellulären Alkalisierung. Ein sich anschließender moderater  $\text{pH}_i$ -Abfall ist das Ergebnis des aktiven Transports von  $\text{NH}_4^+$  in die Zelle. Nach Auswaschen von  $\text{NH}_4\text{Cl}$  führt die rasche Diffusion von  $\text{NH}_3$  aus der Zelle heraus zur drastischen intrazellulären Ansäuerung, die dann durch  $\text{pH}_i$ -regulierende Transportmechanismen aufgehoben werden kann.

Die  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Badapplikation bei Ausführungsgängen der Speicheldrüse von *P. americana* lässt eine hohe Permeabilität der basolateralen Membran für  $\text{NH}_4^+$  vermuten, die sich in einer sofortigen intrazellulären Ansäuerung äußerte. Eine anfängliche Alkalisierung aufgrund der Diffusion von  $\text{NH}_3$  war unter Kontrollbedingungen nicht zu beobachten (Abb. 3.7). Es zeigte sich demnach ein stärkerer Influx von  $\text{NH}_4^+$  als von  $\text{NH}_3$ . Eine hohe Permeabilität für  $\text{NH}_4^+$  ist keine generelle Eigenschaft von Plasmamembranen tierischer Zellen. So wurden z. B. nur geringe  $\text{NH}_4^+$ -Permeabilitäten in den Acini der Unterzungspeicheldrüse der Ratte (ZHANG *et al.* 1992), in DUM-Neuronen der Heuschrecke *Schistocerca gregaria* (SCHWIENING & THOMAS 1992) sowie in Malpighischen Gefäßen von *A. aegypti* (PETZEL 2000) nachgewiesen. In diesen Zelltypen konnte eine deutliche intrazelluläre Alkalisierung bei  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Applikation beobachtet werden. Im Gegenzug dazu wurden hohe  $\text{NH}_4^+$ -Permeabilitäten in Astrozyten des Cerebrums der Maus (NAGARAJA & BROOKES 1998), in Epithelzellen des Colons und der Niere von Ratten (BLEICH *et al.* 1995, RAMIREZ *et al.* 1999), in Malpighischen Gefäßen von *Drosophila hydei* (BERTRAM & WESSING 1994) sowie kürzlich in Speicheldrüsen der Fliege *Calliphora vicina* (SCHEWE 2005) beobachtet. In diesen Zelltypen erfolgte eine rasche  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -induzierte intrazelluläre Ansäuerung, vergleichbar zu der in den Ausführungsgängen der Speicheldrüse von *P. americana*. Der detaillierte Weg des  $\text{NH}_4^+$ -Influx wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Als mögliche Transportwege für  $\text{NH}_4^+$  sind aber der NKCC, der NHE sowie  $\text{K}^+$ -Kanäle beschrieben (RAMIREZ *et al.* 1999, HEITZMANN *et al.* 2000). Die Beteiligung eines  $\text{Na}^+$ -abhängigen Transportmechanismus am  $\text{NH}_4^+$ -Influx zeigt sich in einer transienten Alkalisierung bei  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Badapplikation in  $\text{Na}^+$ -freier Ringerlösung (Abb. 3.7B,C,D). In diesem Fall war der anfängliche Influx von  $\text{NH}_3$  stärker als der von  $\text{NH}_4^+$ .

Die  $\text{pH}_i$ -Erholung nach  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -induzierter intrazellulärer Ansäuerung konnte vollständig auf die Aktivität einer apikal lokalisierten  $\text{V-H}^+$ -ATPase sowie eines basolateral lokalisierten NHE zurückgeführt werden (Abb. 3.7). Die  $\text{V-H}^+$ -ATPase konnte einerseits spezifisch mit dem Hemmstoff Concanamycin A und andererseits unspezifisch durch Hemmung der mitochondrialen ATP-Synthese mittels Oligomycin gehemmt werden. Beides führte zu einer Verlangsamung der  $\text{pH}_i$ -Erholungsrate. Der NHE konnte spezifisch durch das Amiloridderivat EIPA gehemmt werden, was ebenfalls zu einer Verlangsamung der  $\text{pH}_i$ -Erholungsrate führte. Die basolaterale Lokalisation des NHE zeigt sich darin, dass die Effekte von EIPA auch durch Entfernen von extrazellulärem  $\text{Na}^+$  initiiert werden konnten. Bei simultaner Hemmung von  $\text{V-H}^+$ -ATPase und NHE war nach intrazellulärer Ansäuerung keine  $\text{pH}_i$ -Erholung zu beobachten. Bei akuter intrazellulärer Ansäuerung sind demnach NHE und  $\text{V-H}^+$ -ATPase aktiv.

Die Beteiligung der  $\text{V-H}^+$ -ATPase an der  $\text{pH}_i$ -Regulation wurde bereits vielfach beschrieben. So ist die  $\text{V-H}^+$ -ATPase z. B. an der  $\text{pH}_i$ -Erholung nach  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -induzierter intrazellulärer Ansäuerung in den Ausführungsgängen der menschlichen Schweißdrüsen beteiligt (GRANGER *et al.* 2002). Dabei trägt sie auch zur Ansäuerung des sezernierten Schweißes bei. Die  $\text{V-H}^+$ -ATPase spielt aber z. B. auch in Malpighischen Gefäßen von *D. hydei* (BERTRAM & WESSING 1994), im Sammelrohr der Niere von Kaninchen (YIP *et al.* 2002), im Innenohr von Meerschweinchen (STANKOVIC *et al.* 1997) sowie in Astrozyten des Hippocampus der Ratte (PAPPAS & RANSOM 1993) eine entscheidende Rolle bei der  $\text{pH}_i$ -Regulation.

Die Familie der NHEs besteht aus mindestens sechs Isoformen. Die Isoform NHE1 wird im Gegensatz zu anderen NHE-Isoformen in nahezu jeder untersuchten Zelle exprimiert. Dieses ubiquitäre Vorkommen lässt darauf schließen, dass der NHE1 zur Grundausstattung der Zelle gehört und eine zentrale Rolle bei der Aufrechterhaltung des intrazellulären Milieus spielt (*housekeeping-function*). Der NHE1 wird als die für die Regulation des  $\text{pH}_i$  und des Zellvolumens wichtigste NHE-Isoform angesehen. Eine Beteiligung des NHE an der  $\text{pH}_i$ -Regulation ist bei Vertebraten z. B. im Pancreas, im Colon, in der Niere, und in Schweißdrüsen sowie bei Invertebraten z. B. in Malpighischen Gefäßen nachgewiesen (STUENKEL *et al.* 1988, SOLEIMANI *et al.* 1994, HASSELBLATT *et al.* 2000, PETZEL 2000, GRANGER *et al.* 2003). In epithelialen Zellen

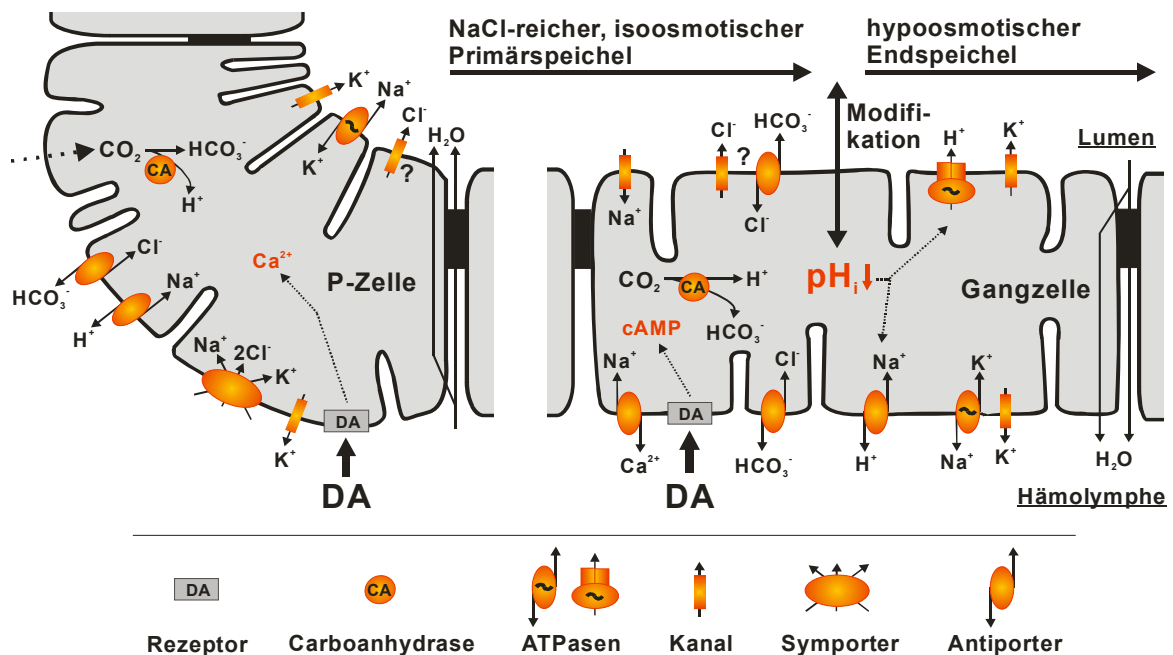
ist der NHE1 ausschließlich in der basolateralen Zellmembran zu finden (ORLOWSKI & GRINSTEIN 1997, WAKABAYASHI *et al.* 1997).

Interessanterweise führte die Hemmung der V-H<sup>+</sup>-ATPase mittels Concanamycin A bzw. die Hemmung des NHE durch Na<sup>+</sup>-freie Ringerlösung unter Ruhebedingungen (ohne akute Ansäuerung durch NH<sub>4</sub>Cl-Badapplikation) nicht zu pH<sub>i</sub>-Änderungen (Abb. 3.7). Bei einer basalen Aktivität beider Transportproteine hätte man in beiden Fällen eine intrazelluläre Ansäuerung erwartet. Dies deutet darauf hin, dass die Ausführungszellen unter Ruhebedingungen nur einer geringen Ansäuerungsrate ausgesetzt sind. Erst durch eine starke akute Ansäuerung wie z. B. durch einen erhöhten Stoffwechsel sind der NHE und die V-H<sup>+</sup>-ATPase aktiv. In den Ausführungszellen der Speicheldrüse von *P. americana* sind der NHE und die V-H<sup>+</sup>-ATPase ganz offensichtlich bei der Regulation des Ruhe-pH<sub>i</sub> von geringerer Bedeutung, aber nach akuter intrazellulärer Ansäuerung für die pH<sub>i</sub>-Erholung verantwortlich. Die Aktivität des NHE wird durch den pH<sub>i</sub> reguliert und steigt bei intrazellulärer Ansäuerung. Postuliert wird eine Interaktion von Protonen mit einer „*modifer site*“ („pH-Sensor“) am NHE, die den NHE allosterisch mit steigender Protonenkonzentration aktiviert (WAKABAYASHI *et al.* 1997). In vielen Zellen ist der NHE deshalb an der Regulation des Ruhe-pH<sub>i</sub> nicht beteiligt, obwohl er dort exprimiert wird (TONNESSEN *et al.* 1990, BROKL *et al.* 1998, TSUCHIYA *et al.* 2001). Andererseits ist der NHE dann nach akuter intrazellulärer Ansäuerung an der pH<sub>i</sub>-Erholung wesentlich beteiligt. So konnten ZHANG *et al.* (1992) z. B. zeigen, dass die pH<sub>i</sub>-Erholungsrate von der Stärke der NH<sub>4</sub>Cl-induzierten intrazellulären Ansäuerung abhing und auf die unterschiedlich starke Aktivität des NHE zurückzuführen war.

Über die Regulation der V-H<sup>+</sup>-ATPase-Aktivität durch den pH<sub>i</sub> ist nur wenig bekannt. Es konnte z. B. gezeigt werden, dass nach einer akuten intrazellulären Ansäuerung mittels NH<sub>4</sub>Cl oder bei Badapplikation von CO<sub>2</sub> im Sammelrohr der Niere eine Umverteilung der V-H<sup>+</sup>-ATPase von intrazellulären Vesikeln hin zur apikalen Membran erfolgt und somit die H<sup>+</sup>-Sekretion erhöht wird (SCHWARTZ & AL-AWQATI 1985, SABOLIC *et al.* 1997). Diese Exozytose erfolgt aber langsam und erst nach mehreren Minuten bis Stunden der NH<sub>4</sub>Cl- bzw. CO<sub>2</sub>-Behandlung. Die molekularen Mechanismen sind nicht bekannt. VAN ADELSBERG & AL-AWQATI (1986) konnten aber an Mitochondrien-reichen Epithelzellen der Harnblase zeigen, dass dieser Prozess von einem intrazellulären Anstieg der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> abhängt.

### 4.3 DA-induzierte pH-Änderungen in den Ausführgängen

Die detaillierten Mechanismen der Speichelmodifikation in den Ausführgängen der Speicheldrüse von *P. americana* sind noch unbekannt. Das gilt sowohl für die beteiligten Transportprozesse als auch die intrazellulären Signalkaskaden, die durch DA aktiviert werden. In dieser Arbeit wurde vor allem untersucht, welchen Beitrag die in den Ausführungszellen apikal lokalisierte V-H<sup>+</sup>-ATPase zur pH<sub>i</sub>-Regulation leistet. Hinweise auf ihre Aktivität konnten aus Messungen des intrazellulären sowie luminalen pH in den Ausführgängen gewonnen werden. Ein fundamentales Ergebnis dieser Arbeit ist, dass die DA-induzierten Änderungen des pH<sub>i</sub> in den Ausführgängen ein Indikator für die Speichelmodifikation sind. Auf dieser Grundlage konnte aus den vorliegenden Ergebnissen eine erweiterte Arbeitshypothese zur Primärspeichelbildung und Speichelmodifikation erstellt werden (Abb. 4.0). Dieses Modell wird nachfolgend detailliert erläutert.



**Abb. 4.0** Vorgeschlagenes Modell zu den Transportprozessen in den peripheren Zellen (P-Zelle) der Acini sowie den Epithelzellen der Ausführgänge (Gangzelle) in der Speicheldrüse von *P. americana* bei DA-Stimulierung. Erläuterungen siehe Text.

### 4.3.1 DA-induzierte pH-Änderungen in isolierten Ausführungsgängen

In der Speicheldrüse von *P. americana* bilden dopaminerge Nervenfasern an der Oberfläche der Acini ein lockeres Netz. Neurohämale Freisetzungstellen für DA sind zwischen den einzelnen Acini und in unmittelbarer Nähe der peripheren Zellen vorhanden. Einige wenige dopaminerge Nervenfasern dringen in unregelmäßigen Abständen tief zwischen die Epithelzellen der Ausführungsgänge ein. Hier liegen Freisetzungstellen für DA zwischen den einzelnen Ausführungszellen (BAUMANN *et al.* 2002, BAUMANN *et al.* 2004). In allen bisherigen Arbeiten, in denen die Funktionen der Ausführungsgänge untersucht wurden, hat man isolierte Ausführungsgänge mit Acini verwendet (JUST & WALZ 1996, LANG & WALZ 1999, 2001). In diesen Präparaten wurden bei DA-Stimulierung immer die peripheren Zellen der Acini und die Ausführungszellen stimuliert. DA-induzierte Effekte in den Ausführungsgängen konnten demnach auch ein Ergebnis DA-induzierter Effekte in den Acini sein. In dieser Arbeit wurden zum ersten Mal Funktionen isolierter Ausführungsgänge ohne Acini untersucht. Deshalb konnten in derart reduzierten Präparaten DA-induzierte Ausführungsgang-spezifische Funktionen beobachtet werden.

Die DA-induzierte intrazelluläre Ansäuerung in isolierten Ausführungsgängen konnte vollständig auf die Aktivität eines  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Antiporters (AE) zurückgeführt werden. Die folgenden Ergebnisse unterstützen diese Aussage. Die DA-induzierte Ansäuerung war unabhängig von extrazellulärem  $\text{Na}^+$  (Abb. 3.23), aber vollständig abhängig von extrazellulärem  $\text{Cl}^-$  (Abb. 3.21A). Zudem konnte die Ansäuerung nahezu vollständig durch DIDS, einem Hemmstoff von Anionentransportern, unterdrückt werden (Abb. 3.21B). Intrazelluläres  $\text{HCO}_3^-$  für die Aktivität des AE wird ganz offensichtlich durch die Aktivität der Carboanhydrase bereitgestellt, da ihre Hemmung auch die Ansäuerung reduzierte (Abb. 3.22A). Die Carboanhydrase wurde bereits histochemisch in den Ausführungszellen lokalisiert (JUST & WALZ 1994b). Es wurde zudem kürzlich gezeigt, dass die Carboanhydrase an  $\text{HCO}_3^-$ -Transporter wie AE und NBC bindet. Das so gebildete Transportmetabolon erhöht die Transportaktivität (STERLING *et al.* 2001, PUSHKIN *et al.* 2004). Eine solche Kopplung ist auch in den Ausführungsgängen der Speicheldrüse von *P. americana* denkbar.

Während die Stimulierung mit 1  $\mu\text{M}$  DA intrazellulär eine Ansäuerung bewirkt, ist an der luminalen Oberfläche der Ausführungsgänge eine Alkalisierung zu beobachten. Auch diese Alkalisierung ist  $\text{Cl}^-$ -abhängig (Abb. 3.29). Andererseits ist die luminal Alkalisierung im Gegensatz zur intrazellulären Ansäuerung bei Anwesenheit wie bei Abwesenheit von extrazellulärem  $\text{HCO}_3^-$  zu beobachten. Die Ursachen und Funktionen der luminalen Alkalisierung konnten in dieser Arbeit noch nicht geklärt werden. Möglicherweise ist die luminal Alkalisierung das Ergebnis einer  $\text{HCO}_3^-$ -Sekretion.

Die Hauptfunktion zahlreicher Ausführungsgänge von Speicheldrüsen besteht in der Resorption von  $\text{Na}^+$  und  $\text{Cl}^-$  sowie der Sekretion von  $\text{K}^+$  und  $\text{HCO}_3^-$  (KNAUF *et al.* 1982, COOK *et al.* 1994). Die Transportwege von Anionen in den Ausführungsgängen von Speicheldrüsen sind aber nur unzureichend untersucht. Ein möglicher Weg der  $\text{HCO}_3^-$ -Sekretion ist durch einen  $\text{Cl}^-$ -Recyclingmechanismus angetrieben, der eine apikale  $\text{Cl}^-$ -Leitfähigkeit ( $\text{Cl}^-$ -Kanal) mit einem  $\text{Cl}^-$ - $\text{HCO}_3^-$ -Antiporter (AE) koppelt. So konnte z. B. in den Ausführungsgängen der Speicheldrüsen von Kaninchen bei luminaler Applikation des Stilben-Derivats SITS, einem Hemmstoff von Anionentransportern, die  $\text{HCO}_3^-$ -Sekretion gehemmt werden (COOK *et al.* 1994). Zudem ist die Lokalisation von  $\text{Cl}^-$ -Kanälen (CFTR, *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) sowie des AE in der apikalen Membran in Ausführungsgängen der Speicheldrüsen von Ratten und Mäusen beschrieben (ZHAO *et al.* 1995, LEE *et al.* 1999). Durch die Aktivität der Carboanhydrase in den Ausführungszellen der Speicheldrüse von *P. americana* wird intrazellulär  $\text{HCO}_3^-$  bereitgestellt. Durch einen AE in der basolateralen Membran kann ein  $\text{Cl}^-$ -Influx erfolgen. Dadurch wird  $\text{Cl}^-$  intrazellulär über dem elektrochemischen Gleichgewicht gehalten, so dass apikal ein  $\text{Cl}^-$ -Efflux über  $\text{Cl}^-$ -Kanäle ins Lumen erfolgen kann. Dadurch kann ein apikal lokalisierter AE angetrieben werden und  $\text{HCO}_3^-$  ins Lumen transportieren (Abb. 4.0). Das Ergebnis wäre eine  $\text{Cl}^-$ -abhängige intrazelluläre Ansäuerung sowie eine  $\text{Cl}^-$ -abhängige luminal Alkalisierung. Genau dieses wurde auch beobachtet. Die Beteiligung der Carboanhydrase bei der DA-induzierten luminalen Alkalisierung konnte im Gegensatz zur DA-induzierten intrazellulären Ansäuerung nicht nachgewiesen werden. Ursache ist eventuell der Einsatz zweier verschiedener Hemmstoffe. Den soeben beschriebenen Mechanismus der  $\text{HCO}_3^-$ -Sekretion findet man z. B. auch in den Ausführungsgängen des Pancreas (NOVAK & GREGER 1988, AHN *et al.* 2001). Ein konzeptionelles Problem dieser Hypothese

besteht darin, dass in den Acini von Speicheldrüsen große Mengen eines NaCl-reichen Primärspichels gebildet werden und der in den Ausführungsgängen apikal lokalisierte Cl<sup>-</sup>-Kanal somit eher dem Cl<sup>-</sup>-Influx dient. Ein der HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Sekretion dienender AE könnte ohne Kopplung mit einem Cl<sup>-</sup>-Kanal aktiv sein. Im Gegensatz dazu ist die Sekretion einer Cl<sup>-</sup>-reichen Flüssigkeit in den Acini des Pancreas begrenzt. Der Großteil der Flüssigkeitssekretion erfolgt in den Ausführungsgängen, wo der apikal lokalisierte Cl<sup>-</sup>-Kanal eher einen Cl<sup>-</sup>-Efflux bewirkt und somit einen AE antreiben kann (LEE *et al.* 1999, MELVIN 1999). Zur Klärung der Cl<sup>-</sup>-abhängigen luminalen pH-Änderungen bedarf es weiterer Untersuchungen. Unbedingt erforderlich werden hierzu Messungen der DA-induzierten Änderungen der [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub> sein. Insbesondere der Einsatz eines Perfusionssystems, bei dem die Zusammensetzung der luminalen Flüssigkeit kontrolliert werden kann und Hemmstoffe gezielt apikal eingesetzt werden können, ist hierfür hilfreich.

Die V-H<sup>+</sup>-ATPase ist an der Erzeugung der DA-induzierten intrazellulären sowie luminalen pH-Änderungen beteiligt. Sie ist für die pH<sub>i</sub>-Erholung nach DA-induzierter intrazellulärer Ansäuerung verantwortlich, da diese vollständig durch Concanamycin A gehemmt werden konnte. Andererseits hatte das Entfernen von extrazellulärem Na<sup>+</sup> keinen Einfluss auf die pH<sub>i</sub>-Erholung (Abb. 3.23). Der basolateral lokalisierte NHE war im Gegensatz zur pH<sub>i</sub>-Erholung nach NH<sub>4</sub>Cl-induzierter intrazellulärer Ansäuerung nicht beteiligt. Da die Aktivität des NHE allgemein von der Stärke der intrazellulären Ansäuerung abhängt (WAKABAYASHI *et al.* 1997), ist seine Nichtbeteiligung an der pH<sub>i</sub>-Erholung nach schwacher DA-induzierter Ansäuerung nicht verwunderlich. Während nach dem Auswaschen von DA intrazellulär eine pH<sub>i</sub>-Erholung aufgrund der V-H<sup>+</sup>-ATPase-Aktivität beobachtet werden konnte, erfolgte etwa zeitgleich luminal eine Ansäuerung. Auch diese war Concanamycin A-abhängig und spiegelte die Aktivität der V-H<sup>+</sup>-ATPase wider. Die luminalen und intrazellulären pH-Änderungen korrelierten demnach nach dem Auswaschen von DA.

Die DA-induzierte intrazelluläre Ansäuerung sowie die luminalen biphasischen pH-Änderungen in isolierten Ausführungsgängen konnten durch Forskolin oder IBMX, die potentiell [cAMP]<sub>i</sub> erhöhen, vollständig imitiert werden. Andererseits konnte die Erhöhung von [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in den Ausführungszellen mittels Ionomycin keine DA-

induzierte intrazelluläre Ansäuerung hervorrufen (Abb. 3.24 & Abb. 3.30). Dies war ein weiteres Indiz dafür, dass luminale und intrazelluläre pH-Änderungen in isolierten Ausführungsgängen das Ergebnis desselben DA-induzierten Mechanismus sind. Anscheinend stimuliert der Neurotransmitter DA in den Ausführungszellen einen Anstieg der intrazellulären cAMP Konzentration. Der DA-Rezeptor könnte demnach an ein  $G_s$ -Protein binden. Die aktivierte  $G_{\alpha s}$ -Untereinheit kann mit einer membranständigen Adenylatzyklase interagieren, die daraufhin die Reaktion von ATP zu cAMP katalysiert (BLENAU & BAUMANN 2001). Direkte Messungen von DA-induzierten  $[cAMP]_i$ -Änderungen in den Ausführungsgängen der Speicheldrüse von *P. americana* erfolgten bisher nicht. Es wurde zwar gezeigt, dass DA einen  $[cAMP]_i$ -Anstieg in Speicheldrüsen der Schabe *Nauphoeta cinerea* (GREWE & KEBABIAN 1982) sowie der Heuschrecke *Locusta migratoria* (ALI & ORCHARD 1995) hervorruft. Es ist aber unklar, in welchen Zelltypen der  $[cAMP]_i$ -Anstieg erfolgte. In den Ausführungsgängen von Speicheldrüsen von Ratte und Kaninchen konnte dagegen eindeutig ein Agonist-induzierter  $[cAMP]_i$ -Anstieg beobachtet werden (DENNIS & YOUNG 1975, DEHAYE & TURNER 1991, EVANS *et al.* 1996). Der DA-induzierte  $[cAMP]_i$ -Anstieg könnte die  $HCO_3^-$ -Sekretion in den Ausführungszellen bewirken. Die  $HCO_3^-$ -Sekretion im Zwölffingerdarm der Maus sowie in den Ausführungsgängen des Pancreas der Ratte ist von einer apikalen  $Cl^-$ -Leitfähigkeit und einem AE sowie der Carboanhydrase-Aktivität abhängig und wird ebenfalls durch cAMP stimuliert (NOVAK & GREGER 1988, CLARKE & HARLINE 1998). Auch die Carboanhydrase-vermittelte  $HCO_3^-$ -Sekretion in Lungenepithelien des Hundes wird durch cAMP stimuliert (WELSH & SMITH 2001). Dass die Aktivität der  $V-H^+$ -ATPase durch den cAMP-Signalweg reguliert werden kann, wurde kürzlich in Speicheldrüsen der Fliege *Calliphora vicina* nachgewiesen (DAMES *et al.* 2006). Hierbei erfolgt cAMP-abhängig eine reversible Dissoziation des  $V-H^+$ -ATPase-Holoenzym in die  $V_o$ - und  $V_1$ -Domäne. Auch in Malpighischen Gefäßen von *Drosophila melanogaster* (O'DONNELL *et al.* 1996) und in den Kiemen der Wollhandkrabbe (ONKEN *et al.* 2000) konnte eine Aktivierung der  $V-H^+$ -ATPase durch cAMP gezeigt werden. Ob in den Ausführungsgängen der Speicheldrüse von *P. americana* die intrazelluläre Ansäuerung selbst das Signal zur Aktivierung der  $V-H^+$ -ATPase ist, oder diese direkt durch einen cAMP-Signalweg aktiviert wird, ist in weiteren Untersuchungen zu klären.



### 4.3.2 Abhängigkeit von Acini und Ausführgängen

Ein weiteres wesentliches Ergebnis dieser Arbeit war, dass die Prozesse der Speichelmodifikation in den Ausführungszellen isolierter Loben von der Aktivität der Acini abhängig waren. Nachfolgend werden hierfür Evidenzen aufgelistet:

(1) Die DA-induzierte intrazelluläre Ansäuerung in den Ausführungszellen war wesentlich stärker, wenn die Acini am Präparat verblieben (Abb. 3.10).

(2) Eine vergleichbare intrazelluläre Ansäuerung konnte in den Ausführungszellen isolierter Loben auch mit einer 5-HT-Stimulierung beobachtet werden. Die Ausführgänge selbst sind nicht serotonerg innerviert (BAUMANN *et al.* 2002), so dass auch keine 5-HT-induzierte Ansäuerung in isolierten Ausführgängen beobachtet werden konnte (Abb. 3.11). Die 5-HT-induzierten Effekte in den Acini bewirkten demnach die  $pH_i$ -Änderungen in den Ausführungszellen.

(3) Die DA-induzierte intrazelluläre Ansäuerung in den Ausführgängen isolierter Loben konnte in Tris-Ringerlösung nahezu vollständig durch die Hemmung des NKCC mit Bumetanid unterdrückt werden (Abb. 3.12B). Andererseits hatte Bumetanid keinen Einfluss auf die DA-induzierten  $pH_i$ -Änderungen in isolierten Ausführgängen. RIETDORF *et al.* (2003) konnten bereits zeigen, dass die DA- und 5-HT-induzierte Speichelsekretion durch Bumetanid um ca. 92 % bzw. 85 % reduziert war. Die Konzentrationen an  $Na^+$ ,  $K^+$  und  $Cl^-$  sowie die Osmolarität des Endspeichels waren in Anwesenheit von Bumetanid ebenfalls drastisch reduziert. Da die Speichelsekretion im Wesentlichen durch die Aktivität der P-Zellen bestimmt wird, müssen diese basolateral einen NKCC besitzen, der für die Bildung des Primärspeichels verantwortlich ist.

(4) Der DA-induzierte  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg in den Ausführungszellen ist ebenfalls nur zu beobachten, wenn man isolierte Loben mit Acini verwendet. In isolierten Ausführgängen ohne Acini sind keine DA-induzierten  $[Ca^{2+}]_i$ -Änderungen zu messen. Der DA-induzierte  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg hängt von der Aktivität des NKCC ab (Abb. 3.3B), der anscheinend nur in den Acini vorkommt (siehe oben). Das Ergebnis ist ein DA-induzierter  $[Na^+]_i$ -Anstieg, der dem  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg vorausgeht (Abb. 3.4B). Dieser DA-induzierte  $[Na^+]_i$ -Anstieg ist ebenfalls nicht in isolierten Ausführgängen ohne Acini zu beobachten.

(5) Ein ähnlich starker  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg ist in den Ausführungszellen nach Stimulierung mit 5-HT zu beobachten (Abb. 3.2). Der 5-HT-induzierte  $[Ca^{2+}]_i$ -

Anstieg ist aber nur bei Verwendung von isolierten Loben mit Acini zu beobachten und nicht bei isolierten Ausführungsgängen ohne Acini.

#### 4.3.3 DA-induzierte pH<sub>i</sub>-Änderungen in den Ausführungsgängen als Indikator der Aktivität der P-Zellen in den Acini

Die DA-induzierten pH<sub>i</sub>-Änderungen waren in Abhängigkeit von der Ab-/Anwesenheit der Acini unterschiedlich. Nur in Gegenwart der Acini konnten starke DA-induzierte intrazelluläre Ansäuerungen beobachtet werden. In isolierten Ausführungsgängen ohne Acini waren diese Ansäuerungen wesentlich schwächer (Abb. 3.10). Die pH<sub>i</sub>-Messungen wurden zwar nicht absolut kalibriert. Erste pH<sub>i</sub>-Messungen mit pH-empfindlichen Mikroelektroden zeigten in den Epithelzellen der Ausführungsgänge bei Stimulierung mit 1 µM DA Ansäuerungen von  $0,27 \pm 0,09$  pH-Einheiten ( $n = 6$ ) und sind somit physiologisch durchaus zu berücksichtigen (H. LIEBHERR, persönliche Mitteilung). Die DA-induzierte intrazelluläre Ansäuerung in den Ausführungszellen isolierter Loben war dosisabhängig, wobei der EC<sub>50</sub> ca. 30 nM DA betrug. Dieser Wert ist mit bereits beschriebenen Daten gut vergleichbar. So erfolgt z. B. die DA-induzierte Speichelsekretion in Speicheldrüsen von *P. americana* bzw. *N. cinerea* mit einer halbmaximalen Antwort bei ca. 110 nM DA bzw. 88 nM DA (HOUSE & SMITH 1978, JUST & WALZ 1996). Die Hyperpolarisation der acinösen Zellen der Speicheldrüse von *N. cinerea* erfolgt durch DA mit einem EC<sub>50</sub> von 42 nM DA (BOWSER-RILEY & HOUSE 1976).

Die intrazelluläre Ansäuerung in den Ausführungszellen isolierter Loben wurde sowohl durch DA als auch durch 5-HT hervorgerufen, obwohl die Ausführungsgänge nur dopaminerg sind. Es wird deshalb postuliert, dass die pH<sub>i</sub>-Änderungen durch die Veränderungen auf der luminalen Seite der Ausführungsgänge ausgelöst werden. DA und 5-HT bewirken die Primärspeichelbildung in den Acini. Der Fluss des Primärspeichels entlang des Ausführungssystems kann dann die pH<sub>i</sub>-Änderungen in den Ausführungszellen bewirken. Somit ist zu vermuten, dass die pharmakologischen Effekte bei der Untersuchung des pH<sub>i</sub> in den Ausführungszellen primär auf Effekte in den P-Zellen der Acini zurückzuführen sind. Demnach lassen die pH<sub>i</sub>-Messungen in den Ausführungsgängen ganz

offensichtlich Rückschlüsse auf die Prozesse der Primärspeichelbildung in den Acini zu.

Folgende Ergebnisse konnten bei der Untersuchung der DA-induzierten intrazellulären Ansäuerung in den Ausführungsgängen isolierter Loben erzielt werden:

In Abwesenheit von  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$  hing die DA-induzierte intrazelluläre Ansäuerung in den Ausführungszellen von der Aktivität des NKCC ab. Bei dessen Hemmung war lediglich eine transiente Ansäuerung zu beobachten (Abb. 3.12). Da in isolierten Ausführungsgängen ohne Acini einerseits keine drastische Ansäuerung und andererseits auch keine Effekte der NKCC-Hemmung nachgewiesen werden konnten, ist der NKCC höchstwahrscheinlich in der basolateralen Membran der P-Zellen lokalisiert. In Anwesenheit von  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$  dagegen spielte der NKCC keine Rolle bei der DA-induzierten Ansäuerung (Abb. 3.14B). Unter diesen Bedingungen war eine gekoppelte Aktivität eines AE und eines NHE in den P-Zellen für die DA-induzierte Ansäuerung verantwortlich. Zudem konnte die Ansäuerung durch die Hemmung der Carboanhydrase reduziert werden. Die Aktivität der Carboanhydrase und des AE war auch in Abwesenheit von  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$  nachzuweisen. Die transiente NKCC-unabhängige Ansäuerung war nämlich durch die Hemmung der Carboanhydrase oder des AE weiter reduzierbar (Abb. 3.13B). In Abwesenheit von  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$  spielten sie aber nur eine untergeordnete Rolle, da die alleinige Hemmung von Carboanhydrase oder AE (ohne Hemmung des NKCC) keinen Einfluss auf die Ansäuerung hatte. Die Hemmung der  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase mit Ouabain bewirkte eine drastische Reduzierung der DA-induzierten Ansäuerung (Abb. 3.17). Die  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase ist in den P-Zellen der Acini nur apikal stark exprimiert. Dort ist die  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase für basolateral appliziertes Ouabain unzugänglich. Der beobachtete Effekt konnte demnach nur durch die Hemmung einer basolateral lokalisierten  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase in den Ausführungszellen zustande kommen. Anscheinend ist die DA-induzierte intrazelluläre Ansäuerung in den Ausführungsgängen durch deren basolateral lokalisierte  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase energetisiert.

Die aus den oben beschriebenen Ergebnissen gewonnenen Schlussfolgerungen für die Prozesse der DA-induzierten Primärspeichelbildung in den P-Zellen der Acini werden nachfolgend erläutert (Abb. 4.0):

Die Stimulierung isolierter Loben mit DA in Abwesenheit von  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$  bewirkt die Bildung eines isoosmotischen, NaCl-reichen Primärspeichels (GUPTA & HALL 1983). Der transepitheliale NaCl-Transport wird in den P-Zellen durch eine apikal lokalisierte  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  energetisiert. Die Generierung eines Konzentrationsgradienten für  $\text{Na}^+$  über der apikalen Membran durch die Aktivität der  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  könnte den  $\text{Cl}^-$ -Efflux apikal z. B. über  $\text{Cl}^-$ -Kanäle bewirken. Wasser kann dann passiv trans- und/oder parazellulär ins Lumen folgen. Die Aktivität der  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  hat das Entfernen von  $\text{K}^+$  aus dem Lumen zur Folge. Da im Primärspeichel auch  $\text{K}^+$  nachgewiesen wurde (GUPTA & HALL 1983), wird eine apikale  $\text{K}^+$ -Leitfähigkeit postuliert. Die Aufnahme von  $\text{Na}^+$  und  $\text{Cl}^-$  auf der basolateralen Seite der P-Zellen wird durch die DA-induzierte Aktivität des NKCC bewirkt. Der NKCC wird durch den Konzentrationsgradienten für  $\text{Na}^+$  über der basolateralen Membran angetrieben. So haben GUPTA & HALL (1983) nach DA-Stimulierung in den P-Zellen einen Anstieg der  $[\text{Na}^+]_i$ ,  $[\text{K}^+]_i$  und  $[\text{Cl}^-]_i$  beobachtet. Die kardinale Rolle des NKCC bei der Bildung des Primärspeichels wurde bereits von RIETDORF *et al.* (2003) postuliert, und die Abhängigkeit der Speichelsekretion von extrazellulärem  $\text{Na}^+$  hatten bereits SMITH & HOUSE (1979) beobachtet. In Anwesenheit von  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$  wechselt der Mechanismus der Aufnahme von  $\text{Na}^+$  und  $\text{Cl}^-$  auf der basolateralen Seite. Anstatt eines NKCC wird die NaCl-Aufnahme unter diesen Bedingungen durch die gekoppelte Aktivität eines AE und eines NHE gewährleistet. Die Beteiligung des AE an der NaCl-Aufnahme setzt das Vorhandensein von intrazellulärem  $\text{HCO}_3^-$  voraus. Die Aktivität einer Carboanhydrase in den P-Zellen, die bereits immunzytochemisch durch JUST & WALZ (1994b) nachgewiesen wurde, generiert  $\text{HCO}_3^-$  aus der Reaktion von  $\text{H}_2\text{O}$  und  $\text{CO}_2$ , das frei in die P-Zellen hinein diffundiert. Die bei dieser Reaktion gebildeten Protonen werden durch eine NHE-Aktivität aus den P-Zellen entfernt. Eine AE/NHE-Aktivität konnte auch in Abwesenheit von  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$  nachgewiesen werden, war aber nur transient. Unter diesen Bedingungen fehlt demnach der  $\text{CO}_2$ -Nachschub für eine kontinuierliche AE/NHE-Aktivität.

Die Aktivität eines NKCC und/oder die kombinierte Aktivität eines AE und NHE sind vielfach vorgeschlagene Mechanismen für die NaCl-Aufnahme in den Acini von Speicheldrüsen (NAUNTOFTE 1992, COOK *et al.* 1994, TURNER & SUGIYA 2002). Der Carbachol-induzierte  $[\text{Na}^+]_i$ -Anstieg in den Acini der Unterzungenspeichel-

drüse der Ratte ist in Anwesenheit von  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$  zu > 60 % NKCC- sowie zu < 30 % NHE-abhängig (ZHANG *et al.* 1993). Im Gegensatz dazu konnten DISSING & NAUNTOFTE (1990) in der Ohrspeicheldrüse der Ratte einen Carbachol-induzierten  $[\text{Na}^+]_i$ -Anstieg in den Acini beobachten, der in Gegenwart von  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$  zu 75 % durch den NHE und nur zu 15 % durch den NKCC bewirkt wurde. LEE *et al.* (2005) konnten den Einfluss von  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$  auf die Art und Weise der Acetylcholin-induzierten  $\text{Na}^+$ -Aufnahme in die Acini der Unterkieferspeicheldrüse der Ratte nachweisen. In Abwesenheit von  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$  erfolgte die  $\text{Na}^+$ -Aufnahme nahezu vollständig durch den NKCC, während sich in Anwesenheit von  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$  eine etwa gleich starke Beteiligung von NKCC und NHE zeigte. Die Aktivität des NKCC kann demnach durch eine hohe  $\text{HCO}_3^-$ -Konzentration unterdrückt werden, auch wenn die genauen Mechanismen unklar sind. In NKCC1-*knockout* Mäusen war die Carbachol-induzierte Speichelsekretion um 60 % reduziert. Gleichzeitig ist aber die AE-Aktivität in den Acini der Ohrspeicheldrüse erhöht, um den Verlust des NKCC zu kompensieren (EVANS *et al.* 2000).

Generell kann man nur begrenzt Aussagen über die relative Beteiligung von Mechanismen bei der NaCl-Aufnahme in den Acini von Speicheldrüsen treffen. Ein Problem liegt z. B. darin, dass die Hemmung eines Mechanismus höchstwahrscheinlich die elektrochemischen Gradienten für die verbleibenden Mechanismen verändert. So sinkt  $[\text{Cl}^-]_i$  bei der Hemmung des NKCC und verstärkt automatisch die  $\text{Cl}^-$ -Aufnahme über einen AE. Der Grund für das Vorhandensein verschiedener Mechanismen zur NaCl-Aufnahme in den Acini ist nicht klar. So können beide Mechanismen in derselben Zelle vorhanden sein (TURNER & GEORGE 1988). Es ist möglich, dass die Beteiligung der einzelnen Mechanismen je nach physiologischen Bedingungen wie z. B. kurze vs. lang anhaltende Speichelsekretion moduliert werden kann (TURNER & SUGIYA 2002). Auch könnten Schwankungen der  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -Konzentration im Blut bzw. in der Hämolymphe durch das Vorhandensein  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -abhängiger sowie -unabhängiger Transportmechanismen besser ausgeglichen werden.

Eine  $[\text{cAMP}]_i$ -Erhöhung in den P-Zellen ist offenbar nicht die Ursache für die Prozesse der Primärspeichelbildung. Dafür sprechen folgende Beobachtungen: Die künstliche Erhöhung der  $[\text{cAMP}]_i$  durch Forskolin und/oder IBMX führte zu einer schwachen intrazellulären Ansäuerung in den Ausführgängen bei

Anwesenheit sowie bei Abwesenheit der Acini (Abb. 3.20 & 3.24). Die starke DA-induzierte intrazelluläre Ansäuerung in den Ausführungsgängen war von der Aktivität der Acini abhängig. Forskolin und/oder IBMX konnten diese starke Ansäuerung bei Verwendung isolierter Loben aber nicht imitieren. Zudem konnten Forskolin und/oder IBMX bei Verwendung isolierter Loben auch keinen  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg in den Ausführungszellen generieren, der ebenfalls von der Aktivität der Acini abhängig war.

Da die starke DA-induzierte Ansäuerung und eine vergleichbar starke Ionomycin-induzierte Ansäuerung nur in Ausführungsgängen mit Acini, aber nie in isolierten Ausführungsgängen ohne Acini beobachtet werden konnten, kann vermutet werden, dass eine Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  in den P-Zellen der Acini Voraussetzung für die Ansäuerung in den Ausführungsgängen ist. Es ist möglich, dass in den P-Zellen neben einer  $Ca^{2+}$ -Freisetzung aus intrazellulären Speichern auch ein  $Ca^{2+}$ -Influx über die basolaterale Membran erfolgt. Dafür spricht, dass die starke DA-induzierte intrazelluläre Ansäuerung in den Ausführungsgängen durch das Entfernen von extrazellulärem  $Ca^{2+}$  nur noch transient erfolgte und möglicherweise lediglich den Anteil der  $Ca^{2+}$ -Freisetzung aus internen Speichern widerspiegelte. Dafür spricht auch, dass die Badapplikation von  $La^{3+}$  die Ansäuerung reduziert.  $La^{3+}$  hemmt in vielen Systemen den Stimulus-induzierten  $Ca^{2+}$ -Influx in die Zelle (KWAN *et al.* 1990). Auch für die Aufrechterhaltung der Ansäuerung war ein  $Ca^{2+}$ -Influx über die basolaterale Membran nötig (Abb. 3.19). Anscheinend stimuliert der Neurotransmitter DA in den P-Zellen also einen Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$ . Der DA-Rezeptor könnte demnach an ein  $G_{q/o}$ -Protein binden und an den  $IP_3/Ca^{2+}$ -Signalweg gekoppelt sein (BLENAU & BAUMANN 2001). Weitere Evidenzen unterstützen dieses Szenario. Ein DA-induzierter  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg in den P-Zellen der Speicheldrüse von *P. americana* konnte kürzlich durch WALZ *et al.* (2006) direkt gemessen werden. Die Badapplikation von 10 mM cAMP dagegen konnte in isolierten Speicheldrüsen von *P. americana* keine oder nur eine sehr geringe Flüssigkeitssekretion auslösen, obwohl die Hemmung der Adenylatzyklase durch Badapplikation von MDL 12,330 A die Sekretionsrate verringerte (RIETDORF 2003). Diese Ergebnisse sowie die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen die Vermutung zu, dass die DA-induzierte Primärspeichelbildung durch einen  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg vermittelt wird, und cAMP möglicherweise modulierende Wirkungen hat.

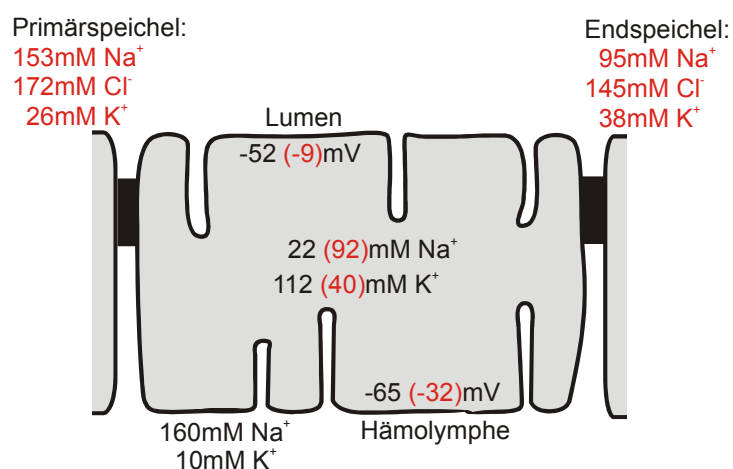
Der Einfluss der intrazellulären Botenstoffe cAMP und  $\text{Ca}^{2+}$  auf die Flüssigkeitssekretion wurde in der Vergangenheit ausführlich an der Speicheldrüse der Schabe *N. cinerea* untersucht. Auch hier ist die DA-induzierte Flüssigkeitssekretion in  $\text{Ca}^{2+}$ -freier Ringerlösung nur transient (GRAY & HOUSE 1982). Die Applikation des  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophors A23817 führt hier ebenfalls zu einer Flüssigkeitssekretion. Allerdings kann die A23817-induzierte Flüssigkeitssekretion durch die Hemmung der Adenylatzyklase mittels MDL 12,330 A unterdrückt werden, was auch auf einen Einfluss von cAMP hindeutet (GRAY *et al.* 1984). HOUSE (1980) konnte keine cAMP-induzierte Flüssigkeitssekretion beobachten, während GRAY *et al.* (1984) eine solche nachweisen konnten, die aber in  $\text{Ca}^{2+}$ -freier Ringerlösung nur transient war. Das basolaterale Membranpotential der acinösen Zellen konnte dagegen nur durch einen  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg, niemals aber durch einen  $[\text{cAMP}]_i$ -Anstieg beeinflusst werden (MITCHELL & MARTIN 1980, GRAY *et al.* 1984).

Auch in den Speicheldrüsen der Vertebraten ist die Flüssigkeitssekretion in den Acini  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig (NAUNTOFTE 1992, AMBUDKAR 2000, MELVIN *et al.* 2005). Der Agonist-stimulierte  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg beinhaltet eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus intrazellulären Speichern und einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx. Eine Folge ist nicht nur die Aktivierung  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger  $\text{K}^+$ - und  $\text{Cl}^-$ -Kanäle in der basolateralen bzw. apikalen Membran. Vielmehr werden auch die Transportprozesse für die basolaterale NaCl-Aufnahme durch einen  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg reguliert. So konnte bei Speicheldrüsen von Ratte und Maus gezeigt werden, dass ein Agonist- oder ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophor-induzierter  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg in den Acini eine verstärkte Aktivität von NKCC, AE und NHE zur Folge hat (MANGANEL & TURNER 1990, EVANS & TURNER 1997, NGUYEN *et al.* 2004). Die am transepithelialen NaCl-Transport beteiligten Transportproteine werden demnach durch denselben intrazellulären Botenstoff, vermutlich  $\text{Ca}^{2+}$ , reguliert.

#### **4.3.4 Ursachen der DA-induzierten pH-Änderungen in den Ausführungsgängen isolierter Loben**

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen die Hypothese zu, dass die  $\text{pH}_i$ -Änderungen in den Ausführungsgängen isolierter Loben das Ergebnis der Modifikation des Primärspeichels sind. Durch eine DA-Stimulierung wird der Primärspeichel durch

die Aktivität der P-Zellen in den Acini, wie oben beschrieben, gebildet. GUPTA & HALL (1983) konnten mit Hilfe der Elektronenstrahl-Röntgenmikroanalyse im Primärspeichel  $153 \text{ mM Na}^+$ ,  $26 \text{ mM K}^+$  sowie  $172 \text{ mM Cl}^-$  nachweisen. Der Primärspeichel ist also NaCl-reich und mit  $358 \text{ mosM}$  isoosmotisch zur Ringerlösung. Nach einer Modifikation im Ausführungssystem entsteht der Endspeichel. RIETDORF *et al.* (2003) konnten mit Hilfe der Kapillarzonenelektrophorese nach DA-Stimulierung einen NaCl-reichen Endspeichel mit  $95 \text{ mM Na}^+$ ,  $38 \text{ mM K}^+$  und  $145 \text{ mM Cl}^-$  nachweisen, der mit  $265 \text{ mosM}$  hypoosmotisch zur Ringerlösung war. Die Modifikation des Primärspeichels in den Ausführungsgängen beinhaltet demnach zumindest eine  $\text{Na}^+$ -Resorption und eine  $\text{K}^+$ -Sekretion. LANG & WALZ (2001) haben mittels Ionen-empfindlicher Mikroelektroden die  $[\text{K}^+]_i$  und  $[\text{Na}^+]_i$  in den Ausführungsgängen isolierter Loben der Speicheldrüse von *P. americana* bei DA-Stimulierung gemessen (Abb. 4.0). Der DA-induzierte drastische  $[\text{Na}^+]_i$ -Anstieg war abhängig von extrazellulärem  $\text{Cl}^-$  und konnte durch den NKCC-Hemmstoff Furosemid unterdrückt werden. Zudem konnte durch Furosemid kein DA-induzierter  $[\text{K}^+]_i$ -Abfall, sondern eher ein leichter  $[\text{K}^+]_i$ -Anstieg beobachtet werden. Der DA-induzierte  $[\text{Na}^+]_i$ -Anstieg konnte zudem nur beobachtet werden, wenn Ausführungsgänge mit Acini verwendet wurden. Wie bereits oben ausführlich beschrieben ist die Lokalisation des NKCC höchstwahrscheinlich auf die P-Zellen der Acini beschränkt. Da der NKCC für die Primärspeichelbildung in den Acini eine essentielle Rolle spielt und die Anwesenheit des Primärspeichels in den Ausführungsgängen eine Voraussetzung für seine Modifikation ist, unterdrückt die



**Abb. 4.0** DA-induzierte Änderungen der  $[\text{K}^+]_i$  und  $[\text{Na}^+]_i$  sowie des apikalen und basolateralen Membranpotentials in den Ausführungsgängen isolierter Loben der Speicheldrüse von *P. americana*, schwarz = unstimuliert, rot = 1  $\mu\text{M}$  DA-Stimulierung, GUPTA & HALL (1983), LANG & WALZ (2001), RIETDORF *et al.* (2003).



NKCC-Hemmung natürlich auch die  $\text{Na}^+$ -Resorption und  $\text{K}^+$ -Sekretion in den Ausführungsgängen.

Bei der Anwesenheit von Primärspeichel in den Ausführungsgängen könnte eine  $\text{Na}^+$ -Resorption über einen epithelialen  $\text{Na}^+$ -Kanal (ENaC) erfolgen. ENaCs sind typisch für apikale Membranen dichter Epithelien und spielen bei der  $\text{Na}^+$ -Resorption eine wesentliche Rolle (GARTY & PALMER 1997). Bei DA-Stimulierung fließt in den Ausführungsgängen ein Primärspeichel, der in etwa die Zusammensetzung hat, wie sie von GUPTA & HALL (1983) bestimmt wurde. Unter Verwendung der Ergebnisse von LANG & WALZ (2001) können die Gleichgewichtspotentiale für  $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$  an der apikalen Membran berechnet werden (Abb. 4.0). Für  $\text{Na}^+$  ergibt sich an der apikalen Membran ein einwärts gerichteter elektrochemischer Konzentrationsgradient, während sich  $\text{K}^+$  im elektrochemischen Gleichgewicht befindet. Es könnte demnach ein  $\text{Na}^+$ -Einstrom über eine DA-induzierte Aktivierung eines ENaCs erfolgen. Das würde zu einer Depolarisation der apikalen Membran führen, was auch beobachtet wird. Die  $\text{Na}^+$ -Resorption wird dabei über die basolateral lokalisierte  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase energetisiert. Die Hemmung der  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase unterdrückt nämlich die Erholung vom DA-induzierten  $[\text{Na}^+]_i$ -Anstieg in den Ausführungsgängen (LANG & WALZ 2001).

Durch die Depolarisation an der apikalen Membran besteht für  $\text{K}^+$  nun ein auswärts gerichteter elektrochemischer Konzentrationsgradient. Als Folge dessen ist ein  $\text{K}^+$ -Efflux über  $\text{K}^+$ -Kanäle vorstellbar. Eine  $\text{K}^+$ -Aufnahme kann aufgrund ihrer hohen  $\text{K}^+$ -Leitfähigkeit über der basolateralen Membran erfolgen. Aus diesem Szenario ergibt sich die Schlussfolgerung, dass ein aktiver  $\text{K}^+$ -Transport ins Lumen der Ausführungsgänge über eine  $\text{V-H}^+$ -ATPase und einem putativen  $n\text{H}^+$ - $\text{K}^+$ -Antiporter gar nicht nötig ist. Das zeigt sich auch darin, dass die DA-induzierte  $\text{pH}_i$ -Änderung in den Ausführungsgängen nicht durch Concanamycin A beeinflusst wird (Abb. 3.16), obwohl sie mit der Speichelmodifikation in Zusammenhang steht. Auch erste Ergebnisse zu Messungen der ATPase-Aktivität in Homogenaten isolierter Loben zeigen, dass die  $\text{V-H}^+$ -ATPase bei DA-Stimulierung nur ca. 10 % der Gesamt-ATPase-Aktivität ausmacht. Den größten Anteil mit etwa 90 % hat die  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase, die die  $\text{Na}^+$ -Resorption und damit auch die  $\text{K}^+$ -Sekretion energetisiert (Tab. 3.2). Auch in Homogenaten isolierter Ausführungsgänge ohne Acini hat die Aktivität der  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase mit immerhin noch ca. 67 % den größten Anteil an der Gesamt-ATPase-Aktivität, während der Anteil der  $\text{V-H}^+$ -ATPase-

Aktivität vernachlässigbar gering ist (Tab. 3.3). RIETDORF *et al.* (2003) lieferten weitere Evidenzen für eine Energetisierung der Speichelmodifikation durch die  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase. Zum einen wird die DA-induzierte Flüssigkeitssekretion durch ihre Hemmung nicht beeinflusst. Das ist nicht verwunderlich, da die Flüssigkeitssekretion vor allem das Ergebnis der Aktivität der P-Zellen ist, und die dort apikal lokalisierte  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase durch basalseitig appliziertes Ouabain nicht gehemmt werden kann. Zum anderen besitzt der Endspeichel bei DA-Stimulierung in Gegenwart von Ouabain eine geringere  $\text{K}^+$  Konzentration sowie höhere  $\text{Na}^+$  und  $\text{Cl}^-$  Konzentrationen und ist isoosmotisch. Dies deutet auf eine verringerte  $\text{Na}^+$ -Resorption und  $\text{K}^+$ -Sekretion in den Ausführungsgängen hin. Die Energetisierung eines aktiven  $\text{K}^+$ -Transports *via* eines  $n\text{H}^+$ - $\text{K}^+$ -Antiporters durch die  $\text{V-H}^+$ -ATPase wurde in Malpighischen Gefäßen, im Mitteldarm sowie in Speicheldrüsen postuliert (MADRELL & O'DONNELL 1992, WIECZOREK 1992, ZIMMERMANN *et al.* 2003). Im Gegensatz zur Situation in den Ausführungsgängen der Speicheldrüse von *P. americana* werden in diesen Fällen aber KCl-reiche Flüssigkeiten entgegen eines  $\text{K}^+$  Konzentrationsgradienten sezerniert. Dadurch macht der durch eine  $\text{V-H}^+$ -ATPase energetisierte aktive  $\text{K}^+$ -Transport in diesen Systemen Sinn.

Der DA-induzierte  $[\text{Na}^+]_i$ -Anstieg in den Ausführungsgängen ist, wie oben beschrieben, das Ergebnis einer  $\text{Na}^+$ -Resorption an der apikalen Membran in Abhängigkeit von der Anwesenheit eines Primärspeichel im Ausführungslumen. Durch diese Erkenntnis ist auch der Mechanismus des DA-induzierten  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiegs in den Ausführungsgängen besser zu verstehen. Wie bereits in Kap. 4.1 erklärt, ist die Ursache dafür die Umkehr eines basolateral lokalisierten NCE in den  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx-Modus als Folge des  $[\text{Na}^+]_i$ -Anstiegs. Dementsprechend ist ähnlich wie der  $[\text{Na}^+]_i$ -Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg nur zu beobachten, wenn die Acini vorhanden sind und somit die Bildung eines Primärspeichels erfolgen kann. Daran anschließend ist der DA-induzierte  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg deshalb NKCC-abhängig, da der NKCC in den P-Zellen eine kardinale Rolle bei der Primärspeichelbildung besitzt. Der DA-induzierte  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg ist also eine Folge der Speichelmodifikation in den Ausführungsgängen.

Wie für andere  $\text{Na}^+$ -resorbierende Epithelen ist auch für die Ausführungsgänge der Speicheldrüse von *P. americana* anzunehmen, dass die Geschwindigkeit des  $\text{Na}^+$ -Influx auf der apikalen Seite (hier ENaC) mit der Geschwindigkeit des  $\text{Na}^+$ -Efflux

auf der basolateralen Seite (hier  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ ) abgestimmt ist. Dabei ist vor allem die Regulation des  $\text{Na}^+$ -Influx-Mechanismus entscheidend. In den Ausführungsgängen der Speicheldrüse der Maus erfolgt die  $\text{Na}^+$ -Resorption auch überwiegend durch einen Amilorid-sensitiven  $\text{Na}^+$ -Kanal, dessen Aktivität nicht durch luminales  $\text{Na}^+$ , aber durch  $[\text{Na}^+]_i$  und  $[\text{Cl}^-]_i$  beeinflusst wird. Der  $\text{Na}^+$ -Kanal wird dabei bei einem Anstieg von  $[\text{Na}^+]_i$  und  $[\text{Cl}^-]_i$  herunterreguliert, was über aktivierte  $G_o$ - bzw.  $G_i$ -Proteine vermittelt wird (COOK *et al.* 1998). Andererseits wurde auch postuliert, dass ein  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg die negative Rückkopplung der  $\text{Na}^+$ -Resorption vermittelt. Evidenzen hierfür liegen für das Sammelrohr der Niere und die Harnblase vor, in denen die  $\text{Na}^+$ -Resorption auch über apikale  $\text{Na}^+$ -Kanäle erfolgt. Das Erhöhen der  $[\text{Na}^+]_i$  durch die Hemmung der basolateralen  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  mit Ouabain reduziert die  $\text{Na}^+$ -Resorption. Auch in  $\text{Na}^+$ -freier Ringerlösung kann dieser Effekt beobachtet werden, was auf einen Einfluss des basolateralen  $\text{Na}^+$  Konzentrationsgradienten hindeutet. Die Applikation von Ouabain erhöht zudem  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . In  $\text{Ca}^{2+}$ -freier Ringerlösung ist die Ouabain-vermittelte Reduktion der  $\text{Na}^+$ -Resorption dagegen nicht zu beobachten (CHASE & AL-AWQATI 1981, BREYER 1991, SILVER *et al.* 1993). Man geht davon aus, dass durch die  $\text{Na}^+$ -Resorption die  $[\text{Na}^+]_i$  steigt und den NCE in den  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx-Modus umkehrt, was zu einem  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg und nachfolgend zu einer direkten oder indirekten Hemmung der  $\text{Na}^+$ -Resorption führt (TAYLOR & WINDHAGER 1979). Auch in den Ausführungsgängen der Speicheldrüse von *P. americana* wird auf diese Weise ein graduerter  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg generiert. Dessen mögliche Funktion könnte auch hier die Regulation der  $\text{Na}^+$ -Resorption sein, was aber zunächst nur hypothetisch und in weiteren Untersuchungen zu klären ist.

Die Mechanismen der DA-induzierten intrazellulären Ansäuerung in den Ausführungsgängen isolierter Loben sind dagegen aus der vorhandenen Datenlage weitaus schwieriger erklärbar. Ganz offensichtlich hängt die DA-induzierte starke intrazelluläre Ansäuerung in den Ausführungsgängen mit der Speichelmodifikation zusammen, da die Ansäuerung nur in Anwesenheit der Acini zu beobachten war. Dafür spricht auch, dass die Hemmung der  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ , die die Speichelmodifikation energetisiert, die DA-induzierte Ansäuerung unterdrückte (Abb. 3.17). In dieser Arbeit erfolgten Simultanmessungen von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  und  $[\text{Na}^+]_i$  sowie von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  und  $\text{pH}_i$  in den Ausführungsgängen. Es konnte gezeigt werden, dass

der DA-induzierte  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg in den Ausführungsgängen nicht die Ursache für die DA-induzierte intrazelluläre Ansäuerung in den Ausführungsgängen war, da die  $pH_i$ -Änderung der  $[Ca^{2+}]_i$ -Änderung zeitlich um ca. 49 s vorausging (Abb. 3.18). Andernfalls hätte der  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg z. B. eine  $Ca^{2+}$ - $H^+$ -ATPase aktivieren können, die  $Ca^{2+}$  gegen  $H^+$  aus der Zelle entfernt (SCHWIENING *et al.* 1993). Weiterhin zeigte sich, dass der  $[Na^+]_i$ -Anstieg dem  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg zeitlich um ca. 60 s vorausging (Abb. 3.4B). Es kann demnach zeitlich möglich sein, dass der  $[Na^+]_i$ -Anstieg die Voraussetzung für die  $pH_i$ -Änderung ist. Ein Prozess der Speichelmodifikation ist die Sekretion von  $HCO_3^-$ , wie sie für isolierte Ausführungsgänge ohne Acini postuliert wurde (Kap. 4.3.1). Durch die Aktivität der Carboanhydrase in den Ausführungszellen wird dabei  $HCO_3^-$  bereitgestellt. Die dabei zusätzlich anfallenden Protonen könnten die Ansäuerung bewirken, während  $HCO_3^-$  ins Lumen abgegeben wird. Gegen diese Hypothese spricht aber, dass die Hemmung der Carboanhydrase allein die DA-induzierte Ansäuerung in den Ausführungsgängen isolierter Loben nicht beeinflusste. Die Modifikation des Primärspeichels bedeutet aber auch eine erhöhte Stoffwechselaktivität der Ausführungszellen. Das aus dem Stoffwechsel anfallende  $CO_2$  könnte im Endeffekt die intrazelluläre Ansäuerung bewirken. Allein durch die Blockierung der mitochondrialen Aktivität ließe sich die Frage aber nicht klären, da gleichzeitig auch die Aktivität der Acini herabgesetzt und somit kein Primärspeichel im Ausführungslumen vorhanden wäre. Des Weiteren könnte die Ansäuerung auch das Ergebnis eines  $H^+$ -Influx über der basolateralen Membran sein. Erste Experimente deuten aber nicht darauf hin. Die Verringerung der Konzentration an Protonen in der Ringerlösung durch Erhöhung des pH von pH 7,4 auf pH 8,4 hatte nämlich keinen Einfluss auf die DA-induzierte intrazelluläre Ansäuerung in den Ausführungsgängen isolierter Loben ( $n = 5$ , gepaarter  $t$ -Test,  $P > 0,05$ , Daten nicht gezeigt). Zur Klärung der Ursachen der DA-induzierten Ansäuerung ist insbesondere der Einsatz eines Perfusionssystems nützlich, bei dem die Zusammensetzung der luminalen Flüssigkeit kontrolliert werden kann und Hemmstoffe gezielt apikal eingesetzt werden können. Dadurch könnten die Prozesse der Ausführungsgänge ohne Acini untersucht werden, aber gleichzeitig im Ausführungslumen die Bedingungen hergestellt werden, wie sie in Präparationen von isolierten Loben herrschen.

Dagegen konnte eindeutig gezeigt werden, dass an der  $\text{pH}_i$ -Erholung nach DA-induzierter Ansäuerung in Ausführungsgängen isolierter Loben die  $\text{V-H}^+$ -ATPase und  $\text{Na}^+$ -abhängige Transportmechanismen beteiligt sind (Abb. 3.16). Die  $\text{V-H}^+$ -ATPase ist also für die  $\text{pH}_i$ -Homöostase während der Speichelmodifikation mitverantwortlich. Diese Ergebnisse sind zu den Ergebnissen bei Verwendung der  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Vorpuls-Methode konform. Im Gegensatz dazu ist aber der NHE nicht der alleinige  $\text{Na}^+$ -abhängige Transportmechanismus. Während bei der  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -induzierten Ansäuerung die  $\text{pH}_i$ -Erholung durch die Hemmung der  $\text{V-H}^+$ -ATPase und des NHE nahezu vollständig unterdrückt ist, erfolgt nach DA-induzierter Ansäuerung unter gleichen Bedingungen noch eine verlangsamte  $\text{pH}_i$ -Erholung. Erste Tests konnten keinen DIDS-sensitiven Anteil bei der  $\text{pH}_i$ -Erholung nachweisen, was zunächst nicht auf die Beteiligung eines  $\text{Na}^+$ -abhängigen  $\text{HCO}_3^-$ -Transports hinweist. Die Charakterisierung des  $\text{Na}^+$ -abhängigen Anteils der  $\text{pH}_i$ -Erholung erfordert aber weitere Untersuchungen. Aus den hier präsentierten Daten zeigt sich, dass die  $\text{V-H}^+$ -ATPase bei DA-Stimulierung zunächst nicht aktiv ist, aber nach Absetzen von DA für die  $\text{pH}_i$ -Erholung mitverantwortlich ist. Dies könnte die Ursache dafür sein, dass man bei Messungen der ATPase-Aktivität in DA-stimuliertem Gewebehomogenat nur eine geringe  $\text{V-H}^+$ -ATPase-Aktivität nachweisen kann, die sich zudem zu der in unstimuliertem Gewebehomogenat nicht verändert (Tab. 3.2). ZIMMERMANN *et al.* (2003) haben bereits gezeigt, dass man mit dem hier verwendeten Protokoll zur Messung der ATPase-Aktivität Agonist-induzierte Änderungen der  $\text{V-H}^+$ -ATPase-Aktivität nachweisen kann. Vielleicht muss man den Versuchsansatz insofern ändern, als dass man bei den Speicheldrüsen mit DA-Stimulierung diese danach noch kurz in Ringerlösung wäscht, um die Effekte nach einer DA-Stimulierung ( $\text{pH}_i$ -Erholung) zu registrieren. Dann sollte die  $\text{V-H}^+$ -ATPase-Aktivität gegenüber der Kontrolle erhöht sein.

#### 4.3.5 Luminale Regulation der Speichelmodifikation in den Ausführungsgängen

Mehrere Beobachtungen geben einen Hinweis auf einen möglichen Regulationsmechanismus bei der Speichelmodifikation in den Ausführungsgängen der Speicheldrüse von *P. americana*. Zunächst ist die starke intrazelluläre Ansäuerung in den Ausführungsgängen isolierter Loben bei DA- und 5-HT-Stimulierung zu beobachten, obwohl die Ausführungsgänge nur dopaminerg innerviert sind. Auch der

$[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg ist nach DA- und 5-HT-Stimulierung registrierbar, der aber einen  $[Na^+]_i$ -Anstieg und damit einen Prozess der Speichelmodifikation voraussetzt. Zudem konnten RIETDORF *et al.* (2003) beobachten, dass die Zusammensetzung ( $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Cl^-$ ) sowie die Osmolarität der Endspeichel nach DA- und 5-HT-Stimulierung nicht unterschiedlich waren. Man hätte aber erwarten können, dass der DA-stimulierte Speichel in den dopaminergen Ausführungsgängen stärker modifiziert wird. DA und 5-HT bewirken die Primärspeichelbildung in den P-Zellen der Acini, die serotonerg und dopaminerg innerviert sind, aber auch die Speichelmodifikation in den Ausführungsgängen, die nur dopaminerg innerviert sind. Daraus und aus den Erläuterungen zur Generierung der  $pH_i$ -Änderungen in den Ausführungsgängen (siehe oben) ist zu schlussfolgern, dass die Aktivierung der Speichelmodifikation über die apikale Seite des Epithels aktiviert werden könnte. Allein die Anwesenheit von DA- oder 5-HT-induziertem Primärspeichel im Ausführungslumen stimuliert die Ausführungsgänge.

Es ist bekannt, dass der transepitheliale Transport auch durch Agonisten beeinflusst werden kann, die auf der luminalen Seite anwesend sind. So spielen z. B. das Peptid Guanylin oder das Fettsäurederivat Prostaglandin  $E_2$  luminal bei der Regulation des Elektrolyt- und Wassertransports im Darm bzw. im Sammelrohr der Niere eine wesentliche Rolle (FORTE & CURRIE 1995, SAKAIRI *et al.* 1995). Auch extrazelluläre luminale Nukleotide wie ATP sind prominente Regulatoren des transepithelialen Transports (LEIPZIGER 2003). Offensichtliche Beweise dafür wurden in Untersuchungen erbracht, in denen ATP bei badseitiger oder lumenseitiger Applikation unterschiedliche Effekte bewirkte. In Ausführungsgängen des Pancreas von Meerschweinchen z. B. bewirkt die luminale Applikation von ATP eine  $HCO_3^-$ - und Flüssigkeitssekretion, während seine badseitige Applikation beides reduziert (ISHIGURO *et al.* 1999). Nukleotide wirken über purinerge Rezeptoren, die zur Familie der Liganden-gesteuerten Ionenkanäle ( $P_{2X}$  Rezeptoren) oder der G-Protein gekoppelten Rezeptoren ( $P_{2Y}$  Rezeptoren) gehören. Hinweise für die Existenz von purinergen Rezeptoren in der luminalen Membran sind z. B. für Epithelien von Darm, Pancreas, Gallenblase, Niere, Schweißdrüsen und Speicheldrüsen bekannt, wobei die luminale Stimulierung mit Nukleotiden den Ionentransport meistens steigerte (LEIPZIGER 2003).

Für die Prozesse in der Speicheldrüse kann folgendes hypothetisches Modell aufgestellt werden. In einem ersten Schritt wird ATP zusammen mit dem Primärspeichel in den Acini sezerniert. ATP kann dann zusammen mit dem Primärspeichel durch das Ausführungssystem transportiert werden, wo es an luminale purinerge Rezeptoren bindet. Daraufhin kann der Primärspeichel entsprechend modifiziert werden. Somit würde der physiologische Stimulus für die Primärspeichelbildung in den Acini auch seine Modifikation in den Ausführungsgängen direkt regulieren. Dies wäre höchst ökonomisch, da eine Aktivität der Ausführungszellen nur in Anwesenheit von Primärspeichel erfolgen würde und auch nur dann sinnvoll wäre. Zur Funktion von purinergen Rezeptoren bei der Speichelbildung und -modifikation ist aber derzeit nur wenig bekannt. In der Unterkieferspeicheldrüse der Ratte konnten in den Acini und den Ausführungsgängen luminale purinerge Rezeptoren pharmakologisch nachgewiesen werden. Ihre Aktivität führte zu einem  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg und einer Erhöhung der  $Cl^-$ -Leitfähigkeit in der apikalen Membran, was zu einer verstärkten  $Cl^-$ -Sekretion in den Acini sowie einer verstärkten  $Cl^-$ -Resorption in den Ausführungsgängen führte (LEE *et al.* 1997, ZENG *et al.* 1997). LEE *et al.* (1998) konnten zudem bei luminaler ATP-Applikation eine Aktivierung des apikal lokalisierten NHE3 beobachten, der bei der  $Na^+$ -Resorption in den Ausführungsgängen der Rattenspeicheldrüse eine wesentliche Rolle spielt. Die Existenz luminaler purinergischer Rezeptoren lässt aber auch die Frage nach der Herkunft der extrazellulären Nukleotide aufkommen. ATP und andere Nukleotide können durch unspezifische Kanäle, durch Transporter oder durch vesikuläre Freisetzung ins Lumen gelangen (LEIPZIGER 2003). SORENSEN & NOVAK (2001) konnten z. B. die Carbachol-induzierte ATP-Freisetzung aus sekretorischen Vesikeln ins Lumen der Acini des Rattenpancreas fluoreszenzmikroskopisch beobachten. Es wurde zudem vorgeschlagen, dass die Ausführungszellen selbst ATP freisetzen und damit ATP in einer autokrinen oder parakrinen Art und Weise wirkt (ISHIGURO *et al.* 1999). Die Regulation der Speichelmodifikation bei *P. americana* durch Nukleotide *via* purinerge Rezeptoren ist rein hypothetisch und muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden. Da die Ausführungsgänge dopaminerg innerviert sind, wäre auch die koordinierte Wirkung von eventuell luminal wirkenden Nukleotiden und basolateral wirkendem DA zu analysieren.

#### 4.4 Transepithelialer Wassertransport in den Ausführgängen

Während der Speichelmodifikation erfolgt in den Ausführgängen der Speicheldrüse von *P. americana* eine  $\text{Na}^+$ -Rückresorption sowie in geringerem Maße eine  $\text{K}^+$ -Sekretion. Dadurch nimmt die Osmolarität des Endspeichels gegenüber der Osmolarität des Primärspeichels ab. Die Abnahme der Osmolarität des Endspeichels macht eine Wasser-sezernierende Funktion der Ausführgänge unwahrscheinlich. Über die transepithelialen Wasserbewegungen in den Ausführgängen der Speicheldrüse von *P. americana* liegen bisher keine Beobachtungen vor. In dieser Arbeit wurden erstmals isolierte Ausführgänge ohne Acini untersucht. An diesen reduzierten Präparaten konnte eine einfache Methode zur Untersuchung von transepithelialen Wasserbewegungen in den Ausführgängen entwickelt werden. Zur Abgrenzung einer definierten Flüssigkeitssäule im Ausführganglumen dienten zwei in das Lumen injizierte Öltropfen. Als Volumenmarker konnte zusätzlich der Fluoreszenzfarbstoff Sulforhodamin injiziert werden. Veränderungen der Flüssigkeitssäule konnten dann mit Hilfe der DIK- und Fluoreszenzmikroskopie über einen gewissen Zeitraum beobachtet werden. Pilotexperimente lieferten erste Ergebnisse, die Grundlage für weiterführende Studien sein könnten.

Das wichtigste Ergebnis war, dass isolierte Ausführgänge ohne Acini im unstimulierten Zustand kontinuierlich Flüssigkeit aus dem Ausführganglumen resorbieren. Diese Resorption zeigte sich im Schrumpfen der Flüssigkeitssäule sowie in der Zunahme der Fluoreszenzintensität des Volumenmarkers (Abb. 3.32). Kontrolluntersuchungen mit Hilfe der konfokalen Laser-Rastermikroskopie zeigten, dass der injizierte Volumenmarker weder an den Rändern der Öltropfen noch transepithelial aus der Flüssigkeitssäule entwich. Die Flüssigkeitsresorption erfolgte über einen Zeitraum von ca. 20-25 min mit konstanter Geschwindigkeit. In manchen Präparationen nahm sie aber gegen Ende des Versuchs leicht ab. Bei zunehmender Verringerung der zur Flüssigkeitsresorption verfügbaren Kontaktfläche (apikale Membran), wenn die Öltropfen dichter zusammenrücken, ist auch eine Verlangsamung der Flüssigkeitsresorption zu erwarten. In vielen Präparationen blieb bei der Vorwärtsbewegung der Öltropfen zwischen kutikularer Intima des Ausführganglumens und Öltropfen ein Farbstoffrest zurück. Es ist zu vermuten, dass auch in diesem Bereich noch eine Flüssigkeitsresorption erfolgt.



Demnach würde die tatsächliche Kontaktfläche nicht in gleichem Umfang wie das Volumen der Flüssigkeitssäule abnehmen, und die Geschwindigkeit der Resorption über einen großen Zeitraum konstant bleiben.

Ein weiteres wichtiges Ergebnis war, dass die Flüssigkeitsresorption durch die Blockierung der mitochondrialen ATP-Synthese gehemmt werden konnte (Abb. 3.34). Dies zeigt, dass die beobachtete Resorption durch einen aktiven Transportmechanismus energetisiert wird. Die Resorption war demnach ganz offensichtlich kein Artefakt, das aufgrund experimentell erzeugter osmotischer Gradienten hätte verursacht werden können. Bei etwa  $\frac{1}{3}$  der Präparationen konnte dennoch nach 7-10 min langer Applikation von DNP bzw. FCCP und Oligomycin kein Einfluss auf die Flüssigkeitsresorption beobachtet werden. Dies könnte damit zusammenhängen, dass bei den einzelnen Präparationen vor dem Beginn des Versuchs eine gewisse Variabilität in der  $[ATP]_i$  vorlag. Unter derartigen Bedingungen hätten eventuell erst längere Inkubationszeiten mit den Hemmstoffen eine ausreichende Verminderung der  $[ATP]_i$  zur Folge gehabt. Dies war aber nicht möglich, da durch das konstante Schrumpfen der Flüssigkeitssäule nur für einen begrenzten Zeitraum gemessen werden konnte.

Diese ersten Ergebnisse zeigen, dass die so genannte „Öltropfen-Methode“ zur Untersuchung von transepithelialen Flüssigkeitsbewegungen in den Ausführungsgängen der Speicheldrüse von *P. americana* geeignet ist. Die Untersuchung transepithelialer Flüssigkeitsbewegungen mittels optischer Methoden ist nicht ganz neu. Sie erfolgte bereits erfolgreich an anderen Systemen. So verwendeten z. B. ISHIGURO *et al.* (1998) Fluoreszenzbilder des Farbstoffs BCECF-Dextran, der in das Lumen von Ausführungsgängen des Pancreas injiziert wurde, um Agonist-induzierte Veränderungen des luminalen Volumens zu messen. NAKAMOTO *et al.* (2002) konnten die sekretorische Funktion von isolierten Ausführungsgängen der Ohrspeicheldrüse von Ratten zeigen, indem sie eine Agonist-induzierte Abnahme der Sulforhodamin-Fluoreszenz im Ausführungslumen beobachteten. Die Flüssigkeitssekretion im proximalen Tubulus der Niere konnte ebenfalls mit Hilfe einer abgewandelten Öltropfen-Methode beobachtet werden (GRANTHAM *et al.* 1973, BEYENBACH 1986).

Ein transepithelialer Wassertransport erfolgt grundsätzlich passiv entlang eines osmotischen Gradienten, dessen Aufbau Energie benötigt. Dies zeigt sich in der

ATP-Abhängigkeit der Flüssigkeitsresorption in den Ausführungsgängen. Die Identifizierung des ATP-verbrauchenden Transporters war leider bisher nicht möglich. In den Epithelzellen der Ausführungsgänge ist basolateral eine  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase und apikal eine  $\text{V-H}^+$ -ATPase immunzytochemisch nachgewiesen worden (JUST & WALZ 1994c). Zudem besteht eine Funktion der Ausführungsgänge in der  $\text{NaCl}$ -Resorption aus dem Ausführungslumen, die durch die basolaterale  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase energetisiert wird (wie in Kap. 4.3.4 beschrieben). Dieser Ionentransport könnte eine transepitheliale Wasserresorption aus dem Ausführungslumen zur Folge haben. Die pharmakologische Hemmung der  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase oder der  $\text{V-H}^+$ -ATPase oder die kombinierte Hemmung beider Ionentransport-ATPasen hatten in dieser Arbeit jedoch keinen Einfluss auf die Flüssigkeitsresorption (Tab. 3.1). Diese Beobachtung ist schwer interpretierbar, denn diese beiden Ionentransport-ATPasen energetisieren bei Insekten den transepithelialen Transport (WIECZOREK *et al.* 1999, BEYENBACH 2001).

Daraus stellt sich die Frage, ob die verwendeten Hemmstoffe überhaupt wirksam waren. Entgegen anderer Systeme wie z. B. Malpighische Gefäße von *Drosophila*, in denen die  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase nicht durch Ouabain beeinflusst werden kann (TORRIE *et al.* 2004), lässt sich die  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase in der Speicheldrüse von *P. americana* mit 1 mM Ouabain hemmen. So konnten z. B. LANG & WALZ (2001) in den Ausführungsgängen durch 1 mM Ouabain die Erholung von einem DA-induzierten  $[\text{Na}^+]_i$ -Anstieg blockieren. Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten eine Blockierung der DA-induzierten intrazellulären Ansäuerung in den Ausführungsgängen isolierter Loben der Speicheldrüse durch 1 mM Ouabain (Abb. 3.17). Die  $\text{V-H}^+$ -ATPase konnte bereits bei badseitiger Applikation von 1  $\mu\text{M}$  Concanamycin A erfolgreich gehemmt werden und deshalb die  $\text{pH}_i$ -Erholung nach  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -induzierter intrazellulärer Ansäuerung in den Ausführungsgängen verlangsamen (Abb. 3.7).

Die pharmakologische Hemmung der  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase und der  $\text{V-H}^+$ -ATPase war demnach erfolgreich. Dennoch konnten unter diesen Bedingungen keine Effekte auf die Flüssigkeitsresorption beobachtet werden. Dieses könnte bedeuten, dass eine andere Ionentransport-ATPase vorhanden sein muss, die den Aufbau eines osmotischen Gradienten über dem Epithel energetisiert. So gibt es z. B. zahlreiche Studien zum primär aktiven Transport von  $\text{Cl}^-$  ( $\text{Cl}^-$ -ATPase), wenngleich die Evidenzen für die Existenz und funktionelle Rolle einer  $\text{Cl}^-$ -ATPase meistens

indirekt und fragwürdig sind (GERENCSEK & ZHANG 2001). Für diese Hypothese könnten jedoch erste Ergebnisse zur Messung der ATPase-Aktivitäten in der Speicheldrüse von *P. americana* sprechen. Die ATPase-Aktivitäten der  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase und der  $\text{V-H}^+$ -ATPase hatten in Homogenaten ganzer Speicheldrüsen einen Anteil von 92-96 % an der Gesamt-ATPase-Aktivität, wobei die Acini im Homogenat mengenmäßig überwogen. Interessanterweise hatten beide ATPase-Aktivitäten in Homogenaten isolierter Ausführungsgänge ohne Acini nur noch einen Anteil von 68-76 % an der Gesamt-ATPase-Aktivität (Tab. 3.3). Demzufolge verbleibt in den Ausführungsgängen eine nicht identifizierte ATPase-Aktivität, die den nicht unerheblichen Anteil von 24-32 % an der Gesamt-ATPase-Aktivität hat.

Die Flüssigkeitsresorption aus dem Lumen unstimulierter Ausführungsgänge konnte bei Stimulierung mit DA beeinflusst werden. DA induzierte einen transienten Anstieg der Resorption, ehe diese stoppte oder in eine Flüssigkeitssekretion umkehrte (Abb. 3.35). Wie lassen sich diese Ergebnisse in die Funktionsweise der Speicheldrüsen einordnen? Möglicherweise sezernieren die Acini auch im unstimulierten Zustand mit geringerer Rate einen Primärspeichel, der in den Ausführungsgängen mehr oder weniger vollständig resorbiert wird. Diese Annahme ist realistisch, denn WATANABE & MIZUNAMI (2006) haben an Speicheldrüsenerven von *P. americana* eine spontane elektrische Aktivität gemessen. Ob überhaupt eine Speichelsekretion erfolgt, würde durch das Verhältnis von Primärspeichelbildung in den Acini und Resorption in den Ausführungsgängen bestimmt. Tatsächlich zeigen die meisten Speicheldrüsen im unstimulierten Zustand keine Speichelsekretion. Dies trifft auch auf die Speicheldrüse von *P. americana* zu (JUST & WALZ 1996). Einige wenige Speicheldrüsen zeigen auch im unstimulierten Zustand eine spontane Speichelsekretion. Dazu gehören z. B. die Ohrspeicheldrüse des Schafes (COATS & WRIGHT 1957) sowie die Unterzungspeicheldrüse von Hund und Katze (YOSHIMURA *et al.* 1959, KALADELFOS & YOUNG 1973). Die Ursache der spontanen Sekretion liegt in diesen Fällen tatsächlich in ihren relativ inaktiven Ausführungsgängen. Dies zeigt sich auch darin, dass ihr Endspeichel nach Agonist-Stimulierung isoosmotisch ist sowie  $\text{Na}^+$ - und  $\text{K}^+$ -Konzentrationen enthält, die gegenüber denen des Primärspeichels nicht verändert sind (KALADELFOS & YOUNG 1973, COMPTON *et al.* 1980). Für die Speicheldrüse von *P. americana* konnten GUPTA & HALL (1983) keine wesentlichen

Unterschiede in der Zusammensetzung des Primärspeichels ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  und  $\text{Cl}^-$ ) im unstimulierten Zustand bzw. nach DA-Stimulierung beobachten, was auf eine Aktivität der Acini auch im unstimulierten Zustand hindeutet. Zudem war die NaCl-Resorption in den Ausführungsgängen im unstimulierten Zustand stärker als nach DA-Stimulierung. Dieses deutet ebenfalls darauf hin, dass die Ausführungsgänge auch im unstimulierten Zustand aktiv sind. Ursache für die unterschiedlich starke Resorption ist ihre Abhängigkeit von der Sekretionsrate. Bei starkem Speichelfluss, wie z. B. nach DA-Stimulierung, ist die Kontaktzeit des Speichels am Ausführungsepithel verkürzt, so dass die Konzentration von  $\text{K}^+$  im Endspeichel sinkt, während die Konzentration von  $\text{Na}^+$  steigt (MANGOS *et al.* 1973). Diese Abhängigkeit der  $\text{Na}^+$  Konzentration im Endspeichel von der Sekretionsrate wurde auch für die Speicheldrüse der Schabe *N. cinerea* beobachtet (SMITH & HOUSE 1979), konnte jedoch von RIETDORF (2003) für *P. americana* nicht bestätigt werden. Es ist zu vermuten, dass viele Speicheldrüsen, möglicherweise auch die von *P. americana*, eine spontane Sekretion in den Acini zeigen. Dieser Primärspeichel wird aber durch die Aktivität der Ausführungsgänge vollständig resorbiert.

Acinöse Zellen besitzen in ihrer apikalen Membran Aquaporine, die eine wesentliche Rolle bei der Primärspeichelbildung spielen (MELVIN *et al.* 2005). So konnte z. B. gezeigt werden, dass die Deletion des für das Aquaporin AQP5 codierenden Gens bei der Mausspeicheldrüse zu einer drastischen Verringerung der Wasserpermeabilität der acinösen Zellen sowie zu einer verminderten Flüssigkeitssekretion führt (MA *et al.* 1999, KRANE *et al.* 2001). Die Ausführungsgänge von Speicheldrüsen besitzen dagegen im Allgemeinen nur eine geringe Permeabilität für Wasser (COOK *et al.* 1994). Deshalb kann nur bei geringen Sekretionsraten mit hoher Kontaktzeit des Speichels am Ausführungsepithel eine signifikante Resorption erfolgen. Bei DA-Stimulierung nimmt die Rate der Flüssigkeitssekretion in der Speicheldrüse von *P. americana* zu (JUST & WALZ 1996). Dies könnte die Ursache dafür sein, dass die Resorption unter diesen Bedingungen nur noch transient steigt, ehe sie stoppt bzw. in eine Sekretion in das Ausführungslumen umkehrt. Dieses ist sinnvoll, da der in den Acini gebildete Primärspeichel nicht resorbiert, sondern in den Verdauungstrakt abgegeben werden soll.

Die genaue funktionelle Rolle der DA-induzierten Veränderungen der transepithelialen Wasserbewegungen in den Ausführgängen ist in weiterführenden Untersuchungen zu klären. Hierzu sind unter anderem Experimente zu planen, in denen der osmotische Gradient durch unterschiedliche Ringerlösungen auf der Badseite sowie luminalen Seite systematisch variiert werden kann.

#### 4.5 Ausblick

Diese Arbeit trug zur Kenntnis der komplexen Funktionsweise von Speicheldrüsen in Insekten bei und erweiterte das lückenhafte Wissen über die zellulären Wirkungen biogener Amine in Insekten. So konnten einerseits Transportmechanismen in den P-Zellen der Acini bei der Primärspeichelbildung, andererseits aber auch Mechanismen bei der Speichelmodifikation in den Ausführgängen der Speicheldrüse von *P. americana* identifiziert werden.

Zur weiteren Untersuchung der funktionellen Rolle der Ausführgänge ist die Entwicklung eines Perfusionssystems hilfreich, wodurch die Zusammensetzung der luminalen Flüssigkeit ohne die Anwesenheit der Acini kontrolliert werden kann. Dadurch kann mit Hilfe pharmakologischer Experimente die Charakterisierung apikal lokalisierter Transportproteine erfolgen und z. B. die bisher unbekannt Transportwege von Anionen wie  $\text{Cl}^-$  und  $\text{HCO}_3^-$  aufgeklärt werden. Zudem kann so überprüft werden, ob die Aktivierung der Speichelmodifikation in den Ausführgängen durch luminale Agonisten über in der apikalen Membran lokalisierte Rezeptoren erfolgt.

Die Speichelsekretion steht unter neuronaler Kontrolle. In elektrophysiologischen Studien ist zu klären, welche physiologischen Prozesse bei einer elektrischen Stimulierung von intakten Nerv-Speicheldrüsenpräparationen ablaufen und inwiefern sich diese von den Prozessen unterscheiden, die bei Stimulierung isolierter Speicheldrüsen mit Agonisten auftreten. DA und 5-HT sind zudem anscheinend nicht die einzigen bei der Speichelsekretion beteiligten Neurotransmitter, da der Neurotransmitter des SN2-Neurons des Speichelgangnervs bisher noch unbekannt, aber weder DA noch 5-HT ist (BAUMANN *et al.* 2004).

Weiterhin würde die umfassende Charakterisierung der biogenen Amin-Rezeptoren in der Speicheldrüse von *P. americana* die physiologischen

Untersuchungen unterstützen und ergänzen. So sind etwa die exakte Lokalisation der Rezeptoren in den verschiedenen Zelltypen sowie die an sie gekoppelten intrazellulären Signalwege zu untersuchen und eine Korrelation mit den physiologisch erhobenen Daten zu prüfen. Erste cDNA-Sequenzen biogener Amin-Rezeptoren konnten dazu bereits mittels molekularbiologischer Methoden charakterisiert werden (WALZ *et al.* 2006).

## 5 Literaturverzeichnis

- AHN, W., KIM, K.H., LEE, J.A. *et al.* (2001). Regulatory interaction between the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and  $\text{HCO}_3^-$  salvage mechanisms in model systems and the mouse pancreatic duct. *J Biol Chem* **276**: 17236-17243.
- ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J. *et al.* (1994). Molecular biology of the cell. Garland Publishing, New York.
- ALI, D.W., ORCHARD, I. (1995). The uptake and release of serotonin and dopamine associated with locust (*Locusta migratoria*) salivary glands. *J Exp Biol* **199**: 699-709.
- AMBUDKAR, I.S. (2000). Regulation of calcium in salivary gland secretion. *Crit Rev Oral Biol Med* **11**: 4-25.
- BAUMANN, A., BLENAU, W., ERBER, J. (2003). Biogenic amines. In: Encyclopedia of Insects, Eds. RESH, V.H., CARDÉ, R.T., Academic Press, San Diego.
- BAUMANN, O., WALZ, B. (1989). Calcium- and inositol polyphosphate-sensitivity of the calcium-sequestering endoplasmic reticulum in the photoreceptor of the honeybee drone. *J Comp Physiol A* **165**: 627-636.
- BAUMANN, O., DAMES, P., KÜHNEL, D. *et al.* (2002). Distribution of serotonergic and dopaminergic fibers in the salivary gland complex of the cockroach *Periplaneta americana*. *BMC Physiology* **2**: 9-23.
- BAUMANN, O., KÜHNEL, D., DAMES, P. *et al.* (2004). Dopaminergic and serotonergic innervation of the cockroach salivary glands: distribution and morphology of synapses and release sites. *J Exp Biol* **207**: 2565-2575.
- BAYLOR, S.M., HOLLINGWORTH, S. (2000). Measurements and interpretation of cytoplasmic  $[\text{Ca}^{2+}]$  signals from calcium-indicator dyes. *News Physiol Sci* **15**: 19-26.

- BERRIDGE, M.J. (1988). Inositol trisphosphate-induced membrane potential oscillations in *Xenopus* oocytes, *J Physiol* **403**: 589-599.
- BERRIDGE, M.J. (1993). Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* **361**: 315-325.
- BERRIDGE, M.J. (1997). The AM and FM of calcium signalling. *Nature* **386**: 759-760.
- BERRIDGE, M.J., LIPP, P., BOOTMAN, M.D. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**: 11-21.
- BERTRAM, G., WESSING, A. (1994). Intracellular pH regulation by the plasma membrane V-ATPase in Malpighian tubules of *Drosophila* larvae. *J Comp Physiol B* **164**: 238-246.
- BEYENBACH, K.W. (1986). Secretory NaCl and volume flow in renal tubules. *Am J Physiol* **250**: 753-763.
- BEYENBACH, K. W. (2003). Transport mechanisms of diuresis in Malpighian tubules of insects. *J Exp Biol* **206**: 3845-3856.
- BEYENBACH, K.W., WIECZOREK, H. (2006). The V-type H<sup>+</sup>-ATPase: molecular structure and function, physiological roles and regulation. *J Exp Biol* **209**: 577-589.
- BEZPROZVANNY, I., WATRAS, J., EHRLICH, B.E. (1991). Bell-shaped calcium-response curves of Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>- and calcium-gated channels from endoplasmic reticulum of cerebellum. *Nature* **351**: 751-754.
- BLAUSTEIN, M.P., LEDERER, W.J. (1999). Sodium/calcium exchange: Its physiological implications. *Physiol Rev* **79**: 763-854.
- BLEICH, M., KÖTTGEN, M., SCHLATTER, E. *et al.* (1995). Effects of NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/NH<sub>3</sub> on cytosolic pH and the K<sup>+</sup> channels of freshly isolated cells from the thick ascending limb of Henle's loop. *Pflügers Arch* **429**: 345-354.
- BLENAU, W., BAUMANN, A. (2001). Molecular and pharmacological properties of insect biogenic amine receptors: Lessons from *Drosophila melanogaster* and *Apis mellifera*. *Arch Insect Biochem Physiol* **48**: 13-38.
- BONTING, S.L., SIMON, K.A., HAWKINS, N.M. (1961). Studies on sodium-potassium-activated adenosinetriphosphatase. I. Quantitative distribution in several tissues of the cat. *Arch Biochem Biophys* **95**:416-423.
- BOOTMAN, M.D., COLLINS, T.J., PEPPIATT C.M. *et al.* (2001). Calcium signalling – an overview. *Cell Dev Biol* **12**: 3-10.



- BORON, W.F. (1986). Intracellular pH regulation in epithelial cells. *Ann Rev Physiol* **48**: 377-388.
- BORON, W.F. (2001). Sodium-coupled bicarbonate transporters. *J Pancreas* **2**: 176-181.
- BORON, W.F. (2004). Regulation of intracellular pH. *Adv Physiol Educ* **28**: 160-179.
- BORON, W.F., DE WEER, P. (1976). Intracellular pH regulation in squid giant axons caused by CO<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub>, and metabolic inhibitors. *J Gen Physiol* **67**: 91-112.
- BORZAK, S., REERS, M., ARRUDA, J. *et al.* (1992). Na<sup>+</sup> efflux mechanisms in ventricular myocytes: measurement of [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub> with Na<sup>+</sup>-binding benzofuran isophthalate. *Am J Physiol* **263**: 866-874.
- BOUDKO, D.Y., MOROZ, L.L., HARVEY, W.R. *et al.* (2001). Alkalinization by chloride/bicarbonate pathway in larval mosquito midgut. *Proc Natl Acad Sci* **98**: 15354-15359.
- BOWMAN, E.J., SIEBERS, A., ALTENDORF, K. (1988). Bafilomycins: a class of inhibitors of membrane ATPases from microorganisms, animal cells, and plant cells. *Proc Natl Acad Sci* **85**: 7972-7976.
- BOWSER-RILEY, F., HOUSE, C.R. (1976). The actions of some putative neurotransmitters on the cockroach salivary gland. *J Exp Biol* **64**: 665-676.
- BOYARSKY, G., HANSEN, C., CLYNE, L.A. (1996). Superiority of in vitro over in vivo calibrations of BCECF in vascular smooth muscle cells. *FASEB J* **10**: 1205-1212.
- BREYER, M.D. (1991). Feedback inhibition of cyclic adenosine monophosphate-stimulated Na<sup>+</sup> transport in the rabbit cortical collecting duct via Na<sup>+</sup>-dependent basolateral Ca<sup>++</sup> entry. *J Clin Invest* **88**: 1502-1510.
- BROKL, O.H., MARTINEZ, C.L., SHUPRISHA, A. *et al.* (1998). Regulation of intracellular pH in proximal tubules of avian long-looped mammalian-type nephrons. *Am J Physiol* **274**: 1526-1535.
- BROWN, G.K. (2000). GLUCOSE transporters: structure, function, and consequences in deficiency. *J Inherit Metab Dis* **23**: 237-246.
- CABANTCHIK, Z.I., GREGER, R. (1992). Chemical probes for anion transporters of mammalian cell membranes. *Am J Physiol* **262**: 803-827.

- CALONGE, M.L., ILUNDAIN, A.A. (1998). HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-dependent ion transport systems and intracellular pH regulation in colonocytes from the chick. *Biochim Biophys Acta* **1371**: 232-240.
- CAPLAN, M.J. (1997). Ion pumps in epithelial cells: sorting, stabilization, and polarity. *Am J Physiol* **272**: 1304-1313.
- CEREJIDO, M., VALDÉS, J., SHOSHANI, L. *et al.* (1998). Role of tight junctions in establishing and maintaining cell polarity. *Annu Rev Physiol* **60**: 161-177.
- CHASE, H.S., AL-AWQATI, Q. (1981). Regulation of the sodium permeability of the luminal border of toad bladder by intracellular sodium and calcium. *J Gen Physiol* **77**: 693-712.
- CHU, S., MONTROSE, M.H. (1997). Transepithelial SCFA fluxes link intracellular and extracellular pH regulation of mouse colonocytes. *Comp Biochem Physiol A* **118**: 403-405.
- CLARKE, L.L., HARLINE, M.C. (1998). Dual role of CFTR in cAMP-stimulated HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> secretion across murine duodenum. *Am J Physiol* **274**: 718-726.
- COATS, D.A., WRIGHT, R.D. (1957). Secretion by the parotid gland of the sheep: the relationship between salivary flow and composition. *J Physiol* **135**: 611-622.
- COMPTON, J.S., NELSON, J., WRIGHT, R.D. *et al.* (1980). A micropuncture investigation of electrolyte transport in the parotid glands of sodium-replete and sodium-depleted sheep. *J Physiol* **309**: 429-446.
- COOK, D.I., VAN LENNEP, E.W., ROBERTS, M.L. *et al.* (1994). Secretion by the major salivary glands. In: Physiology of the gastrointestinal tract. Ed. JOHNSON, L.R., Raven press, New York.
- COOK, D.I., DINUDOM, A., KOMWATANA, P. *et al.* (1998). Control of Na<sup>+</sup> transport in salivary duct epithelial cells by cytosolic Cl<sup>-</sup> and Na<sup>+</sup>. *Eur J Morphol* **36**: 67-73.
- COWLEY, E.A., SELLERS, M.C., ILLSLEY, N.P. (2005). Intracellular pH homeostasis in cultured human placental syncytiotrophoblast cells: recovery from acidification. *Am J Physiol* **288**: 891-898.
- CRAWFORD, K.M., STUENKEL, E.L., ERNST, S.A. (1991). Agonist-induced frequency modulation of Ca<sup>2+</sup> oscillations in salt gland secretory cells. *Am J Physiol* **261**: 177-184.

- DAMES, P., ZIMMERMANN, B., SCHMIDT, R. et al. (2006). cAMP regulates plasma membrane vacuolar-type H<sup>+</sup>-ATPase assembly and activity in blowfly salivary glands. *Proc Natl Acad Sci* **103**: 3926-3931.
- DEHAYE, J.P., TURNER, R.J. (1991). Isolation and characterization of rat submandibular intralobular ducts. *Am J Physiol* **261**: 490-496.
- DEITMER, J.W. (1992). Bicarbonate-dependent changes of intracellular sodium and pH in identified leech glial cells. *Pflügers Arch* **420**: 584-589.
- DEITMER, J.W., SCHNEIDER, H.-P. (1998). Acid/base transport across the leech giant glial cell membrane at low external bicarbonate concentration. *J Physiol* **512**: 459-469.
- DENNISS, A.R., YOUNG, J.A. (1975). The action of neurotransmitter hormones and analogues and cyclic nucleotides and theophylline and electrolyte transport by the excretory duct of the rabbit mandibular gland. *Pflügers Arch* **357**: 77-89.
- DIARRA, A., SHELDON, C., CHURCH, J. (2001). In situ calibration and [H<sup>+</sup>] sensitivity of the fluorescent Na<sup>+</sup> indicator SBFI. *Am J Physiol* **280**: 1623-1633.
- DISSING, S., NAUNTOFTE, B. (1990). Na<sup>+</sup> transport properties of isolated rat parotid acini. *Am J Physiol* **259**: 1044-1055.
- DOLMETSCH, R.E., LEWIS, R.S., GOODNOW C.C. et al. (1997). Differential activation of transcription factors induced by Ca<sup>2+</sup> response amplitude and duration. *Nature* **386**: 855-858.
- DONG, H., SELLERS, Z.M., SMITH A. et al. (2005). Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange regulates Ca<sup>2+</sup>-dependent duodenal mucosal ion transport and HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> secretion in mice. *Am J Physiol* **288**: 457-465.
- DRÖSE, S., BINDSEIL, K.U., BOWMAN, E.J. et al. (1993). Inhibitory effect of modified bafilomycins and concanamycins on P- and V-type adenosine triphosphatases. *Biochemistry* **32**: 3902-3906.
- DRÖSE, S., ALTENDORF, K. (1997). Bafilomycins and concanamycins as inhibitors of V-ATPases and P-ATPases. *J. Exp. Biol.* **200**: 1-8.
- EVANS, R.L., PERROTT, M.N., LAU, K.R. et al. (1996). Elevation of intracellular cAMP by noradrenaline and vasoactive intestinal peptide in striated ducts isolated from the rabbit mandibular salivary gland. *Arch Oral Biol* **41**: 689-694.

- EVANS, R.L., TURNER, R.J. (1997). Upregulation of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> cotransporter activity in rat parotid acinar cells by muscarinic stimulation. *J Physiol* **499**: 351-359.
- EVANS, R.L., PARK, K., TURNER, R.J. *et al.* (2000). Severe impairment of salivation in Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/2Cl<sup>-</sup> cotransporter (NKCC1)-deficient mice. *J Biol Chem* **275**: 26720-26726.
- FEWTRELL, C. (1993). Ca<sup>2+</sup> oscillations in non-excitabile cells. *Annu Rev Physiol* **55**: 427-454.
- FLOYD, C.L., GORIN, F.A., LYETH, B.G. (2005). Mechanical strain injury increases intracellular sodium and reverses Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange in cortical astrocytes *GLIA* **51**: 35-46.
- FORTE, L.R., CURRIE, M. (1995). Guanylin: a peptide regulator of epithelial transport. *FASEB J* **9**: 643-650.
- GARTY, H., PALMER, L. (1997). Epithelial sodium channels: function, structure, and regulation. *Physiol Rev* **77**: 359-396.
- GERENCSEK, G.A., ZHANG, J. (2001). Cl<sup>-</sup>-ATPases: Novel primary active transporters in biology. *J Exp Zool* **289**: 215-223.
- GIANNAKOU, M.E., DOW, G.A.T. (2001). Characterization of *Drosophila melanogaster* alkali-metal/proton exchanger (NHE) gene family. *J Exp Biol* **204**: 3703-3716.
- GIFFORD, A.N., NICHOLSON, R.A., PITMAN, R.M. (1991). The dopamine and 5-hydroxytryptamine content of locust and cockroach salivary neurons. *J Exp Biol* **161**: 405-414.
- GINSBORG, B.L., HOUSE, C.R., MITCHELL, M.R. (1980a). On the role of calcium in the electrical responses of cockroach salivary gland cells to dopamine. *J Physiol* **303**: 325-335.
- GINSBORG, B.L., HOUSE, C.R., MITCHELL, M.R. (1980b). A calcium-readmission response recorded from *Nauphoeta* salivary gland acinar cells. *J Physiol* **304**: 437-447.
- GLYNN, I.M. (1957). The action of cardiac glycosides on sodium and potassium movements in human red cells. *J Physiol* **136**: 148-173.
- GOLDMAN, W.F., YAROWSKY, P.J., JUHASZOVA, M. *et al.*, (1994). Sodium/calcium exchange in rat cortical astrocytes. *J Neurosci* **14**: 5834-5843.

- GOLOVINA, V.A., SONG, H., JAMES P.F. *et al.* (2003). Na<sup>+</sup> pump  $\alpha_2$ -subunit expression modulates Ca<sup>2+</sup> signalling. *Am J Physiol* **284**: 475-486.
- GRANGER, D., MARSOLAIS, M., BURRY, J. *et al.* (2002). V-type H<sup>+</sup>-ATPase in the human eccrine sweat duct: immunolocalization and functional demonstration. *Am J Physiol* **282**: 1454-1460.
- GRANGER, D., MARSOLAIS, M., BURRY, J. *et al.* (2003). Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchangers in the human eccrine sweat duct. *Am J Physiol* **285**: 1047-1058.
- GRANTHAM, J.J., IRWIN, R.L., QUALIZZA, P.B. *et al.* (1973). Fluid secretion in isolated proximal straight renal tubules. *J Clin Invest* **52**: 2441-2450.
- GRAY, D.C., HOUSE, C.R. (1982). The influence of calcium on the control of fluid secretion in the cockroach salivary gland. *Quart J Exp Physiol* **67**: 639-654.
- GRAY, D.C., GINSBORG, B.L., HOUSE, C.R. (1984). Cyclic AMP as a possible mediator of dopamine stimulation of cockroach gland cells. *Quart J Exp Physiol* **69**: 171-186.
- GREWE, C.W., KEBABIAN, J.W. (1982). Dopamine stimulates production of cAMP by the salivary gland of the cockroach, *Nauphoeta cinerea*. *Cell Mol Neurobiol* **2**: 65-69.
- GUPTA, B.J., HALL, T.A. (1983). Ionic distribution in dopamine-stimulated NaCl fluid-secreting cockroach salivary glands. *Am J Physiol* **244**: 176-186.
- HASSELBLATT, P., WARTH, R., SCHULZ-BALDES, A., *et al.* (2000). pH regulation in isolated in vitro perfused rat colonic crypts. *Pflügers Arch* **441**: 118-124.
- HAYASHI, H., SUZUKI, Y. (1998). Regulation of intracellular pH during H<sup>+</sup>-coupled oligopeptide absorption in enterocytes from guinea-pig ileum. *J Physiol* **511**: 573-586.
- HEITZMANN, D., WARTH, R., BLEICH, M. *ET AL.* (2000). Regulation of the Na<sup>+</sup>2Cl<sup>-</sup>K<sup>+</sup> cotransporter in isolated rat colon crypts. *Pflügers Arch* **439**: 378-384.
- HINATA, M., KIMURA, J. (2004). Forefront of Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger studies: Stoichiometry of cardiac Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger; 3:1 or 4:1? *J Pharmacol Sci* **96**: 15-18.
- HOUSE, C.R. (1980). Physiology of invertebrate salivary glands. *Biol Rev* **55**: 417-473.
- HOUSE, C.R., GINSBORG, B.L. (1985). Salivary Gland. In: *Comprehensive Insect Physiology and Pharmacology*, Eds. KERKUT, G.A., GILBERT, L.I., Pergamon Press, Oxford.

- HOUSE, C.R., SMITH, R.K. (1978). On the receptors involved in the nervous control of salivary secretion by *Nauphoeta cinerea* Oliver. *J Physiol* **279**: 457-471.
- IINO, M. (1990). Biphasic  $\text{Ca}^{2+}$  dependence of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca release in smooth muscle cells of the guinea pig taenia caeci. *J Gen Physiol* **95**: 1103-1122.
- ISHIGURO, H., NARUSE, S., STEWARD, M.C. *et al.* (1998). Fluid secretion in interlobular ducts isolated from guinea-pig pancreas. *J Physiol* **511**: 407-422.
- ISHIGURO, H., NARUSE, S., KITAGAWA, M. *et al.* (1999). Luminal ATP stimulates fluid and  $\text{HCO}_3^-$  secretion in guinea-pig pancreatic duct. *J Physiol* **591**: 551-558.
- ISHIGURO, H., KITAGAWA, M., NARUSE, S. *et al.* (2000).  $\text{CO}_2$  permeability and bicarbonate transport in microperfused interlobular ducts isolated from guinea-pig pancreas. *J Physiol* **528**: 305-315.
- JENSEN, A.M., CHIU, S.Y. (1990). Fluorescence measurements of changes in intracellular calcium induced by excitatory amino acids in cultured cortical astrocytes. *J Neurosci* **10**: 1165-1175.
- JUST, F., WALZ, B. (1994a). Salivary glands of the cockroach, *Periplaneta americana*: new data from light and electron microscopy. *J Morphol* **220**: 35-46.
- JUST, F., WALZ, B. (1994b). Localization of carbonic anhydrase in the salivary glands of the cockroach, *Periplaneta americana*. *Histochem* **102**: 217-277.
- JUST, F., WALZ, B. (1994c). Immunocytochemical localization of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase and  $\text{V-H}^+$ -ATPase in the salivary gland of the cockroach, *Periplaneta americana*. *Cell Tissue Res* **278**: 161-170.
- JUST, F., WALZ, B. (1996). The effects of serotonin and dopamine on salivary secretion by isolated cockroach salivary glands. *J Exp Biol* **199**: 407-413.
- KALADELFOS, G., YOUNG, J.A. (1973). Micropuncture and cannulation study of water and electrolyte excretion in the isotonic-secreting cat sublingual salivary gland. *Pflügers Arch* **341**: 143-154.
- KAUFFMAN, R.F., TAYLOR, R.W., PFEIFFER, D.R. (1980). Cation transport and specificity of ionomycin. *J Biol Chem* **255**: 2735-2739.
- KESSEL, R.G., BEAMS, H.W. (1963). Electron microscope observations on the salivary gland of the cockroach, *Periplaneta americana*. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* **59**: 857-877.

- KIRISCHUK, S., KETTENMANN, H., VERKHRATSKY, A. (1997). Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger modulates kainite-triggered Ca<sup>2+</sup> signaling in Bergmann glial cells in situ. *FASEB J* **11**: 566-572.
- KNAUF, H., LUBCKE, R., KREUTZ, W. *et al.* (1982). Interrelationships of ion transport in rat submaxillary duct epithelium. *Am J Physiol* **242**: 132-139.
- KNUST, B. (2002). Regulation of epithelial cell shape and cell polarity by cell-cell adhesion (review). *Mol Membr Biol* **19**: 113-120.
- KRANE, C.M., MELVIN, J.E., NGUYEN, H-V. *et al.* (2001). Salivary acinar cells from aquaporin 5-deficient mice have decreased membrane water permeability and altered cell volume regulation. *J Biol Chem* **276**: 23413-23420.
- KWAN, C.Y., TAKEMURA, H., OBIE, J.F. *et al.* (1990). Effects of MeCh, thapsigargin, and La<sup>3+</sup> on plasmalemmal and intracellular Ca<sup>2+</sup> transport in lacrimal acinar cells. *Am J Physiol* **258**: 1006-1015.
- LANG, I, WALZ, B. (1999). Dopamine stimulates salivary duct cells in the cockroach *Periplaneta americana*. *J Exp Biol* **202**: 729-738.
- LANG, I, WALZ, B. (2001). Dopamine-induced epithelial K<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> movements in the salivary ducts of *Periplaneta americana*. *J Insect Physiol* **47**: 465-474.
- LEE, M.G., ZENG, W., MUALLEM, S. (1997). Characterization and localization of P<sub>2</sub> receptors in rat submandibular gland acinar and duct cells. *J Biol Chem* **272**: 32951-32955.
- LEE, M.G., SCHULTHEIS, P.J., YAN, M. *et al.* (1998). Membrane-limited expression and regulation of Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchanger isoforms by P<sub>2</sub> receptors in the rat submandibular gland duct. *J Physiol* **513**: 341-357.
- LEE, M.G., CHOI, J.Y., LUO, X. *et al.* (1999). Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator regulates luminal Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchange in mouse submandibular and pancreatic ducts. *J Biol Chem* **274**: 14670-14677.
- LEE, J.E., NAM, J.H., KIM, S.J. (2005). Muscarinic activation of Na<sup>+</sup>-dependent ion transporters and modulation by bicarbonate in rat submandibular gland acini. *Am J Physiol* **288**: 822-831.
- LEIPZIGER, J. (2003). Control of epithelial transport via luminal P<sub>2</sub> receptors. *Am J Physiol* **284**: 419-432.
- LENART, B., KINTNER, D.B., SHULL G.E. *et al.* (2004). Na-K-Cl Cotransporter-mediated intracellular Na<sup>+</sup> accumulation affects Ca<sup>2+</sup> signaling in astrocytes in an *in vitro* ischemic model. *J Neurosci* **24**: 9585-9597.

- MA, T., SONG, Y., GILLESPIE, A. *et al.* (1999). Detective secretion of saliva in transgenic mice lacking aquaporin-5 water channels. *J Biol Chem* **274**: 20071-20074.
- MACGLASHAN, D. (1989). Single-cell analysis of Ca<sup>++</sup> changes in human lung mast cells: Graded vs. all-or-nothing elevations after IgE-mediated stimulation. *J Cell Biol* **109**: 123-134.
- MADDRELL, S.H.P., O`DONNELL, M.J. (1992). Insect Malpighian tubules: V-ATPase action in ion and fluid transport. *J Exp Biol* **172**: 417-429.
- MADSHUS, I.H. (1988). Regulation of intracellular pH in eukaryotic cells. *Biochem J* **250**: 1-8.
- MANGANEL, M., TURNER, R.J. (1990). Agonist-induced activation of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange in rat parotid acinar cells is dependent on calcium but not on protein kinase C. *J Biol Chem* **265**: 4284-4289.
- MANGOS, J.A., MCSHERRY, N.R., IRWIN, K. *et al.* (1973). Handling of water and electrolytes by rabbit parotid and submaxillary glands. *Am J Physiol* **225**: 450-455.
- MAREN, T.H. (1967) Carbonic anhydrase: Chemistry, physiology, and inhibition. *Physiol Rev* **47**: 595-781.
- MARG, S., WALZ, B., BLENAU, W. (2004). The effects of dopamine receptor agonists and antagonists on the secretory rate of cockroach (*Periplaneta americana*) salivary glands. *J Insect Physiol* **50**: 821-830.
- MELVIN, J.E. (1999). Chloride channels and salivary gland function. *Crit Rev Oral Biol Med* **10**: 199-209.
- MELVIN, J.E., YULE, D., SHUTTLEWORTH, T. *et al.* (2005). Regulation of fluid and electrolyte secretion in salivary gland acinar cells. *Annu Rev Physiol* **67**: 445-469.
- MITCHELL, M.R., MARTIN, A.R. (1980). An electrophysiological study of the effects of ionophore A23817 on *Nauphoeta* salivary glands. *Quart J Exp Physiol* **65**: 309-320.
- NAGARAJA, T.N., BROOKES, N. (1998). Intracellular acidification induced by passive and active transport of ammonium ions in astrocytes. *Am J Physiol* **274**: 883-891.



- NAKAMOTO, T., HIRONO, C., SUGITA, M. *et al.* (2002). Forskolin-induced clearance of the fluorescent dye sulforhodamine from rat parotid intralobular duct lumen: Visualization of the secretory function under a confocal laser scanning microscope. *J Membr Biol* **190**: 189-196.
- NAUNTOFTE, B. (1992). Regulation of electrolyte and fluid secretion in salivary acinar cells. *Am J Physiol* **263**: 823-837.
- NELSON, W.J. (2003). Epithelial cell polarity from the outside looking in. *News Physiol Sci* **18**: 143-146.
- NETT, W., DEITMER, J.W. (1998). Intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  regulation by the leech giant glial cell. *J Physiol* **507**: 147-162.
- NGUYEN, H. V., STUART-TILLEY, A., ALPER, S. L. *et al.* (2004).  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  exchange is acetazolamide sensitive and activated by a muscarinic receptor-induced  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  increase in salivary acinar cells. *Am. J Physiol* **286**: 312-320.
- NOVAK, I., GREGER, R. (1988). Properties of the luminal membrane of isolated perfused rat pancreatic ducts. *Pflügers Arch* **411**: 546-553.
- O'DONNELL, M.J., DOW, J.A.T., HUESMANN, G.R. *et al.* (1996). Separate control of anion and cation transport in Malpighian tubules of *Drosophila melanogaster*. *J Exp Biol* **199**: 1163-1175.
- OIKE, M., DROOGMANS, G., NILIUS, B. (1994). Amplitude modulation of  $\text{Ca}^{2+}$  signals induced by histamine in human endothelial cells. *Biochim Biophys Acta* **1222**: 287-291.
- ONKEN, H., SCHÖBEL, A., KRAFT, J. *et al.* (2000). Active NaCl absorption across split lamellae of posterior gills of the chinese crab *Eriocheir sinensis*: stimulation by eyestalk extract. *J Exp Biol* **203**: 1371-1381
- ORLOWSKI, J., GRINSTEIN, S. (1997).  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchangers of mammalian cells. *J Biol Chem* **272**: 22373-22376.
- PAPPAS, C.A., RANSOM, B.R. (1993). A depolarization-stimulated, bafilomycin-inhibitable  $\text{H}^+$  pump in hippocampal astrocytes. *Glia* **9**: 280-291.
- PAREKH, A.B., PENNER, R. (1997). Store depletion and calcium influx. *Physiol Rev* **77**: 901-930.
- PETZEL, D.H. (2000).  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchange in mosquito Malpighian tubules. *Am J Physiol* **279**: 1996-2003.

- PIESKE, B., MAIER, L.S., PIACENTINO, V. *et al.* (2002). Rate dependence of  $[Na^+]_i$  and contractility in nonfailing and failing human myocardium. *Circulation* **106**: 447-453.
- POWELL, D.W. (1981). Barrier function of epithelia. *Am J Physiol* **241**: 275-288.
- PUSHKIN, A., ABULADZE, N., GROSS, E. *et al.* (2004). Molecular mechanism of kNBC1-carbonic anhydrase II interaction in proximal tubule cells. *J Physiol* **559**: 55-65.
- PUTNEY, W. (2001). Channelling calcium. *Nature* **410**: 648-649.
- RAMIREZ, M., FERNANDEZ, R., MALNIC, G. (1999). Permeation of  $NH_3/NH_4^+$  and cell pH in colonic crypts of the rat. *Pflügers Arch* **438**: 508-515.
- RAPP, P.E., BERRIDGE, M.J. (1981). The control of transepithelial potential oscillations in the salivary gland of *Calliphora erythrocephala*, *J Exp Biol* **93**: 119-132.
- RIETDORF, K. (2003). Wirkungen biogener amine auf die erregungs-Sekretions-Kopplung in der Speicheldrüse von *Periplaneta americana* (L.). Dissertation, Universität Potsdam.
- 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. *J Insect Physiol* **49**: 205-215.
- RIETDORF, K., BLENAU, W., WALZ, B. (2005). Protein secretion in cockroach salivary glands requires an increase in intracellular cAMP and  $Ca^{2+}$  concentrations. *J Insect Physiol* **51**: 1083-1091.
- ROJAS, H., RAMOS, M., DIPOLLO, R. (2004). A Genistein-sensitive  $Na^+/Ca^{2+}$  exchange is responsible for the resting  $[Ca^{2+}]_i$  and most of the  $Ca^{2+}$  plasma membrane fluxes in stimulated rat cerebellar type 1 astrocytes. *Jap J Physiol* **54**: 249-262.
- ROMERO, M.F., FULTON, C.M., BORON, W.F. (2004). The SLC4 family of  $HCO_3^-$  transporters. *Pflügers Arch Eur J Physiol* **447**: 495-509.
- SAEZ, J.C., BERTHOUD, V.M., BRANES, M.C. *et al.* (2003). Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. *Physiol Rev* **83**: 1359-1400.

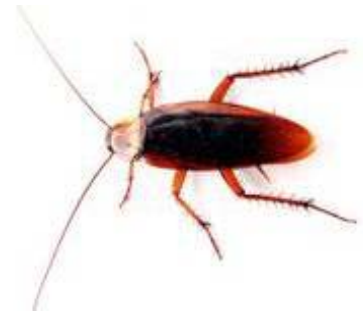
- SABOLIC, I., BROWN, D., GLUCK, S.L. *et al.* (1997). Regulation of AE1 anion exchanger and H<sup>+</sup>-ATPase in rat cortex by acute metabolic acidosis and alkalosis. *Kidney Int* **51**: 125-137.
- SAKAIRI, Y., JACOBSON, H.R., NOLAND, T.D. *et al.* (1995). Luminal prostaglandin E receptors regulate salt and water transport in rabbit cortical collecting duct. *Am J Physiol* **269**: 257-265.
- SCHEWE, B. (2005). Charakterisierung Serotonin-induzierter pH-Änderungen in den Speicheldrüsen von *Calliphora vicina*. Diplomarbeit, Universität Potsdam.
- SCHNEEBERGER, E.E., LYNCH, R.D. (2004). The tight junction: a multifunctional complex. *Am J Physiol* **286**: 1213-1228.
- SCHWARTZ, G.J., AL-AWQATI, Q. (1985). Carbon dioxide causes exocytosis of vesicles containing H<sup>+</sup> pumps in isolated perfused proximal and collecting tubules. *J Clin Invest* **75**: 1638-1644.
- SCHWIENING, C.J., THOMAS, R.C. (1992). Mechanisms of pH<sub>i</sub> regulation by locust neurones in isolated ganglia: a microelectrode study. *J Physiol* **447**: 693-709.
- SCHWIENING, C.J., KENNEDY, H.J., THOMAS, R.C. (1993). Calcium-hydrogen exchange by the plasma membrane Ca-ATPase of voltage-clamped snail neurones. *Proc R Soc Lond* **253**: 285-289.
- SEIP, G., SCHULTHEISS, G., KOCKS S.L. *et al.* (2001). Interaction between store-operated non-selective cation channels and the Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger during secretion in the rat colon. *Exp Physiol* **86**: 461-468.
- SILVER, R.B., FRINDT, G., WINDHAGER, E.E. *et al.* (1993). Feedback regulation of Na channels in rat CCT. I. Effects of inhibition of Na pump. *Am J Physiol* **264**: 557-564.
- SMITH, R.K., HOUSE, C.R. (1977). Fluid secretion by isolated cockroach salivary glands. *Experimentia* **33**: 1182-1184.
- SMITH, R.K., HOUSE, C.R. (1979). Ion and water transport by isolated cockroach salivary glands. *J Membrane Biol* **51**: 325-346.
- SOLEIMANI, M., SINGH, G., BIZAL, G.L. *et al.* (1994). Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoforms NHE-2 and NHE-1 in inner medullary collecting duct cells. *J Biol Chem* **269**: 27973-27978.
- SORENSEN, C.E., NOVAK, I. (2001). Visualization of ATP release in pancreatic acini in response to cholinergic stimulus. *J Biol Chem* **276**: 32925-32932.

- STANKOVIC, K.M., BROWN, D., ALPER, S.L. *et al.* (1997). Localization of pH regulating proteins  $H^+$  ATPase and  $Cl^-/HCO_3^-$  exchanger in the guinea pig inner ear. *Hear Res* **114**: 21-34.
- STERLING, D., REITHMEIER, R.A.F., CASEY, J.R. (2001). A transport metabolon. *J Biol Chem* **276**: 47886-47894.
- STUENKEL, E.L., MACHEN, T.E., WILLIAMS, J.A. (1988). pH regulatory mechanisms in rat pancreatic ductal cells. *Am J Physiol* **254**: 925-930.
- TAYLOR, A., WINGHAGER, E.E. (1979). Possible role of cytosolic calcium and Na-Ca exchange in regulation of transepithelial sodium transport. *Am J Physiol* **236**: 505-512.
- TEPASS, U., TANENTZAPF, G., WARD, R. *et al.* (2001). Epithelial cell polarity and cell junctions in *Drosophila*. *Annu Rev Genet* **35**: 747-784.
- TOESCU, E.C., VERKHRATSKY, A. (1998). Introduction – Principles of calcium signalling. In: A. Verkhratsky, E.C. Toescu (Eds.), Integrative aspects of calcium signalling. Plenum Press, New York, 1-19.
- TONNESSEN, T.I., SANDVIG, K., OLSNES, A.S. (1990). Role of  $Na^+-H^+$  and  $Cl^-HCO_3^-$  antiports in the regulation of cytosolic pH near neutrality. *Am J Physiol* **258**: 1117-1126.
- TORRIE, L.S., RADFORD, J.C., SOUTHALL, T.D. *et al.* (2004). Resolution of the insects ouabain paradox. *Proc Natl Acad Sci* **101**: 13689-13693.
- TSUCHIYA, Y., HAYASHI, H., SUZUKI, Y. (2001).  $Na^+$ -dependent recovery of intracellular pH from acid loading in mouse colonic crypt cells. *Tohoku J Exp Med* **193**: 1-11.
- TURNER, R.J., GEORGE, J.N. (1988).  $Cl^-HCO_3^-$  exchange is present with  $Na^+-K^+-Cl^-$  cotransport in rabbit parotid acinar basolateral membranes. *Am J Physiol* **254**: 391-396.
- TURNER, R.J., SUGIYA, H. (2002). Salivary glands and saliva: Understanding salivary fluid and protein secretion. *Oral diseases* **8**: 3-11.
- VAN ADELSBERG, J., AL-AWQATI, Q. (1986). Regulation of cell pH and  $Ca^{2+}$ -mediated exocytotic insertion of  $H^+$ -ATPases. *J Cell Biol* **102**: 1638-1645.
- VAN DRIESSCHE, W., ZEISKE, W. (1985). Ionic channels in epithelial cell membranes. *Physiol Rev* **65**: 833-903.

- VAN MEER, G., SIMONS, K. (1986). The function of tight junctions in maintaining differences in lipid composition between the apical and the basolateral cell surface domains of MDCK cells. *EMBO J* **7**: 1455-1464.
- WAKABAYASHI, S., SHIGEKAWA, M., POUYSSEGUR, J. (1997). Molecular physiology of vertebrate  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchangers. *Physiol Rev* **77**: 51-74.
- WALKER, G.P. (2003) Salivary glands. In: Encyclopedia of Insects, Eds. RESH, V.H., CARDÉ, R.T., Academic Press, San Diego.
- WALZ, B., ZIMMERMANN, B., SEIDL, S. (1994). Intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration and latency of light-induced  $\text{Ca}^{2+}$  changes in photoreceptors of the honeybee drone. *J Comp Physiol A* **174**: 421-431.
- WALZ, B., BAUMANN, O., KRACH, C. *et al.* (2006). The aminergic control of cockroach salivary glands. *Arch Insect Biochem Physiol* (in press).
- WATANABE, H., MIZUNAMI, M. (2006). Classical conditioning of activities of salivary neurons in the cockroach. *J Exp Biol* **209**: 766-779.
- WEINLICH, M., THEIß, C., LIN, C.-T., *et al.* (1998). BCECF in single cultured cells: Inhomogeneous distribution but homogeneous response. *J Exp Biol* **201**: 57-62.
- WELLING, D.J., WELLING, L.W., HILL, J.J. (1978). Phenomenological model relating cell shape to water reabsorption in proximal nephron. *Am J Physiol* **234**: 308-317.
- WELSH, M.J., SMITH, J.J. (2001). cAMP Stimulation of  $\text{HCO}_3^-$  secretion across airway epithelia. *JOP J Pancreas* **2**: 291-293.
- WHITEHEAD, A.T. (1971). The innervation of the salivary gland in the American cockroach: light and electron microscope observations. *J Morphol* **135**: 483-506.
- WHITEHEAD, A.T. (1973). Innervation of the American cockroach salivary gland: neurophysiological and pharmacological investigations. *J Insect Physiol* **19**: 1961-1970.
- WHITTAM, R., WHEELER, K.P., BLAKE, A. (1964). Oligomycin and active transport reactions in cell membranes. *Nature* **203**: 720-724.
- WIECZOREK, H. (1992). The insect V-ATPase, a plasma membrane proton pump energizing secondary active transport: molecular analysis of electrogenic potassium transport in the tobacco hornworm midgut. *J Exp Biol* **172**: 335-343.

- WIECZOREK, H., BROWN, D., GRINSTEIN, S. *et al.* (1999). Animal plasma membrane energization by proton-motive V-ATPases. *BioEssays* **21**: 637-648.
- WIECZOREK, H., GRÜBER, G., HARVEY, W.R. *et al.* (2000). Structure and regulation of insect plasma membrane H<sup>+</sup> V-ATPase. *J Exp Biol* **203**: 127-135.
- YIP, K.-P., TSURUOKA, S., SCHWARTZ, G.J. *et al.* (2002). Apical H<sup>+</sup>/base transporters mediating bicarbonate absorption and pH<sub>i</sub> regulation in the OMCD. *Am J Physiol* **283**: 1098-1104.
- YOSHIMURA, H., IWASAKI, H., NISHIKAWA, H. *et al.* (1959). Role of carbonic anhydrase in bicarbonate excretion from salivary glands and mechanism of ionic excretion. *Jap J Physiol* **9**: 106-123.
- ZAVOICO, G.B., CRAGOE, E.J. (1988). Ca<sup>2+</sup> mobilization can occur independent of acceleration of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange in thrombin-stimulated human platelets. *J Biol Chem* **263**: 9635-9339.
- ZENG, W., LEE, M.G., MUALLEM, S. (1997). Membrane-specific regulation of Cl<sup>-</sup> channels by purinergic receptors in rat submandibular gland acinar and duct cells. *J Biol Chem* **272**: 32956-32965.
- ZHANG, G.H., CRAGOE, E.J., MELVIN, J.E. (1992). Regulation of cytosolic pH in rat sublingual mucous acini at rest and during muscarinic stimulation. *J Membrane Biol* **129**: 311-321.
- ZHANG, G.H., CRAGOE, E.J., MELVIN, J.E. (1993). Na<sup>+</sup> influx is mediated by Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> cotransport and Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchange in sublingual mucos acini. *Am J Physiol* **264**: 54-62.
- ZHAO, H., XU, X., DIAZ, J. *et al.* (1995). Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, and H<sup>+</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> transport in submandibular salivary ducts. *J Biol Chem* **270**: 19599-19605.
- ZIMMERMANN, B. (2000). Subcellular organization of agonist-evoked Ca<sup>2+</sup> waves in the blowfly salivary gland. *Cell Calcium* **27**: 297-307.
- ZIMMERMANN, B., DAMES, P., WALZ, B. *et al.* (2003). Distribution and serotonin-induced activation of vacuolar-type H<sup>+</sup>-ATPase in the salivary glands of the blowfly *Calliphora vicina*. *J Exp Biol* **206**: 1867-1876.

# Danksagung



Ich danke *Prof. Dr. Bernd Walz* für die Überlassung dieses in für die intensive Betreuung dieser Doktorarbeit. In zahlreichen anregenden Diskussionen zeigte er mir immer wieder neue Denkweisen auf und förderte somit maßgeblich mein selbständiges wissenschaftliches Arbeiten.

*Prof. Dr. Joachim Deitmer* und *Prof. Dr. Hans-Joachim Pflüger* danke ich für die Übernahme der Begutachtung dieser Dissertation.

Ein ganz dickes Dankeschön geht an die *gesamte Arbeitsgruppe „Zoophysiology“* für die SUPER Atmosphäre, die mich auch in „dunklen Imaging-Zeiten“ motivierte.

Insbesondere danke ich *PD Dr. Otto Baumann, Dr. Wolfgang Blenau* und *Dr. Stefan Boese* für viele anregende Tipps, für Hilfen bei der Mikroskopie und für die Mithilfe in der Schabenzucht.

Ich möchte mich auch bei den Diplomanden und Doktoranden bedanken – und dazu zählen nicht wenige: *Piotr Kos, Christian Krach, Julia Rein, Cathleen Rotte, Bettina Schewe, Jana Schlenstedt, Ruth Schmidt, Britta Troppmann, Martin Voss* und *Jeannine Witte* – ohne Euch hätte der schönste Doktorand nur halb so viel Spaß gehabt.

*Angela Hubig, Helga Liebherr* und *Bärbel Wuntke* danke ich für gut organisierte Labore sowie die Einführung in die verschiedensten Techniken des Laboralltags.

*Allen Mitgliedern des Graduiertenkollegs 837 „Functional Insect Science“* danke ich dafür, dass wir so einiges, wissenschaftlich wie sozial, auf die Beine gestellt haben. In diesem Zusammenhang sei der *Deutschen Forschungsgemeinschaft* für das Stipendium gedankt.

Bei meiner *Familie* und meinen *Freunden* bedanke ich mich für ihre stete Anteilnahme an einer ihnen teilweise doch recht fremden Welt der Physiologie und dafür, dass sie meine guten wie schlechten Launen ertragen haben.

Am Ende möchte ich mich bei meiner Freundin *Kerstin Schumacher*, dem wichtigsten Menschen in meinem Leben, bedanken. Sie hat meine Entscheidungen, so sinnvoll oder sinnlos sie waren, immer unterstützt. Mit ihrer Geduld und ihrer Liebe hat sie mir auch in schwierigen Zeiten viel Mut und Zuversicht gegeben.

# Curriculum vitae

## Persönliche Daten

Name	Carsten Hille
Geburtsdatum	15.04.1978
Geburtsort	Pirna

## Wissenschaftlicher Werdegang

seit 05/2003 Promotionsstudent in der AG Zoophysiologie am Institut für Biochemie & Biologie der Universität Potsdam, Stipendiat im Graduiertenkolleg 837 „Functional Insect Science“

04/1998 – 01/2003 Studium der Biologie am Institut für Biologie der Freien Universität Berlin,  
Diplomarbeit: *Zusammensetzung der Hämolymphe bei Käfern während der Ontogenese*,  
Abschluss: Diplom-Biologe

## Wehrdienst

07/1997 – 04/1998 Grundwehrdienst in Leipzig

## Schulbildung

09/1991 – 06/1997 Friedlieb Ferdinand Runge Gymnasium Oranienburg,  
Abschluss: Abitur

09/1984 – 08/1991 Polytechnische Oberschule Oranienburg



## **Eidesstattliche Erklärung**

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

Potsdam, den 15.05.2006

Carsten Hille