

Institut für Biologie und Biochemie
Arbeitsgruppe Zoophysiology

Die neuronale Kontrolle der Speicheldrüsen der Schabe
Periplaneta americana

-DISSERTATION-

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

eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Potsdam

von
Cathleen Rotte

Potsdam, Juli 2009

Dieses Werk ist unter einem Creative Commons Lizenzvertrag lizenziert:
Namensnennung - Weitergabe unter gleichen Bedingungen 3.0 Deutschland
Um die Bedingungen der Lizenz einzusehen, folgen Sie bitte dem Hyperlink:
<http://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/de/>

Online veröffentlicht auf dem
Publikationsserver der Universität Potsdam:
URL <http://opus.kobv.de/ubp/volltexte/2009/3945/>
URN [urn:nbn:de:kobv:517-opus-39456](http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:517-opus-39456)
<http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:517-opus-39456>

Für meine Familie in Dankbarkeit

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

PUBLIKATIONEN

ROTTE, C., KRACH, C., BALFANZ, S., BAUMANN, A., WALZ, B., BLENAU, W. (2009).
Molecular characterization and localization of the first tyramine receptor of
the american cockroach (*Periplaneta americana*). *Neuroscience* **162**, 1120-
1133

ROTTE, C., WITTE, J., BLENAU, W., BAUMANN, O. AND WALZ, B. (2009). Source,
topography and excitatory effects of GABAergic innervation in cockroach
salivary glands. *The Journal of Experimental Biology* **212**, 126-136

KONFERENZBEITRÄGE

ROTTE, C., WALZ, B. (2009). Excitatory actions of GABA and tyramine in the
cockroach salivary gland complex. *Proceedings of the 8th Göttingen
Neuroscience Meeting*, Poster T7-3C

ROTTE, C., WALZ, B. (2009). Excitatory actions and corresponding innervation
patterns of GABA, tyramine and octopamine in the cockroach salivary
gland complex. *Acta Physiologica, Volume 195, Supplement 669*: P180

ROTTE, C., WITTE, J., BAUMANN, O., WALZ, B. (2007). Organization and physiology
of the GABAergic innervation of cockroach salivary glands. *Conference
Guide of the 100th DZG Annual Meeting 2007, Köln*, Poster N25

ROTTE, C., WALZ, B. (2007). Electrical responses of acinar cells in the salivary
glands of *Periplaneta americana* to dopamine, serotonin and GABA.
Proceedings of the 7th Göttingen Neuroscience Meeting, Poster T8-5B

Zusammenfassung

Die acinösen Speicheldrüsen der Schabe *Periplaneta americana* sind durch serotonerge, dopaminerge und GABAerge Fasern innerviert. Die biogenen Amine Serotonin (5-HT) und Dopamin induzieren die Sekretion eines NaCl-haltigen Primärspeichels. Die physiologische Rolle der GABAergen Innervierung des Drüsenkomplexes war unbekannt. Es war zudem zu vermuten, dass weitere Neuromodulatoren, viz. Tyramin und Octopamin, ebenfalls an der Regulation der Speicheldrüsen beteiligt sind.

Zunächst wurde an isolierten Drüsen untersucht, auf welche Weise die Neurotransmitter 5-HT und Dopamin das basolaterale Membranpotential (V_{bl}) der Acinuszellen von *P. americana* beeinflussen. Zur Untersuchung, ob die biogenen Amine Tyramin und Octopamin sowie GABA die Neurotransmission beeinflussen, wurde ein Nerv-Speicheldrüsen-Präparat entwickelt, bei dem durch elektrische Stimulierung des Speicheldrüsennervs (SDN) die Sekretion der Speicheldrüsen induziert werden konnte und bei dem simultan die intrazelluläre Ableitung des V_{bl} der Acinuszellen möglich war. Diese elektrophysiologischen Arbeiten wurden durch immunocytochemische Untersuchungen ergänzt, in denen erstmals Tyramin und Octopamin im Speicheldrüsenkomplex lokalisiert wurden.

Wesentliche Ergebnisse dieser Arbeit waren:

- Dopamin und 5-HT induzierten multiphasische Änderungen des Membranpotentials. Diese bestanden mindestens aus einer initialen Hyperpolarisation von bis zu 20 mV und einer darauf folgenden transienten Depolarisation von bis zu 30 mV. Oft folgte eine Nachhyperpolarisation variabler Amplitude. Die initiale Hyperpolarisation war bei Dopamin-Stimulierung länger anhaltend als bei 5-HT-Stimulierung. Durch die Erstellung einer Dosis-Wirkungskurve zeigte sich, dass die Acinuszellen auf Dopamin empfindlicher reagierten als auf 5-HT.
- Stimulierung des SDN mittels einer Saugelektrode induzierte biphasische Änderungen des Membranpotentials der Acinuszellen, die mit den Dopamin- bzw. 5-HT-induzierten Änderungen in Betrag und Kinetik weitgehend identisch waren. Dieses Ergebnis zeigte, dass die elektrische Stimulierung des SDN im Nerv-Speicheldrüsen-Präparat eine verlässliche Methode zur Untersuchung der Wirkungen von Neuromodulatoren auf die dopaminerge und/oder serotonerge Neurotransmission ist.
- Die Dopamin-induzierte Hyperpolarisation wird wahrscheinlich durch die Öffnung basolateral lokalisierter Ca^{2+} -gesteuerter K^+ -Kanäle verursacht. Dieser Umstand

bestätigt indirekt, dass Dopamin-Stimulierung einen intrazellulären Ca^{2+} -Anstieg induziert. Die Dopamin- und 5-HT-induzierte Depolarisation hing kritisch von der Aktivität eines basolateral lokalisierten $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$ -Symporters ab.

- GABA hatte weder einen Einfluss auf das basolaterale Ruhe-Membranpotential der Acinuszellen, noch auf Dopamin- oder 5-HT-induzierte Potentialänderungen. GABA verstärkte jedoch die elektrischen Antworten der Acinuszellen, wenn diese durch SDN-Stimulierung hervorgerufen wurden. Dieses Ergebnis zeigte, dass GABA im Drüsenkomplex präsynaptisch als exzitatorischer Neuromodulator wirkt.
- Pharmakologische Untersuchungen ergaben, dass die erregende Wirkung von GABA durch einen metabotropen GABA_B -Rezeptor vermittelt wurde. Messungen der durch SDN-Stimulierung induzierten Flüssigkeits- und Proteinsekretionsraten zeigten, dass beide Parameter in Anwesenheit von GABA verstärkt waren. Dies ließ auf eine verstärkte serotonerge Neurotransmission schließen.
- Tyramin und Octopamin hatten weder einen Einfluss auf das basolaterale Ruhe-Membranpotential der Acinuszellen, noch auf Dopamin- oder 5-HT-induzierte Potentialänderungen. Wurden sie während der elektrischen Stimulierung des SDN appliziert, verstärkten beide Substanzen die Amplitude der Potentialänderungen. Dies zeigte, dass Tyramin und Octopamin präsynaptisch die Neurotransmission im Drüsenkomplex modulieren. Dabei war Octopamin wirksamer als Tyramin. Es wird angenommen, dass zumindest Octopamin eine verstärkende Wirkung im Drüsenkomplex hat und die Sekretionsrate verstärkt.
- Immunocytochemische Untersuchungen zeigten, dass die Drüsen nicht nur dopaminerg, serotonerg und GABAerg, sondern auch tyraminerg und octopaminerg innerviert sind. Es wurden Fasern gefunden, die sowohl Tyramin- als auch Octopamin-Immunreaktivität zeigten, als auch Fasern, die zwar Tyramin-immunreaktiv waren, nicht aber durch den Octopamin-Antikörper markiert wurden. Weiterhin wurde der erste charakterisierte Tyramin-Rezeptor (PeaTYR1) der Schabe auf einem paarigen, lateral zur Drüse ziehenden Nerv markiert, der auch tyraminerge Fasern enthielt. Da dieser Rezeptor in HEK-Zellen negativ an den cAMP-Signalweg koppelte, wird angenommen, dass Tyramin in diesem Nerv inhibitorisch auf die Neurotransmission wirkt. Der Ursprung des Nervs ist bislang unbekannt.

Die vorliegende Arbeit trug zum Verständnis der komplexen Funktionsweise der Speicheldrüse der Schabe bei und erweiterte das lückenhafte Wissen über die neuronale Kontrolle exokriner Drüsen in Insekten. Zudem wurden in dieser Arbeit Unterschiede zur Funktionsweise der Speicheldrüsen anderer, nah verwandter Insekten deutlich.

Inhalt

1. Einleitung	1
1.1. Die Wirkungen biogener Amine in Insekten.....	1
1.2. Die Speicheldrüsen der Insekten.....	2
1.3. Die Morphologie der <i>P. americana</i> Speicheldrüse	3
1.4. Die Innervation der Speicheldrüse.....	4
1.5. Die Wirkung von Dopamin und 5-HT auf die Speichelsekretion der Schabe	6
1.6. Die Speichelbildung - transepithelialer Ionentransport in den Acini.....	6
1.7. Zielstellung dieser Arbeit	8
2. Material und Methoden	11
2.1. Substanzen und Lösungen	11
2.2. Tierzucht	13
2.3. Präparation der Speicheldrüsen	13
2.4. Messungen des Membranpotentials.....	13
2.5. Elektrische Stimulierung des Speicheldrüsennervs.....	14
2.6. Messung der Flüssigkeits- und Proteinsekretionsraten	15
2.6.1. Flüssigkeitssekretion.....	15
2.6.2. Proteinbestimmung.....	16
2.7. Statistische Auswertung der Versuche	16
2.8. Immuncytochemie.....	16
2.9. Untersuchungen zur Spezifität der Antikörper - Präabsorption	20
2.10. Messungen der intrazellulären Ca ²⁺ -Konzentration	20
2.10.1. Versuchsaufbau.....	21
2.10.2. Versuchsablauf	22
3. Ergebnisse	24
3.1. Intrazelluläre Ableitungen an Acinuszellen	24
3.1.1. Wirkung von Dopamin, Serotonin, GABA, Tyramin und Octopamin auf das basolaterale Membranpotential der Acinuszellen	24
3.1.1.1. Dopamin.....	25

3.1.1.2. Serotonin.....	26
3.1.1.3. GABA.....	27
3.1.1.4. Tyramin und Octopamin.....	28
3.2. Elektrische Stimulierung des Speicheldrüsenervs.....	30
3.2.1. Wirkung von GABA, Tyramin und Octopamin auf die durch SDN-Stimulierung verursachten Potentialänderungen der Acinuszellen.....	31
3.2.1.1. GABA.....	31
3.2.1.2. Pharmakologische Charakterisierung des GABA-Effekts.....	33
3.2.1.3. Der metabotrope GABA _B -Rezeptor.....	33
3.2.1.4. Die ionotropen GABA _A - und GABA _C -Rezeptoren.....	34
3.2.1.5. Tyramin und Octopamin.....	37
3.3. Der Einfluss von GABA auf die Sekretionsrate der Acinuszellen.....	38
3.4. Die tyraminerge und octopaminerge Innervation der Drüse.....	40
3.4.1. Spezifität der Antikörper.....	40
3.4.2. Tyraminerge und octopaminerge Nervenfasern auf den Acini.....	41
3.4.3. Verteilung der Tyramin- und Octopamin-immunreaktiven Nervenfasern über dem Speicheldrüsenkomplex - co-Lokalisation von Tyramin und Octopamin.....	43
3.5. Verteilung des Tyramin-Rezeptors PeaTYR1 im Speicheldrüsenkomplex.....	50
3.5.1. Lokalisation von Transmitterfreisetzungstellen an dem PeaTYR1-immunreaktiven Nerven.....	50
3.6. Eigenschaften der Dopamin-induzierten Änderungen des basolateralen Membranpotentials.....	53
3.6.1. Die ionalen Konzentrationsgradienten an der basolateralen Membran.....	53
3.6.2. Der basolaterale Ca ²⁺ -gesteuerte K ⁺ -Kanal.....	54
3.6.3. Messungen intrazellulärer Ca ²⁺ -Änderungen.....	56
3.6.4. Die Abhängigkeit der Depolarisation von extrazellulärem Na ⁺ und der Aktivität des Na ⁺ -K ⁺ -2Cl ⁻ -Symporters.....	59
3.6.4.1. Stimulierung der Acinuszellen in Na ⁺ -freiem Ringer.....	59
3.6.4.2. Blockierung des Na ⁺ -K ⁺ -2Cl ⁻ -Symporters mit Bumetanid.....	60
4. Diskussion.....	63
4.1. Dopamin- und 5-HT- induzierte Änderungen des V _{bl}	64
4.2. Elektrische Stimulierung des Speicheldrüsenervs vs. Badapplikation von Dopamin und 5-HT.....	65
4.3. Die Wirkung von GABA auf die glanduläre Neurotransmission.....	66
4.3.1. Die erregende Wirkung von GABA wird durch einen GABA _B R vermittelt.....	67
4.3.2. Ein präsynaptischer, ionotroper GABA-Rezeptor vermittelt inhibitorische Wirkung von GABA.....	69

4.3.3. Die physiologische Rolle der GABAergen Innervierung	70
4.4. Die Wirkungen der biogenen Amine Tyramin und Octopamin auf die Acinuszellen und auf die glanduläre Neurotransmission	71
4.4.1. Die Verteilung des Tyramin-Rezeptors PeaTYR1 im Drüsenkomplex.....	74
4.4.2. Die Verteilung von Tyramin und Octopamin im Drüsenkomplex	76
4.4.4. Die physiologische Rolle der tyraminergen und octopaminergen Innervation .	79
4.5. Die Dopamin-induzierten Änderungen des basolateralen Membranpotentials.....	84
4.5.1. Die Ca ²⁺ -abhängigkeit der Dopamin-induzierten Hyperpolarisation	84
4.5.2. Überlegungen zur Funktion der basolateralen Ca ²⁺ -abhängigen K ⁺ - Leitfähigkeiten.....	88
4.5.3. Die Na ⁺ -Abhängigkeit der Depolarisation	90
4.6. Ausblick	93
5. Literaturverzeichnis	95
I. Abbildungsverzeichnis	I
II. Tabellenverzeichnis	III
III. Abkürzungsverzeichnis.....	IV
<i>Danksagung</i>	VI
<i>Curriculum vitae</i>	VII

1. Einleitung

Die neuronale Kontrolle motorischer Systeme ist in Insekten gut untersucht. Weitgehend unerforscht ist hingegen die neuronale Kontrolle exokriner Drüsen. Dies ist umso erstaunlicher, weil sich insbesondere Speicheldrüsen von Insekten hervorragend als Modellorgane zur Untersuchung der Stimulus-Sekretionskopplung und selektiver transepithelialer Transportprozesse bewährt haben. Die Drüsen können relativ schnell und einfach isoliert werden und bleiben in physiologischer Salzlösung über Stunden funktionsfähig. Aufgrund ihrer geringen Größe sind diese intakten Kleinorgane nahezu allen zellphysiologischen Techniken zugänglich.

Mittels intrazellulärer Ableitungen von Speicheldrüsenzellen der Schabe *P. americana* wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals umfassend die Wirkung von biogenen Aminen und GABA als Neurohormone und Neuromodulatoren auf das Membranpotential der Speicheldrüsenzellen bzw. die glanduläre Neurotransmission untersucht.

1.1. Die Wirkungen biogener Amine in Insekten

Biogene Amine sind kleine organische Verbindungen, die durch Decarboxylierung von Aminosäuren entstehen (Abb. 1.1 am Beispiel von Octopamin).

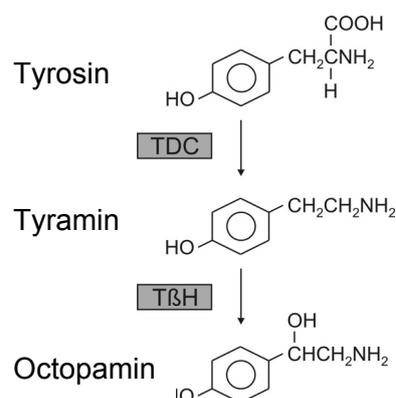


Abb. 1.1 Biosynthese der Phenolamine Tyramin und Octopamin. Die Aminosäure Tyrosin wird durch die Tyrosin-Decarboxylase (TDC) zu Tyramin decarboxyliert. Tyramin wird durch die Tyramin-β-Hydroxylase (TβH) zu Octopamin hydroxyliert.

Die physiologische Bedeutung der biogenen Amine beruht auf ihren Wirkungen als Neurotransmitter, Neuromodulatoren oder Neurohormone. Sie steuern bzw. beeinflussen Prozesse wie z.B. zirkadiane Rhythmen, Lern- und Gedächtnisvorgänge, motorische Aktivitäten sowie endo- und exokrine Sekretionsprozesse (BLENAU & BAUMANN 2001, ROEDER *et al.* 2003).

Wichtige biogene Amine, die im Nervensystem von Insekten nachgewiesen werden konnten, sind Tyramin, Octopamin, Serotonin (5-Hydroxytryptamin, 5-HT), Dopamin und Histamin.

1.2. Die Speicheldrüsen der Insekten

Die Speicheldrüsen der Insekten können tubulär oder acinös sein. Tubuläre Speicheldrüsen findet man beispielsweise in Dipteren wie *Calliphora*, *Drosophila* oder *Aedes*. Die blind endenden Tubuli bestehen über ihre gesamte Länge aus einem einschichtigen Epithel. An den Speicheldrüsen der Schmeißfliege *Calliphora vicina* wurde gezeigt, dass der Tubulus aus verschiedenen funktionellen Abschnitten besteht, die allmählich ineinander übergehen und anhand der Zellmorphologie unterschieden werden können (OSCHMAN & BERRIDGE 1970, ROTTE *et al.* 2008). In den 80iger Jahren konnten Sir Michael Berridge und seine Mitarbeiter an *Calliphora vicina* Speicheldrüsen in einer Serie von bahnbrechenden Arbeiten beispielsweise den IP_3 - Ca^{2+} -Signalweg identifizieren, der in Folge eines 5-HT-Stimulus aktiviert wird und die Speichelproduktion induziert.

Schaben und Wanderheuschrecken (z.B. *Periplaneta americana*, *Nauphoeta cinerea*, *Locusta migratoria*, *Schistocerca gregaria*) besitzen Speicheldrüsen vom acinösen Typ, die im Gegensatz zu den einfach gebauten tubulären Drüsen der Dipteren einen komplexeren Bau und mehrere funktionelle Untereinheiten besitzen. Da die acinösen Drüsen reich innerviert sind, eignen sie sich zur Untersuchung der Neurotransmission, welche die Erregungs-Sekretionskopplung einleitet.

Verschiedene biogene Amine induzieren die Sekretion von Speichel unterschiedlicher Qualitäten, weil die Amine selektiv unterschiedliche Zelltypen aktivieren. Deshalb enthält die Qualität des Speichels auch Informationen über den Wirkort putativer Neuromodulatoren. Die Morphologie der Drüse und ihre Innervation werden in den folgenden Abschnitten genauer beschrieben.

1.3. Die Morphologie der *P. americana* Speicheldrüse

Die paarige Speicheldrüse liegt im Thorax der Schabe und zieht beidseitig entlang des Vorderdarms zur Mundöffnung (Abb. 1.2 A). Die traubenförmigen Lobuli sind die Endstücke der Speicheldrüse und enthalten die sekretorisch aktiven Acini (Abb. 1.2). Jedem Acinus schließt sich ein Ausführungsgang an. Das stark verzweigte Ausführungssystem mündet schließlich in einen paarigen Hauptspeichelgang. Der sezernierte Speichel kann in einem paarigen Reservoir mit Reservoiringängen gespeichert werden. Dem Reservoir sitzt ein Muskel auf, der dem Pronotum entspringt und wahrscheinlich dem Verschluss des Reservoirs dient (SUTHERLAND & CHILLSEY 1968). Die Reservoiringänge ziehen zusammen mit den Hauptspeichelgängen zum Kopf des Tieres, wo sie sich zu einem Gang vereinigen und in den Hypopharynx münden (SUTHERLAND & CHILLSEY 1968, WHITEHEAD 1971, JUST & WALZ 1994a).

Jeder Acinus besteht aus drei Zelltypen (KESSEL & BEAMS 1963, JUST & WALZ 1994a) (Abb. 1.3). Zwei pyramidenförmige P-Zellen (periphere Zellen oder Parietalzellen) bilden die Basis eines jeden Acinus. Die Apikaldomäne der P-Zellen ist durch Membraneinfaltungen und einen ausgeprägten Mikrovillisaum stark vergrößert. Die basolaterale Domäne besitzt ebenfalls zahlreiche Einfaltungen. Eine hohe Dichte an Mitochondrien zeigt einen erhöhten Energieverbrauch an (JUST & WALZ 1994a). All diese Merkmale sind charakteristisch für Ionen-transport-aktive Zellen.

Mehrere C-Zellen (zentrale Zellen oder zymogene Zellen, C für *central*) umgeben das Lumen des Acinus. Sie zeichnen sich durch eine hohe Dichte an rauem endoplasmatischem Retikulum, Dictyosomen sowie sekretorischen Vesikeln aus, was typische Merkmale einer starken Proteinsynthese sind und auf ihre Beteiligung an der Proteinsekretion hindeutet (KESSEL & BEAMS 1963, JUST & WALZ 1994a, 1996).

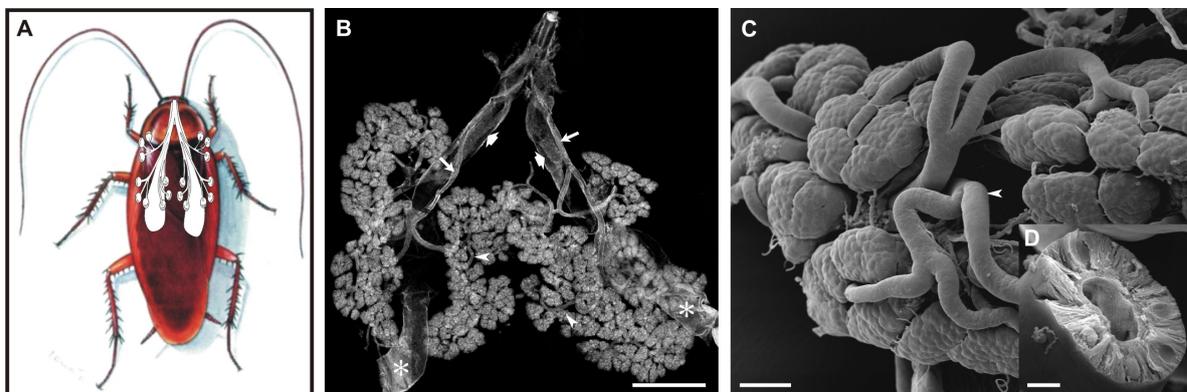


Abb. 1.2 Morphologie der Speicheldrüse von *P. americana*. (A) Schematische Darstellung der Lage der Speicheldrüse in der Schabe. (B) Dunkelfeldaufnahme der paarigen Speicheldrüse, bestehend aus zahlreichen Acini und einem verzweigten Ausführungssystem (Pfeilköpfe), das in zwei Hauptausführgänge (dünne Pfeile) mündet, sowie einem paarigen Reservoir (Sterne) mit Reservoiringängen (dicke Pfeile). Balken = 2 mm. (C) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einzelner Acini und Gänge, Balken = 100 µm. (D) Aufgebrochener Ausführungsgang, Balken = 20 µm.

Auf der luminalen Seite liegen den C-Zellen flache, fenestrierte zentroacinäre Zellen auf, die wahrscheinlich das Lumen der Acini durch Sekretion einer dünnen kutikulären Intima stabilisieren (JUST & WALZ 1994a).

Den Acini schließt sich das Ausführungssystem an. Es besteht aus einem einschichtigen Epithel eines einzigen Zelltyps, den Ausführungszellen. Diese haben wie die P-Zellen ausgeprägte basolaterale und apikale Membraneinfaltungen und eine hohe Dichte an Mitochondrien an beiden Membrandomänen, was auch hier auf aktiven Ionentransport hindeutet (JUST & WALZ 1994a). Die Ausführungsgänge sind über die gesamte Länge luminal mit einer dünnen, kutikulären Intima ausgekleidet (Abb. 1.2 D).

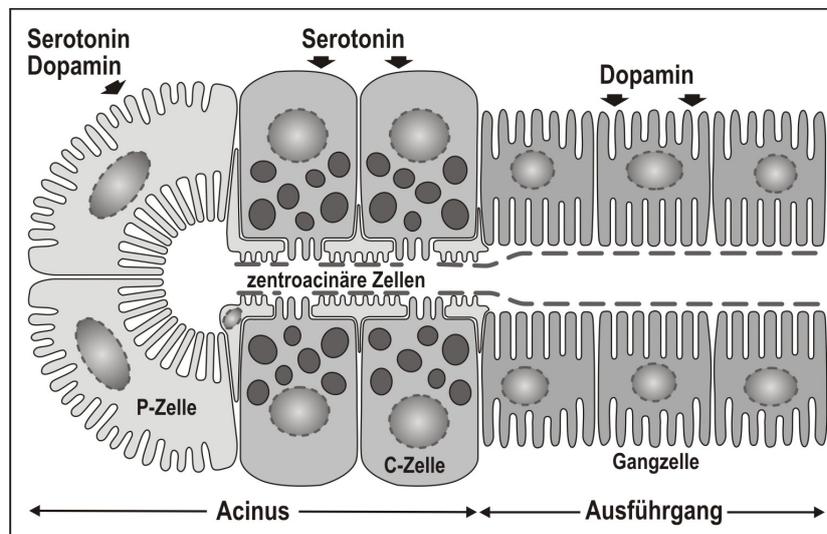


Abb. 1.3 Schematische Darstellung der strukturellen Organisation eines Acinus mit Ausführungsgang der Speicheldrüse von *P. americana*. Erläuterungen im Text (verändert nach BAUMANN *et al.* 2002).

1.4. Die Innervation der Speicheldrüse

Die Speicheldrüse wird aus zwei Anteilen des Nervensystems innerviert (WILLEY 1961, DAVIS 1985, HOUSE & GINSBORG 1985, GIFFORD *et al.* 1991, ELIA *et al.* 1994, ALI 1997). Der paarige Speicheldrüsenerv (SDN, N7b) entspringt dem Suboesophagealganglion (SOG) und zieht entlang der Reservoiringänge zum Speicheldrüsenkomplex, wo er sich stark über den Acini verzweigt und alle Anteile der Drüse innerviert.

Der Oesophagealnerve entstammt dem stomatogastrischen Nervensystem und sendet einen paarigen Ast, den Speichelnerv, mit serotonergen Axonen zum Drüsenkomplex (WILLEY 1961, BAUMANN *et al.* 2002).

Der SDN enthält die Axone der Speichelneurone 1 und 2 (SN1, SN2), deren Somata im SOG lokalisiert sind und deren Axone contralateral (SN1) oder ipsilateral (SN2) in den SDN ziehen (GIFFORD *et al.* 1991). SN1 enthält Dopamin und innerviert die Acini, das Gangsystem, das Reservoir und den Reservoirmuskel (GIFFORD *et al.* 1991, BAUMANN *et*

al. 2002, 2004) (Abb. 1.4 B). SN2 enthält GABA (ROTTE *et al.* 2009a). Die GABAerge Innervation ist der dopaminergen ähnlich und zieht über die Acini, das Reservoir und den Reservoirmuskel. Das Gangsystem ist jedoch nicht GABAerg innerviert (Abb. 1.4 A). Der SDN enthält außerdem mehrere dünne serotonerge Axone, die in der Peripherie des Nervs entlang ziehen. Dort bilden sie neurohämale Freisetzungstellen, ziehen aber auch weiter zur Drüse. Die Acini, das Reservoir und der Reservoirmuskel empfangen serotonerge Innervation (WHITEHEAD 1971, DAVIS 1985, BAUMANN *et al.* 2002, 2004) (Abb. 1.4 C). Die Gänge sind nur in unmittelbarer Nähe zu den Acini serotonerg innerviert (BAUMANN *et al.* 2002, 2004). Abbildung 1.4 zeigt schematisch die GABAerge, dopaminerge und serotonerge Innervation im Drüsenkomplex und am einzelnen Acinus. Die varikösen Nervenfasern bilden ein dichtes Netzwerk über den Lobuli, wobei die einzelnen Zelltypen eines Acinus unterschiedlich innerviert sind (Abb. 1.4 D):

Die P-Zellen sind durch dopaminerge und serotonerge Fasern innerviert, wobei die dopaminergen Fasern im Gegensatz zu den serotonergen ausschließlich oberflächlich über die Acini ziehen. Die C-Zellen sind durch tief in den Acinus eindringende serotonerge Fasern, nicht aber dopaminerg innerviert (BAUMANN *et al.* 2002, 2004).

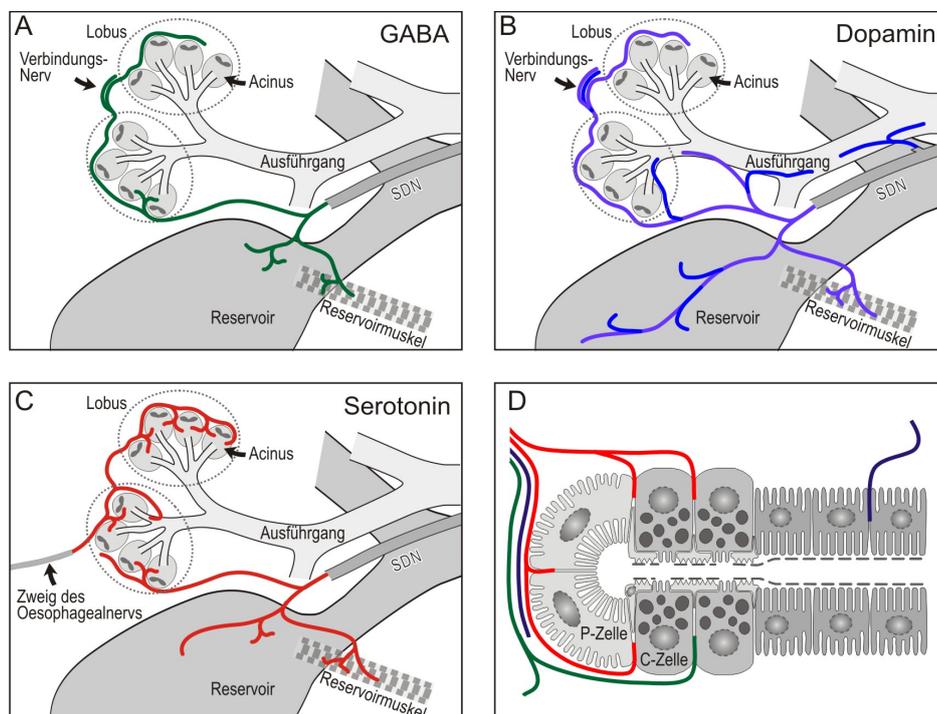


Abb. 1.4 Schematische Darstellung der Innervation des Drüsenkomplexes (A-C) und eines einzelnen Acinus (D) durch GABAerge (A, grün), dopaminerge (B, blau) und serotonerge (C, rot) Nervenfasern. Erläuterungen im Text.

Die Verteilung der GABAergen Fasern über den Drüsenläppchen ähnelt im Wesentlichen deren Innervation durch dopaminerge Fasern. Sie ziehen meist nur oberflächlich über die

Acini. Im Gegensatz zur dopaminergen Innervation wurden jedoch gelegentlich auch Drüsenläppchen gefunden, bei denen GABAerge Fasern in die Acini eindringen (ROTTE *et al.* 2009a).

1.5. Die Wirkung von Dopamin und 5-HT auf die Speichelsekretion der Schabe

Den Stimulus zur Speichelsekretion bildet die Nahrungsaufnahme. WATANABE & MIZUNAMI (2006) konnten mittels extrazellulärer Ableitungen des SDN *in vivo* zeigen, dass beide Speichelneurone (SN1 & SN2) spontan aktiv sind. Die Aktionspotentialfrequenz erhöhte sich signifikant wenn dem Tier Sucrose- oder NaCl-haltige Lösung angeboten wurde. Wie oben beschrieben, enthält SN1 Dopamin und SN2 GABA. WATANABE & MIZUNAMI fanden in ihren Ableitungen außerdem kleinere Einheiten, die keinem der beiden Speichelneurone zugeordnet werden konnten. Da im SDN auch serotonerge Neurone vorhanden sind (s.o.), die einen deutlich geringeren Durchmesser als die großen Speichelneurone haben, wäre es möglich, dass diese Einheiten der Aktivität der dünneren serotonergen Fasern zuzuordnen sind. Während der Nahrungsaufnahme und der damit einher gehenden Verstärkung der Aktivität des SDN sollte demzufolge Dopamin, 5-HT und GABA an den entsprechenden Speicheldrüsenzellen freigesetzt werden.

Experimente an isolierten Drüsen zeigten, dass Dopamin und 5-HT die Speichelsekretion induzieren. Werden die Acini der Speicheldrüse von *P. americana* mit Dopamin oder 5-HT stimuliert, sezernieren sie Speichel unterschiedlicher Qualitäten (JUST & WALZ 1996, RIETDORF *et al.* 2003, MARG *et al.* 2004). Dopamin aktiviert ausschließlich den Ionen-transport über die P-Zellen, wodurch ein wässriger, proteinfreier Speichel gebildet wird. Stimulierung der Drüsen mit 5-HT führt zur Sekretion eines Protein-haltigen Speichels. Dabei werden sowohl die P-Zellen aktiviert, als auch die Degranulation der Protein-haltigen Vesikel in den C-Zellen induziert (JUST & WALZ 1996, RIETDORF *et al.* 2005).

1.6. Die Speichelbildung - transepithelialer Ionentransport in den Acini

Das Drüsenepithel trennt den Hämolympdraum der Schabe vom Lumen der Speicheldrüse. Der in den Acini gebildete isoosmotische Primärspeichel enthält NaCl und Proteine (JUST & WALZ 1996, RIETDORF *et al.* 2003). Der Ionentransport über ein Epithel impliziert sequentiell zwei Schritte: 1. den Transport über die basolaterale und 2. den über die apikale Membran. Aufgrund des so entstandenen Salzgradienten über dem Epithel folgt Wasser aus der Hämolymphe trans- oder parazellulär nach. Das zu diesem Zeitpunkt

anerkannte Modell der an der Speichelbildung in *P. americana* Speicheldrüsen beteiligten Ionentransportvorgänge soll an dieser Stelle vereinfacht erläutert werden.

GUPTA & HALL (1983) untersuchten die ionalen Zusammensetzungen des Cytoplasmas der P-Zellen und des Acinuslumens in unstimulierten und Dopamin-stimulierten Drüsen mittels Elektronenstrahl-Röntgenmikroanalyse. So zeigten sie, dass der in den Acini gebildete Primärspeichel NaCl enthält. Sie zeigten weiterhin, dass Dopamin-abhängig die intrazellulären Konzentrationen von Na⁺, K⁺ und Cl⁻ ansteigen (siehe Tab. 3.1). JUST & WALZ (1994b) untersuchten die Verteilung der Na⁺/K⁺-ATPase in den Acinuszellen und zeigten, dass der Transporter ausschließlich an der luminalen Membran der P-Zellen lokalisiert ist. Der transepitheliale Ionentransport wird demnach durch eine apikale Na⁺/K⁺-ATPase energetisiert, die das im Speichel enthaltene Na⁺ direkt in das Lumen der Drüse transportiert. Voraussetzung für die Aktivität der Na⁺/K⁺-ATPase ist jedoch die Verfügbarkeit von K⁺ im Extrazellulärraum, in diesem Fall also im Drüsenlumen. Es muss demnach eine apikale K⁺-Leitfähigkeit geben, die für einen K⁺-Ausstrom sorgt, welches dann wiederum durch die apikale Na⁺/K⁺-ATPase einwärts transportiert wird. In der Tat enthält der Speichel der Schabe neben Na⁺ und Cl⁻ auch etwas K⁺ (GUPTA & HALL 1983, RIETDORF *et al.* 2003).

Der Weg, den Cl⁻ als Gegenion zu Na⁺ in das Lumen der Drüse nimmt, ist bisher nicht eindeutig geklärt. Die intrazelluläre Cl⁻-Konzentration ist höher als bei einer passiven Verteilung über der Membran erwartet werden würde. Ein Cl⁻-Ausstrom über die apikale Membran in das Drüsenlumen ist also möglich. Eine weitere Möglichkeit wäre ein passiver Cl⁻-Nachstrom in das Lumen über den parazellulären Weg.

Über die Mechanismen der basolateralen Na⁺-Aufnahme in die P-Zellen existieren bis jetzt nur indirekte Hinweise. RIETDORF *et al.* (2003) haben gezeigt, dass die Sekretion kritisch von der Aktivität eines Na⁺-K⁺-2Cl⁻-Symporters (NKCC) abhängt, der in der basolateralen Membran der Acini lokalisiert ist. Dieser Transporter ist demnach an der Bereitstellung des apikal exportierten Na⁺ beteiligt. Der Aktivität des NKCC ist wahrscheinlich auch die hohe intrazelluläre Cl⁻-Konzentration geschuldet.

Der isoosmotische Primärspeichel wird im Ausführungssystem Dopamin-abhängig modifiziert. Die Gangzellen nehmen Na⁺ aus dem Speichel auf und sezernieren K⁺ (LANG & WALZ 1999a, Rietdorf *et al.* 2003). Bislang ist nur wenig über die an diesen Vorgängen beteiligten Transporter bekannt. Die Na⁺-Reabsorption in den Ausführungsgängen wird durch eine basolaterale Na⁺/K⁺-ATPase energetisiert. In der Apikalmembran der Gangzellen wurden Na⁺-Kanäle postuliert, die einen Na⁺-Influx bewirken. Weiterhin wird angenommen, dass aufgrund der daraus folgenden Depolarisation der apikalen Membran ein K⁺-Efflux erfolgen kann. Abbildung 1.5 zeigt ein vereinfachtes Modell der Ionentransportvorgänge.

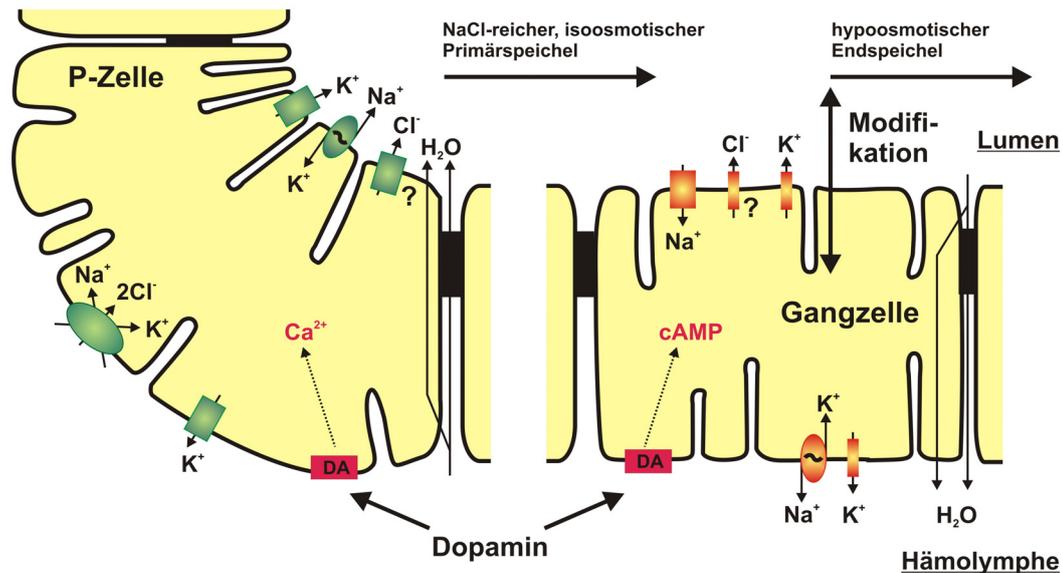


Abb. 1.5 Vereinfachtes Modell zum Ionen- und Wassertransport in den Acini und Gängen der Speicheldrüse von *Periplaneta americana*. Erläuterungen siehe Text.

1.7. Zielstellung dieser Arbeit

Über die Wirkungen biogener Amine als Neurohormone, Neuromodulatoren und Neurotransmitter bei Insekten existiert zwar ein umfangreiches Schrifttum, jedoch ist das Wissen immer noch lückenhaft. Während die neuronale Kontrolle motorischer Systeme in Insekten gut untersucht ist, blieb die neuronale Kontrolle exokriner Drüsen weitgehend unerforscht. Insbesondere zum besseren Verständnis des Zusammenwirkens unterschiedlicher Neuronenpopulationen bei der Steuerung der Sekretion und der Determinierung der Speichelqualität ist eine Analyse der Wirkungen biogener Amine auf die sekretorisch aktiven Acinuszellen nötig. Dazu sollten folgende Punkte genauer untersucht werden:

1. Intrazelluläre Ableitungen aus Acini von Speicheldrüsen in *N. cinerea* haben gezeigt, dass sowohl Dopamin als auch 5-HT eine Hyperpolarisation des basolateralen Membranpotentials induzieren (HOUSE *et al.* 1973, BOWSER-RILEY & HOUSE 1976). Intrazelluläre Ableitungen aus Acinuszellen der Speicheldrüsen von *P. americana* sollten zeigen, ob die Speicheldrüse dieser Schabenart ähnliche Änderungen des Membranpotentials zeigt, wenn sie durch Dopamin und Serotonin stimuliert wird. Diese Arbeit zeigt überraschenderweise, dass dies nicht der Fall ist.

2. Wie oben beschrieben, empfangen die Acini GABAerge Innervation über den SDN durch das Axon des SN2. Die physiologische Bedeutung dieser Innervation und die Wirkung von GABA im Speicheldrüsenkomplex waren unbekannt. Ein Hauptfokus dieser Arbeit liegt daher auf der Charakterisierung der Wirkung von GABA auf die Acinuszellen, die Neurotransmission und die Sekretion. Zur Untersuchung dieser Frage wurde ein Nerv-Speicheldrüsen-Präparat entwickelt, welches die elektrische Stimulierung des SDN und simultan Ableitungen aus den Acinuszellen bzw. Messungen der Flüssigkeitssekretion erlaubt.
3. Andere Arbeiten lieferten Ergebnisse, welche die Frage nach einer physiologischen Wirkung der biogenen Amine Tyramin und Octopamin im Speicheldrüsenkomplex aufwarfen:
 - I) Das biogene Amin Octopamin wurde erstmals 1951 von ERSPAMER & BORETTI in den Speicheldrüsen von *Octopus vulgaris* entdeckt und anschließend auch in den Speicheldrüsen der Motten *Spodoptera littoralis* und *Manduca sexta* nachgewiesen (DAVENPORT & WRIGHT 1986). Überraschenderweise wurde jedoch die Wirkung von Octopamin in den Speicheldrüsen der jeweiligen Spezies nicht untersucht.
 - II) Tyramin ist ein Zwischenprodukt der Octopamin-Synthese (Abb. 1.1). Es wurde jedoch mehrfach gezeigt, dass Tyramin selbst Effekte auf physiologische Prozesse in verschiedenen Spezies zeigt (ROEDER 2005, VIERK *et al.* 2009). Die anschließende Charakterisierung spezifischer Tyramin-Rezeptoren untermauerte die Hypothese, dass Tyramin selbst als Neurotransmitter oder Neurohormon wirken kann (CAZZAMALI *et al.* 2005).
 - III) Die Speicheldrüsen von *L. migratoria* sind durch Äste eines octopaminergen DUM-Neurons (DUM = *dorsal unpaired median*) innerviert (BRÄUNIG *et al.* 1994), dessen Funktion in Zusammenhang mit der Speichelsekretion jedoch nicht untersucht ist.
 - IV) In den Speicheldrüsen der Schabe *N. cinerea* wurde gezeigt, dass Octopamin die durch Nervenstimulierung induzierten elektrischen Antworten der Acinuszellen potenziert (BOWSER-RILEY & HOUSE 1976).
 - V) Mittels RT-PCR wurde gezeigt, dass im Drüsenkomplex von *P. americana* ein Tyramin-Rezeptor exprimiert wird (C. KRACH, Dissertation an der Uni Potsdam 2006, ROTTE *et al.* 2009b).

In dieser Arbeit wurde deshalb ein Versuch unternommen, diese vielfältigen Hinweise auf die Wirkung und Verteilung von Octopamin und Tyramin in unterschiedlichen Spezies am Modell der Speicheldrüsen der Schabe in einen physiologischen Zusammenhang zu bringen. Hierzu wurden intrazelluläre Ableitungen am Nerv-Speicheldrüsen-Präparat durchgeführt und mit Hilfe spezifischer Antikörper die Verteilung der beiden Amine im Drüsenkomplex untersucht.

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.

Die Zusammensetzung der in den Experimenten verwendeten Ringerlösungen ist in Tabelle 2.1 aufgelistet. Pharmakologische Substanzen sowie deren Wirkungsweise und Konzentrationen sind alphabetisch in Tab. 2.2 aufgelistet.

Tab. 2.1 Zusammensetzung der Ringerlösungen (mM)

Substanz	Tris-Ringer	Na ⁺ -freier Ringer	K ⁺ -freier Ringer	Ca ²⁺ -freier Ringer
NaCl	160		160	160
KCl	10	10		10
CaCl ₂	2	2	2	
MgCl ₂	2	2	2	2
Cholin-Cl		160	10	
D-Glucose	10	10	10	10
Tris	10	10	10	10
EGTA				2

Der pH wurde mit HCl, oder NaOH auf pH 7,4 eingestellt.

Tab. 2.2 Substanzen

Substanz	Eigenschaften	LM	Konzentration Stammlösung	Konzentration Versuch	Quelle
Baclofen	Agonist für GABA _B R	NaOH	100 mM	1 mM	Biotrend
BAPTA/AM	Ca ²⁺ -Chelator, membrangängig	DMSO	10 mM	20 µM	Sigma
Bicucullin	Antagonist für GABA _A R	H ₂ O	100 mM	5 µM	Biotrend
Bumetanid	Hemmstoff des NKCC	EtOH	100 mM	10 µM	Sigma
CGP 52432	Antagonist für GABA _B R	H ₂ O	10 mM	5 µM	Biotrend
CGP 54626	Antagonist für GABA _B R	DMSO	100 mM	5 µM	Biotrend
Dopamin	Agonist an Dopamin-R.	H ₂ O	10 mM	1 nM - 1 µM	Sigma
Fura Red TM / AM	Ca ²⁺ -sensitiver Fluoreszenzfarbstoff	DMSO	10 mM	40 µM	Invitrogen
GABA	Agonist an GABA-R.	H ₂ O	10 mM	1 µM, 5 µM, 1 mM	Sigma
Ionomycin	Ca ²⁺ -Ionophor	DMSO	10 mM	10 µM	Alexis
MnCl ₂	Unterdrückung der Fura Red Fluoreszenz	Ringer	---	20 mM	Sigma
Muscimol	Agonist an GABA _A R	H ₂ O	100 mM	5 µM, 100 µM	Biotrend
NPPB	Hemmstoff von Cl ⁻ - Kanälen	DMSO	50 mM	100 µM, 200 µM	Sigma
Octopamin	Agonist an Octopamin-R.	H ₂ O	10 mM	10 nM, 100 nM, 1 µM	Sigma
Ouabain	Hemmstoff der Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	H ₂ O	10 mM	100 µM, 1 mM	Sigma
Picrotoxin	Antagonist an GABA _A R	EtOH	50 mM	5 µM, 100 µM	Biotrend
Serotonin	Agonist an 5-HT-R.	H ₂ O	10 mM	1 nM bis 1 µM	Sigma
SKF 97541	Agonist an GABA _B R	H ₂ O	100 mM	5 µM	Biotrend

THIP	Antagonist an GABA _C R, Agonist an GABA _A R	H ₂ O	100 mM	100 µM	Biotrend
TPMPA	Antagonist an GABA _C R	H ₂ O	100 mM	100 µM	Biotrend
Tyramin	Agonist an Tyramin-R.	H ₂ O	10 mM, 500 mM	1 µM, 5 µM, 1 mM	Sigma

2.2. Tierzucht

Die Schaben (*Periplaneta americana*) stammten aus hauseigener Zucht. Die Tiere wurden bei konstanter Temperatur (ca. 25 °C) und einem Hell/Dunkel-Rhythmus von 12/12 h gehalten. Nahrung in Form von Pellets (Nahrung für die Rattenzucht), Äpfeln und Wasser war stets zugänglich. Für die Experimente wurden ausschließlich männliche Imagines im Alter von 4 bis 6 Wochen verwendet.

2.3. Präparation der Speicheldrüsen

Das Tier wurde durch Dekapitation getötet. Beine und Flügel wurden entfernt und die Schabe in einer Sylgard-beschichteten, mit Tris-Ringer gefüllten Präparierschale befestigt. Anschließend wurde die Körperdecke dorsal durch einen Medianschnitt geöffnet und die paarige Speicheldrüse vorsichtig entfernt.

2.4. Messungen des Membranpotentials

Die isolierte Speicheldrüse wurde in einem mit Vectabond[®] (VECTOR Laboratories, Burlingame, Kanada) beschichteten Versuchswännchen befestigt und kontinuierlich (ca. 2 ml/min) mit frischer Ringerlösung überspült. Glaskapillar-Mikroelektroden (Außendurchmesser 1 mm, mit Filament) wurden an einem Narishige PD-5 Puller (Tokyo, Japan) gezogen und anschließend mit 3 M KCl befüllt. Der Elektrodenwiderstand wurde in Ringerlösung bestimmt und betrug zwischen 50 und 100 MΩ. Als Referenzelektrode diente eine 3 M KCl Agarbrücke, die in einem geerdeten Elektrodenhalter (MEH1S10, World Precision Instruments, Inc., Sarasota, FL, USA) befestigt war, der ein Ag/AgCl-Pellet enthielt. Die Ableitelektrode wurde mit Hilfe eines mechanischen Mikromanipulators (872587, Leica, Wetzlar, Deutschland) unter mikroskopischer Kontrolle (Zeiss Stereomikroskop 475052-9901, Jena, Deutschland) in eine Zelle des acinösen

Drüsengewebes eingestochen. Das basolaterale Membranpotential wurde mittels eines BRAMP 01 Brückenverstärkers (npi electronic GmbH, Tamm, Deutschland) registriert. Der Ausgang des Mikroelektroden-Vorverstärkers war mit einem Papierschreiber (Kipp&Zonen, DELFT BV BD122, Gengenbach Messtechnik, Reichenbach/Fils, Deutschland) und einem Oszillographen (Philips PM3331 Combiscope, Kassel, Deutschland) verbunden. Außerdem wurden die Messdaten mit einer Frequenz von 1 Hz über einen KUSB-3102 A/D-Wandler (Keithley, Germering, Deutschland) digitalisiert. Die A/D-Wandlung, Darstellung und Speicherung der Daten erfolgte am PC mittels TestPoint Software (Keithley, Germering, Deutschland).

2.5. Elektrische Stimulierung des Speicheldrüsenervs

Zur elektrischen Stimulierung des Speicheldrüsenervs wurde der Reservoiringang zusammen mit dem anhaftenden Speicheldrüsenerv (SDN) in eine Saugelektrode aufgenommen (Abb. 1.1.). Die Saugelektrode war über eine Stimulus-Isolations-Einheit (SIU 5, Grass Technologies Product Group, Astro-Med GmbH, Rodgau, Deutschland) mit einem Grass S48 Stimulator verbunden. Der Nerv wurde für 2 oder 5 s mit einer Frequenz von 5 Hz stimuliert, wobei jeder der 10 bzw. 25 Stimuli 0,2 ms andauerte. Die Reizspannungen betragen 5 bis 10 V. Vor jedem Experiment wurden die optimalen Reizparameter auf das jeweilige Präparat abgestimmt. Die Reizparameter wurden so gewählt, dass die Amplituden der aus Acinuszellen abgeleiteten elektrischen Antworten im dynamischen Bereich der Dosis-Wirkungskurven für Dopamin bzw. Serotonin lagen, um sowohl abschwächende als auch verstärkende Wirkungen von applizierten Pharmaka registrieren zu können.

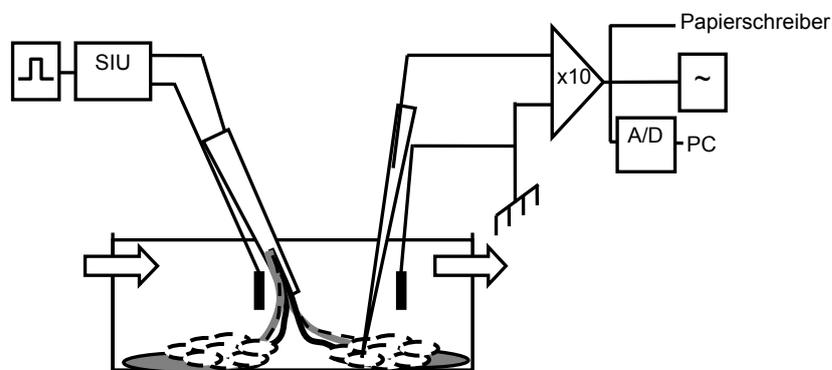


Abb. 2.1 Experimenteller Aufbau der elektrophysiologischen Messungen. Erläuterungen siehe Text.

2.6. Messung der Flüssigkeits- und Proteinsekretionsraten

2.6.1. Flüssigkeitssekretion

Die isolierten Drüsen wurden in einem doppelkammerigen, Sylgard-beschichteten Versuchswännchen befestigt (Abb. 2.2). Die beiden Kammern wurden mit Vaseline gegeneinander abgedichtet. Das sezernierende Drüsengewebe wurde in einer der zwei Kammern kontinuierlich (ca. 2 ml/min) mit oxygenierter Ringerlösung überspült. Die Reservoiringänge und der ihnen anhaftende Speicheldrüsenerv (SDN) wurden vorsichtig von den Speichelausführgängen getrennt. Die Speichelausführgänge wurden an ihrer ersten Verzweigungsstelle mit einer Nadel in der zweiten, Paraffinöl enthaltenden Kammer des Wännchens fixiert. Zur Stimulierung des SDN wurden die Reservoiringänge zusammen mit dem SDN in eine Saugelektrode aufgenommen, und wie unter 2.5. beschrieben stimuliert. Die Stimulationsparameter gehen im Kapitel "Ergebnisse" aus den jeweiligen Experimenten hervor (0,2 ms Stimulusdauer, max. 10 Hz, 5-10 V).

Der sich am Ende des Ausführganges bildende Speicheltropfen wurde einmal pro Minute mit einer Gel-Ladespitze abgenommen und in einer mit Paraffinöl gefüllten Mikrotiterplatte gesammelt. Zur Ermittlung der Speichelvolumina wurde der Tropfen über eine CCD-Kamera und ein Argus-Bildverarbeitungsprogramm abgebildet. Die Form eines Speicheltropfens wurde als Ellipsoid angenommen und das Speichelvolumen anhand zweier Tropfendurchmesser d wie folgt berechnet: $V = 4 / 3\pi ab^2$ ($a = d_{\text{längs}}$, $b = d_{\text{quer}}$).

Nach der Volumenbestimmung wurden die Tropfen gegebenenfalls in Paraffinöl-haltige Eppendorf-Gefäße übertragen und zur späteren Proteinbestimmung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren.

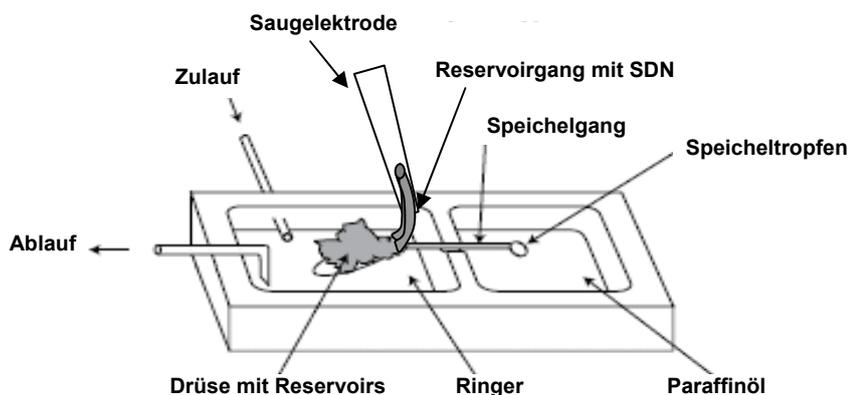


Abb. 2.2 Experimentelle Anordnung für Messungen der Speichelsekretion, die durch elektrische Stimulierung des SDN induziert wurde. Die durchbrochenen schwarzen Linien auf den Resovoiringängen stellen den SDN dar. Die Resovoiringänge wurden zusammen mit dem SDN in die Saugelektrode aufgenommen. Die Speichelausführgänge wurden an ihrer Gabelung mit einer Nadel in einem Vaseline-Bad gehalten.

2.6.2. Proteinbestimmung

Der Proteingehalt des sezernierten Speichels wurde mittels eines modifizierten Bradford-Assays bestimmt (BRADFORD 1976). Dazu wurde das Roti Nanoquant Reagenz (Roth, Karlsruhe, Deutschland) nach Angaben des Herstellers verwendet. Aus jedem definierten Abschnitt einer Messung wurde der Speichel aus fünf aufeinander folgenden Minuten zusammengefasst und mit 50 μl H_2O und 200 μl Roti Nanoquant Arbeitslösung als Färbereagenz verdünnt. Zur Ermittlung einer Eichgeraden wurden acht BSA-Lösungen mit Konzentrationen zwischen 0 und 100 $\mu\text{g/ml}$ eingesetzt. Die Speicheltropfen wurden immer mit etwas Paraffinöl transferiert. Deshalb wurde auch den BSA-Standards etwas Paraffinöl (5 μl) zugesetzt.

Zur Bestimmung der Proteinmengen wurde die Absorption der Standards und der Speichelproben mittels eines GeneQuantTM 1300 Spektrophotometers (GE Healthcare, München, Deutschland) bei 650 nm und bei 450 nm gemessen. Aus den Absorptionen bei 650 und 450 nm wurde der Quotient berechnet. Anhand einer linearen Regression aus den Absorptionsquotienten der Standards wurde eine Eichgeraden bestimmt, die zur Kalibrierung des Gerätes und somit zur Quantifizierung der Proteinmengen im gesammelten Speichel diente. Die Absorption jeder Probe und jedes Standards wurden doppelt gemessen.

2.7. Statistische Auswertung der Versuche

Die experimentellen Daten wurden mit Prism 4.01 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) statistisch ausgewertet. Zum Vergleich zweier abhängiger Datensätze wurde ein gepaarter t-Test durchgeführt. Zum Vergleich von mehr als zwei (normierten) Datensätzen wurde eine ANOVA mit nachfolgendem Tukey-Test durchgeführt. Das Signifikanzlevel wurde auf $p < 0,05$ festgelegt.

2.8. Immuncytochemie

Für die immuncytochemischen Untersuchungen wurden, abhängig von den Eigenschaften des primären Antikörpers, unterschiedliche Fixierungen durchgeführt.

Zur Erhaltung der biogenen Amine Tyramin und Octopamin im drüsenassoziierten Nervengewebe enthielt das Fixans 5 % Glutaraldehyd. Zur Untersuchung der Verteilung des Tyramin-Rezeptors PeaTYR1 und von Synapsin erfolgte die Fixierung mit 3 % Paraformaldehyd. Tabelle 2.3 zeigt die genaue Zusammensetzung der verwendeten

Fixierlösungen. Die Protokolle der Immunfluoreszenzmarkierungen hingen auch von der Fixiermethode ab. Die angewandten Protokolle sind ebenfalls in Tab. 2.3 zusammengefasst. Alle Fixierungsschritte erfolgten, wenn nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur (RT).

Die Drüsen wurden in Ringer präpariert und anschließend für 2 h fixiert. Nach dem Waschen der Drüsen mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) wurden die freien Aldehydgruppen des Glutaraldehyds (Protokoll A) für 30 min mit Natriumborohydrid abgesättigt und die Präparate anschließend erneut mit PBS gewaschen. Die nächsten Schritte waren bei beiden Protokollen identisch. Die Präparate wurden 15 min bei RT mit 0,01 % Tween 20 permeabilisiert. Verbleibende freie Aldehydgruppen wurden 15 min mit 50 mM Ammoniumchlorid abgesättigt. Nach erneutem Waschen wurden die Präparate für 30 min in Blockierlösung inkubiert.

Der Primärantikörper wurde in den in Tabelle 2.4 angegebenen Konzentrationen in Blockierlösung über Nacht bei 4 °C appliziert. Nach der Inkubation mit dem Primärantikörper wurden die Präparate in BPS gewaschen.

Der sekundäre Antikörper wurde in den in Tabelle 2.5 angegebenen Konzentrationen in PBS für drei Stunden appliziert. Dem sekundären Antikörper wurde außerdem Fluorophor-gekoppeltes Phalloidin zugesetzt (siehe Tab. 2.5). Dieses Phalloidin bindet an filamentöses Aktin und diente als morphologische Referenzmarkierung zu besserer Orientierung im Präparat.

Nach der Immunfluoreszenzmarkierung wurden die Präparate in PBS gewaschen und anschließend mit Abstandshaltern (Deckglassplitter) in Mowiol eingedeckelt. Zu jedem immunocytochemischen Experiment wurde parallel eine Negativkontrolle mitgeführt, um eventuelle unspezifische Bindungen des sekundären Antikörpers zu erkennen. Diese Präparate wurden nicht mit dem primären Antikörper inkubiert, sondern befanden sich über Nacht in Blockierlösung. Die Analyse der Präparate erfolgte mit dem konfokalen Laser-Rastermikroskop LSM 510 (Carl Zeiss, Jena, Deutschland).

Tab. 2.3 Fixierungen und Immuncytochemie

Protokoll A (für ABD-029 und AB124)	Protokoll B (für anti-PeaTYR1-CPL3 und SYNORF1)
Fixierlösung 1: 5% Glutaraldehyd, 0,2% Picrinsäure, 0,2 M Sucrose in 0,1 M PP pH 7,4 (2h, RT)	Fixierlösung 2: 3% Paraformaldehyd, 0,075 M Lysin-HCl, 0,01 M Na-Perjodat, 0,2 M Sucrose in 0,1 M PP pH 7.4 (2h, RT)
Waschen (0,1 M PBS, 3 x 10 min, RT)	
Aldehydquenching (0,5% NaBH ₃ in 0,1 M PBS, 30 min, RT)	Waschen (0,1 M PBS, 3 x 10 min, RT)
Waschen (0,1 M PBS, 2 x 10 min, RT)	
Permeabilisieren: 0,01% Tween20 (15 min, RT)	
Aldehydquenching: 50 mM NH ₄ Cl (15 min, RT)	
Waschen: 0,1 M PBS (15 min, RT)	
Blockieren und Permeabilisieren (1% NGS, 0,8% BSA, 0,5% TritonX100 in PBS) (30 min, RT)	
Primärer Antikörper in Blockierlösung (über Nacht, 4 °C)	
Waschen in 0,1 M PBS (3 x 15 min, RT)	
Sekundärer Antikörper und Phalloidin in PBS (3 h, RT)	
Waschen in 0,1 M PBS (3 x 15 min, RT)	

Zur Untersuchung der Verteilung von Octopamin, Tyramin, Synapsin und PeaTYR1 im Drüsengewebe wurden die in der folgenden Tabelle enthaltenen primären Antikörper verwendet:

Tab. 2.4 Primäre Antikörper

Antikörper	Antigen	Spezies/Typ	Quelle / Lot bzw. Bestellnr.	Verdünnung/Protokoll
anti-Tyramin	Tyramin-BSA-Konjugat	Kaninchen/polyklonal	Chemicon international/ LV1378264 (AB124)	1/1000 IF
anti-Octopamin	Octopamin-BSA-Konjugat	Maus/monoklonal	Jena Bioscience/ ABD-029	1/500 IF
SYNORF 1 (anti-Synapsin)	<i>Drosophila</i> Synapsin	Maus/monoklonal	E. Buchner (Klagges <i>et al.</i> 1996)	1/25 IF
anti-PeaTYR1-CPL3	<i>P. americana</i> Tyramin-Rezeptor	Kaninchen/polyklonal	C. Krach/ Fraktion 1	1/100 IF

Die folgenden sekundären Antikörper wurden zur Immunfluoreszenzmarkierung verwendet:

Tab. 2.5 Sekundäre Antikörper und Phalloidine

Antikörper	Quelle	Verdünnung	Anregungswellenlänge des Fluorophors (nm)
Cy3-konjugierter Ziege anti-Kaninchen IgG	Jackson Immuno Research Laboratories	1/200 IF	543
Cy3-konjugierter Ziege anti-Maus IgG	Jackson Immuno Research Laboratories	1/400 IF	543
Alexa Fluor 488-konjugierter Ziege anti-Maus IgG	Molecular Probes	1/400 IF	488
Alexa Fluor 488-konjugierter Ziege anti-Kaninchen IgG	Molecular Probes	1/50 IF	488
Alexa Fluor 633 Phalloidin	Molecular Probes	1/40 IF	633
Alexa Fluor 488 Phalloidin			488

2.9. Untersuchungen zur Spezifität der Antikörper - Präabsorption

Zur Untersuchung der Bindung der jeweiligen Antikörper an ihr Antigen, wurden parallel zu den Antikörpermarkierungen zwei Präabsorptionsexperimente durchgeführt. Dazu wurde dem Primärantikörper 1 mM seines Antigens zugesetzt. Die Antikörper-Antigen-Lösung wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Positivkontrolle ohne das Antigen wurde ebenso behandelt. Nach der Inkubationszeit wurden die Präparate nach Tab. 2.3 weiterbehandelt. Die Kreuzreaktivität der Antikörper gegen Tyramin und Octopamin wurde getestet, indem AB124 mit 1 mM Tyramin und außerdem mit 1 mM Octopamin präinkubiert wurde und *vice versa*.

Zur Dokumentation wurde das Konfokalmikroskop optimal auf eine Positivmarkierung eingestellt. Anschließend wurden mit identischen Einstellungen Aufnahmen eines Präparates gemacht, das mit präabsorbiertem Antikörper inkubiert worden war.

2.10. Messungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration

Intrazelluläre Änderungen der Ca^{2+} -Konzentration können mittels Ca^{2+} -sensitiver Farbstoffe detektiert werden (TAKAHASHI *et al.*, 1999). Für die vorliegende Arbeit wurde Fura Red verwendet, eine chemisch vom Calcium-Chelator BAPTA abgeleitete Verbindung. Der Acetoxymethylester Fura Red/AM besitzt im Vergleich zur freien Säure kaum Polarität und kann in sehr viel höherem Maße über Lipidmembranen diffundieren. Nach dem Übertritt über die Zellmembran spalten zelleigene Esterasen die Acetoxymethylreste ab. Inkubation einer Speicheldrüse in Fura Red/AM führt somit zur Anreicherung von aktivem Fura Red im Cytosol.

Das Anregungsmaximum von Fura Red ist abhängig von der $[\text{Ca}^{2+}]$ und liegt bei sättigender $[\text{Ca}^{2+}]$ bei etwa 420 nm, in Ca^{2+} -freier Lösung bei etwa 488 nm (www.invitrogen.com). Das Emissionsmaximum liegt, unabhängig von der $[\text{Ca}^{2+}]$, bei etwa 660 nm (Abb. 2.3). Die Berechnung des Quotienten der Emission beider Anregungswellenlängen (*ratio*; $R = \lambda_1/\lambda_2 = F_{420}/F_{488}$) macht es möglich, Änderungen der intrazellulären $[\text{Ca}^{2+}]$ zu messen, ohne Unterschiede in Zellvolumen und Farbstoffkonzentration in der Zelle zu berücksichtigen. Die Drüsen wurden 1-4 h mit 40 μM Fura Red, AM in Ringer inkubiert und anschließend auf Vectabond® (VECTOR Laboratories, Burlingame, Kanada)-beschichtete Deckgläschen in einem Tropfen Ringer aufgeklebt. Zur Beschichtung wurden die Deckgläschen 5 min in Aceton und 5 min in VECTABOND-Aceton (1:50) getaucht, anschließend gründlich mit Wasser gespült und im Trockenschrank bei 60°C getrocknet. Die Deckgläschen wurden mit Vaseline bodenseitig an der Perfusionskammer befestigt. Verwendete Lösungen wurden mittels einer

Schlauchpumpe (Ismatec Laboratoriumstechnik GmbH, Wertheim-Mondfeld, Deutschland) in die Kammer gespült und abgesaugt.

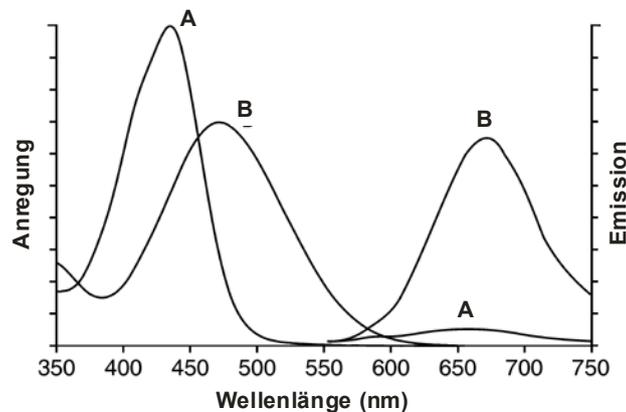


Abb. 2.3 Anregungs- und Emissionsspektrum von Ca^{2+} -gesättigtem (A) und Ca^{2+} -freiem (B) Fura Red. Die Absorptionsmaxima für Ca^{2+} -freies Fura Red und Ca^{2+} -gesättigtes Fura Red liegen bei etwa 420 bzw. 488 nm. Das Emissionsmaximum liegt bei 660 nm und ist unabhängig von der $[\text{Ca}^{2+}]$. (verändert nach www.invitrogen.com)

2.10.1. Versuchsaufbau

Der Aufbau der Messapparatur ist in Abb. 2.4 schematisch dargestellt. Zur Messung der intrazellulären $[\text{Ca}^{2+}]$ -Änderungen wurde ein inverses Mikroskop (Zeiss Axiovert 135TV) genutzt. Als Objektiv diente ein Fluor 20×/0,75 (Zeiss, Jena). Als Lichtquelle wurde eine 75 W Xenon-Kurzbogenlampe (Ushio, Steinhöring) verwendet. Diese befand sich in einem VisiChrome High-Speed Polychromator (Visitron Systems, Puchheim), der das Licht spektral aufteilte. Das monochromatische Licht wurde mittels eines Quarzfaserkabels in den Strahlengang des Mikroskops eingekoppelt. Das Anregungslicht ($\lambda_1 = 420 \text{ nm}$; $\lambda_2 = 488 \text{ nm}$) wurde mittels eines Farbteilers FT 580 auf das Präparat reflektiert. Das vom Präparat emittierte Licht ($\lambda > 600 \text{ nm}$) passierte dagegen den Farbteiler und durchlief anschließend einen Langpassfilter LP 590, so dass grundsätzlich nur Wellenlängen $> 590 \text{ nm}$ detektiert wurden. Die Belichtungszeit betrug 200 ms. Das Anregungsintervall betrug 5 s während der Perfusion mit Ringerlösung und 1 bis 2 s während der Dopamin-Stimulierung.

Die Aufnahme digitaler Bilder erfolgte mit einer gekühlten CCD-Kamera (CoolSnap-HQ; Roper Scientific Inc., Tucson, USA) bei einer Pixeltiefe von 12 Bit. Jeweils neun Bildpunkte wurden miteinander verrechnet (3×3 binning), so dass die aufgenommenen Bilder eine Auflösung von 464×346 Bildpunkten hatten. Die Steuerung des Polychromators, die 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.

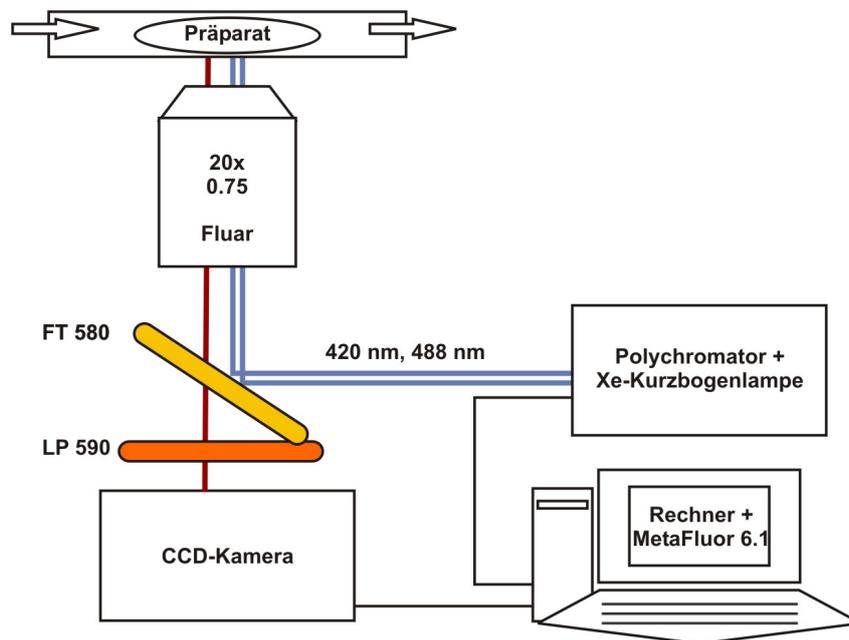


Abb. 2.4 Schematische Darstellung der Versuchsanordnung für mikrofluorometrische Messungen intrazellulärer Ca^{2+} -Änderungen mit Fura Red.

2.10.2. Versuchsablauf

Bei jedem Versuch erfolgten zunächst einige Aufnahmen der unstimulierten Drüse, um die intrazelluläre $[\text{Ca}^{2+}]$ in Ruhe zu ermitteln. Erreichte die F_{420}/F_{488} -*ratio* einen stabilen Wert, wurde für einige Minuten mit $1 \mu\text{M}$ Dopamin stimuliert. Nach der Stimulierung wurden die Drüsen wieder mit Ringer überspült, bis das Fluoreszenzsignal den Ruhewert erreichte. Um die Autofluoreszenz der Drüsen und der optischen Komponenten im Strahlengang zu ermitteln, wurde nach jedem Experiment Fura Red mit 20 mM MnCl_2 *gequencht*. Die Autofluoreszenz wurde von jedem Messwert der beiden Anregungswellenlängen subtrahiert (I) und aus den so erhaltenen Werten die korrigierte *ratio* gebildet:

$$(I) \quad R = (F_{420} - F_{B420}) / (F_{488} - F_{B488})$$

R = *ratio*

F_{420} = Fluoreszenzintensität bei 420 nm

F_{488} = Fluoreszenzintensität bei 488 nm

F_{B420} = Hintergrundfluoreszenz bei 420 nm

F_{B488} = Hintergrundfluoreszenz bei 488 nm

Die Auswertung der Daten und die Bilddarstellung erfolgten mit Prism 4.01 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) und CorelDRAW 11 (Corel Corp., Ottawa, Ontario, Kanada).

3. Ergebnisse

3.1. Intrazelluläre Ableitungen an Acinuszellen

3.1.1. Wirkung von Dopamin, Serotonin, GABA, Tyramin und Octopamin auf das basolaterale Membranpotential der Acinuszellen

Die Speicheldrüsen der Schabe sind dopaminerg und serotonerg innerviert, wobei Dopamin und Serotonin (5-Hydroxytryptamin, 5-HT) die Sekretion von Speichel unterschiedlicher Qualität induzieren (BAUMANN *et al.* 2002, 2004, JUST & WALZ 1996, RIETDORF *et al.* 2003). Im ersten Teil dieser Arbeit wurde untersucht, ob und wie Dopamin und Serotonin das Membranpotential der Acinuszellen beeinflussen. Hierzu wurde das basolaterale Membranpotential (V_{bl}) aus Acinuszellen isolierter Speicheldrüsen mit spitzen Mikroelektroden abgeleitet.

Im Verlauf dieser Arbeit stellte sich heraus, dass die Speicheldrüsen der Schabe auch durch GABAerge Fasern innerviert sind (J. WITTE, Diplomarbeit an der Universität Potsdam 2006, ROTTE *et al.* 2009a). Da es völlig unklar war, ob GABA einen direkten Einfluss auf das V_{bl} der Acinuszellen hat oder die Neurotransmission präsynaptisch moduliert, wurde auch die Wirkung von GABA auf das V_{bl} untersucht.

Im Bearbeitungszeitraum der vorliegenden Arbeit konnte außerdem gezeigt werden, dass im Speicheldrüsengewebe der Schabe ein Tyramin-Rezeptor exprimiert wird (C. KRACH, Promotion an der Universität Potsdam 2007, ROTTE *et al.* 2009b). Unklar waren die Lokalisation dieses Rezeptors und die physiologische Funktion von Tyramin im Speicheldrüsenkomplex. Deshalb wurde auch getestet, ob Tyramin das V_{bl} der Acinuszellen beeinflusst. Da Tyramin das Substrat der Tyramin- β -Hydroxylase und damit eine Octopamin-Vorstufe ist, konnte eine physiologische Rolle für Octopamin nicht ausgeschlossen werden. Deshalb musste auch untersucht werden, ob Octopamin einen Effekt auf das V_{bl} der Acinuszellen hat.

Für die intrazellulären Ableitungen des V_{bl} wurden spitze Mikroelektroden unter mikroskopischer Kontrolle in das acinöse Gewebe eingeführt. Optisch konnte unter diesen

Bedingungen nicht bestimmt werden, aus welchem Zelltyp die Ableitung erfolgte. Da die Zellen eines Acinus sowohl elektrisch (GINSBORG *et al.* 1974, HOUSE 1975) als auch Farbstoff-gekoppelt sind (MAXWELL 1981, LANG & WALZ 1999b), wurde dieser Aspekt jedoch als unkritisch angesehen und keine Zellmarkierungen vorgenommen, um den Ableitort genau zu bestimmen.

Messungen wurden nur an Zellen durchgeführt, deren Ruhe- V_{bl} sich nach der Penetration mit der Mikroelektrode zwischen -30 und -60 mV stabilisierte. In Ableitungen, die diesem Kriterium genügten, betrug das Ruhe- V_{bl} der Acinuszellen -49 ± 1 mV ($n = 28$, MW \pm SF). Die Wirkungen der Badapplikation von Dopamin, 5-HT, GABA, Tyramin und Octopamin werden in den nächsten Abschnitten genauer beschrieben.

3.1.1.1. Dopamin

Badapplikation von 250 nM bis 1 μ M Dopamin verursachte komplexe Änderungen des V_{bl} (Abb. 3.1 A). Die Änderungen des V_{bl} begannen mit einer Hyperpolarisation (initiale Hyperpolarisation). Diese Hyperpolarisationsphase zeigte einen schnellen Abstrich des V_{bl} um bis zu 12 ± 1 mV, eine leichten Repolarisation von ca. 2 mV und eine erneute, langsamere und andauernde Hyperpolarisation (nachfolgend als „anhaltende Hyperpolarisation“ bezeichnet) um 9 ± 1 mV ($n = 7$, MW \pm SF). Nachdem Dopamin ausgespült wurde, ging die anhaltende Hyperpolarisationsphase in eine steile, transiente Depolarisation von 24 ± 1 mV über. Der Depolarisation folgte oft eine Nachhyperpolarisation, deren Betrag jedoch in verschiedenen Präparaten sehr variabel war (Abb. 3.1 A).

Bei niedrigeren Dopamin-Konzentrationen bis 100 nM betrug die transiente Hyperpolarisation oft nur bis 1 mV, und die anhaltende Hyperpolarisation fehlte völlig. Die Depolarisation dagegen blieb erhalten. Die bei höheren Dopamin-Konzentrationen häufig auftretende Nachhyperpolarisation war verringert oder fehlte (Abb. 3.1 B). Bei Badapplikation von 10 nM Dopamin antworteten nur noch sechs von neun Drüsen. In Keiner von sieben getesteten Drüsen löste 1 nM Dopamin eine elektrische Zellantwort aus. Die Schwellendosis für Dopamin lag somit zwischen 1 und 10 nM (Abb. 3.1 C).

Zur Erstellung einer Dosis-Wirkungskurve wurden sieben Dopamin-Konzentrationen zwischen 1 nM und 1 μ M appliziert. Gemessen wurde die gesamte Amplitude der V_{bl} -Änderungen, nämlich die Differenz zwischen dem niedrigsten Spannungswert während der Hyperpolarisation und dem höchsten Wert während der Depolarisation (vertikaler Balken in Abb. 3.1 A). Die Nachhyperpolarisation wurde aufgrund der hohen Variabilität nicht berücksichtigt. Aus der Dosis-Wirkungskurve ergab sich für Dopamin ein EC_{50} -Wert von 30 nM (Abb. 3.1 D).

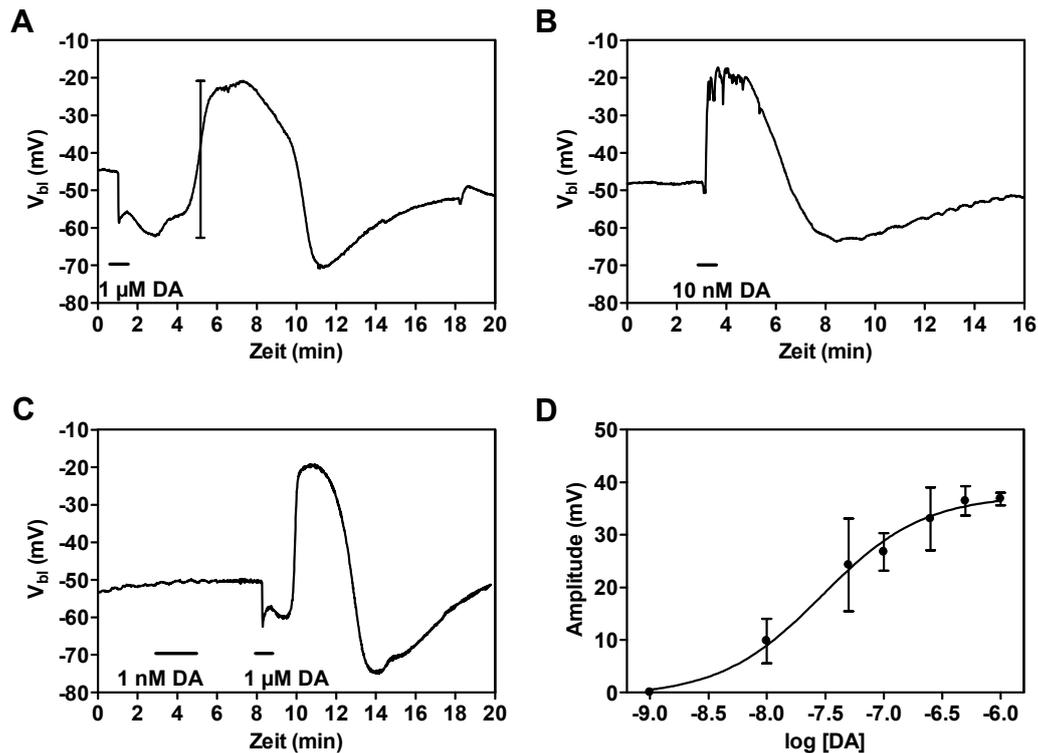


Abb. 3.1 Einfluss von Dopamin (DA)-Badapplikation auf das basolaterale Membranpotential (V_{bi}) von Acinuszellen. Applikationszeitpunkt und -dauer sind durch horizontale Balken dargestellt. **(A)** Durch $1 \mu\text{M}$ DA induzierte multiphasische V_{bi} -Änderungen. **(B)** Durch 10 nM DA induzierte V_{bi} -Änderungen. **(C)** 1 nM DA hat keinen Einfluss auf das V_{bi} der Acinuszellen. **(D)** Dosis-Wirkungskurve: Abhängigkeit der Amplitude (vertikaler Balken in A) der Potentialänderungen von der DA-Konzentration ($n = 7$, $\text{MW} \pm \text{SF}$, $R^2 = 0,9936$).

3.1.1.2. Serotonin

Badapplikation von 5-HT verursachte ebenfalls multiphasische Änderungen des basolateralen Membranpotentials, die den durch Dopamin induzierten Änderungen des V_{bi} im zeitlichen Verlauf sehr ähnlich waren. So verursachte $1 \mu\text{M}$ 5-HT eine initiale, schnelle Hyperpolarisation, die noch in Gegenwart von 5-HT in eine transiente Depolarisation überging, auf die häufig eine ebenfalls transiente Nachhyperpolarisation folgte (Abb. 3.2 A). Der wichtigste Unterschied in den Wirkungen beider Amine bestand darin, dass die anhaltende Hyperpolarisation bei 5-HT-Stimulierung stets fehlte. Die Amplitude der transienten Hyperpolarisation verringerte sich mit der 5-HT-Konzentration und verschwand meist völlig bei Applikation von 50 nM 5-HT. Konzentrationen bis 10 nM 5-HT hatten keinen Effekt auf das V_{bi} und lagen somit unterhalb der Schwellendosis der Acinuszellen für 5-HT (Abb. 3.2 B). Anhand der aus sieben Konzentrationen ermittelten Dosis-Wirkungskurve ergab sich für 5-HT ein EC_{50} -Wert von 47 nM (Abb. 3.2 C).

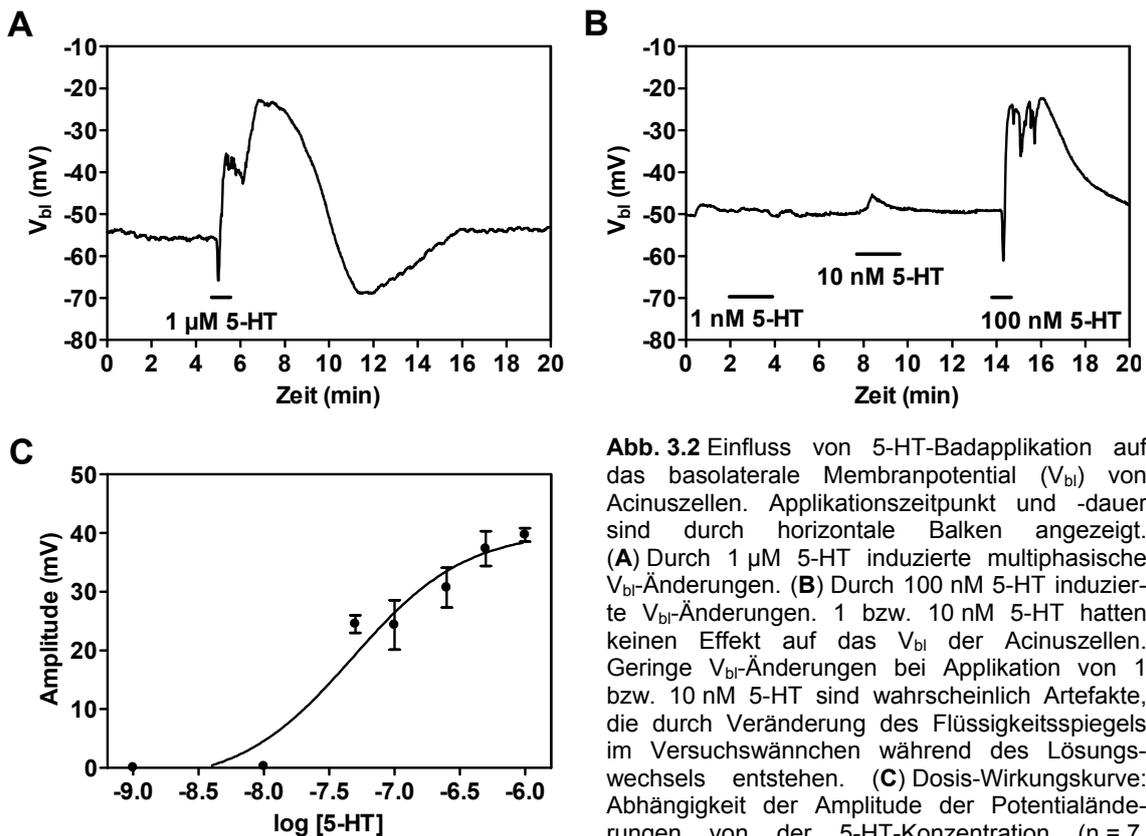


Abb. 3.2 Einfluss von 5-HT-Badapplikation auf das basolaterale Membranpotential (V_{bl}) von Acinuszellen. Applikationszeitpunkt und -dauer sind durch horizontale Balken angezeigt. **(A)** Durch $1 \mu\text{M}$ 5-HT induzierte multiphasische V_{bl} -Änderungen. **(B)** Durch 100 nM 5-HT induzierte V_{bl} -Änderungen. 1 bzw. 10 nM 5-HT hatten keinen Effekt auf das V_{bl} der Acinuszellen. Geringe V_{bl} -Änderungen bei Applikation von 1 bzw. 10 nM 5-HT sind wahrscheinlich Artefakte, die durch Veränderung des Flüssigkeitsspiegels im Versuchswännchen während des Lösungswechsels entstehen. **(C)** Dosis-Wirkungskurve: Abhängigkeit der Amplitude der Potentialänderungen von der 5-HT-Konzentration ($n = 7$, $MW \pm SF$, $R^2 = 0,9594$).

3.1.1.3. GABA

GABA (1 mM) beeinflusste das Ruhe- V_{bl} der Acinuszellen nicht (Abb. 3.3 A). Um die Funktionalität der Drüse zu testen, wurde nach GABA-Applikation mit 100 nM Dopamin stimuliert, was zu den bereits beschriebenen V_{bl} -Änderungen führte.

Da GABA allein keinen direkten Einfluss auf das Ruhe- V_{bl} der Acinuszellen hatte, war es wichtig zu testen, ob GABA die Dopamin- bzw. 5-HT-induzierten V_{bl} -Änderungen moduliert. Dazu wurden die beiden Amine jeweils mit GABA co-appliziert. Die Drüsen wurden mit 100 nM DA oder 5-HT stimuliert. Nachdem das Ruhe- V_{bl} wieder erreicht war, wurde für einige Minuten 1 mM GABA appliziert. Anschließend wurde in Anwesenheit von GABA erneut mit 100 nM Dopamin oder 5-HT stimuliert. Die Amplituden der Kontrollstimulierungen wurden mit denen in Anwesenheit von GABA durch einen gepaarten t-Test verglichen. Dabei zeigte sich, dass 1 mM GABA keinen modulierenden Einfluss auf DA- bzw. 5-HT-induzierte V_{bl} -Änderungen hat (Abb. 3.3 B-D).

Diese Ergebnisse zeigten, dass GABA das Membranpotential der Acinuszellen nicht direkt beeinflusst.

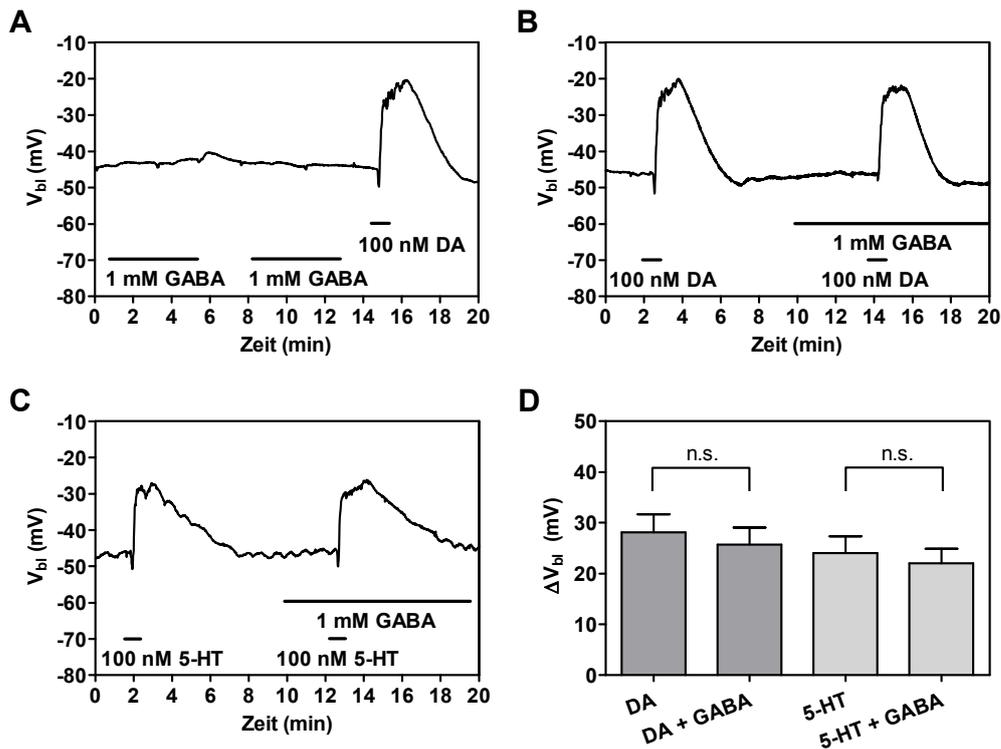


Abb. 3.3 Dopamin (DA)- und 5-HT-induzierte V_{bl} -Änderungen der Acinuszellen in Ab- bzw. Anwesenheit von GABA. **(A)** GABA hat keinen Einfluss auf das V_{bl} . Kontrollstimulierung mit 100 nM DA induziert multiphasische Änderungen des V_{bl} ($n = 6$). **(B,C)** DA bzw. 5-HT mit 1 mM GABA co-appliziert. GABA zeigt keinen modulierenden Einfluss auf die DA- bzw. 5-HT-induzierte V_{bl} -Änderung der Acinuszellen. Applikationszeitpunkt und -dauer sind durch horizontale Balken angezeigt. **(D)** Quantitative Zusammenfassung der in B und C gezeigten Experimente (MW \pm SF, DA $n = 5$, 5-HT $n = 6$, gepaarter t-Test, $P > 0,05$).

3.1.1.4. Tyramin und Octopamin

Badapplikation der beiden Amine in physiologischen Konzentrationen verursachte keine Änderungen des V_{bl} der Acinuszellen (Abb. 3.4 A-D). Nur wenn Tyramin in hohen Konzentrationen ($> 50 \mu\text{M}$) appliziert wurde, traten V_{bl} -Änderungen in den Acinuszellen auf. Diese Änderungen waren mit den durch 50 nM Dopamin induzierten Änderungen im zeitlichen Verlauf identisch, benötigten aber die 1000fache Tyraminkonzentration. Wurde 1 mM Tyramin appliziert, traten V_{bl} -Änderungen auf, die im zeitlichen Verlauf den durch 1 μM Dopamin induzierten entsprachen (nicht dargestellt). Es wurde daher angenommen, dass Tyramin in hohen Konzentrationen als unspezifischer Agonist an Dopamin-Rezeptoren bindet, was sich durch die strukturelle Ähnlichkeit der beiden Transmitter erklären lässt.

Um eine mögliche modulatorische Wirkung auf die Dopamin- bzw. 5-HT-induzierten V_{bl} -Änderungen zu untersuchen, wurden Tyramin und Octopamin mit Dopamin bzw. 5-HT co-appliziert (Abb. 3.4 A-D). Die Amplituden der Kontrollstimulierungen wurden mit denen in Anwesenheit von Tyramin bzw. Octopamin durch einen gepaarten t-Test verglichen.

Dabei zeigte sich, dass weder Tyramin noch Octopamin einen modulierenden Einfluss auf Dopamin- bzw. 5-HT-induzierte V_{bl} -Änderungen haben (Abb. 3.4 E, F).

Auffallend waren spontane kleine V_{bl} -Änderungen, die während der Tyramin-Applikation (5 μ M) auftraten. In ihrer Kinetik waren sie den durch Dopamin oder 5-HT-induzierten Änderungen sehr ähnlich. Solche Potentialänderungen traten in einigen Messungen mit Tyramin auf und wurden bereits von GINSBORG *et al.* (1976) an *N. cinerea* Speicheldrüsen bei Tyramin-Applikation beobachtet. Es wird angenommen, dass diese Potentialänderungen durch spontane Transmitterfreisetzung aus den Nerven hervorgerufen werden. Das vermehrte Auftreten solcher spontanen Potentialänderungen (Pfeile in Abb. 3.4 A, C) während der Tyramin-Applikation ließ eine präsynaptische Wirkung dieses Amins vermuten.

Zusammenfassend kann aus den vorliegenden Ergebnissen geschlossen werden, dass weder Tyramin noch Octopamin eine direkte physiologische Wirkung auf das V_{bl} der Acinuszellen in den Speicheldrüsen haben.

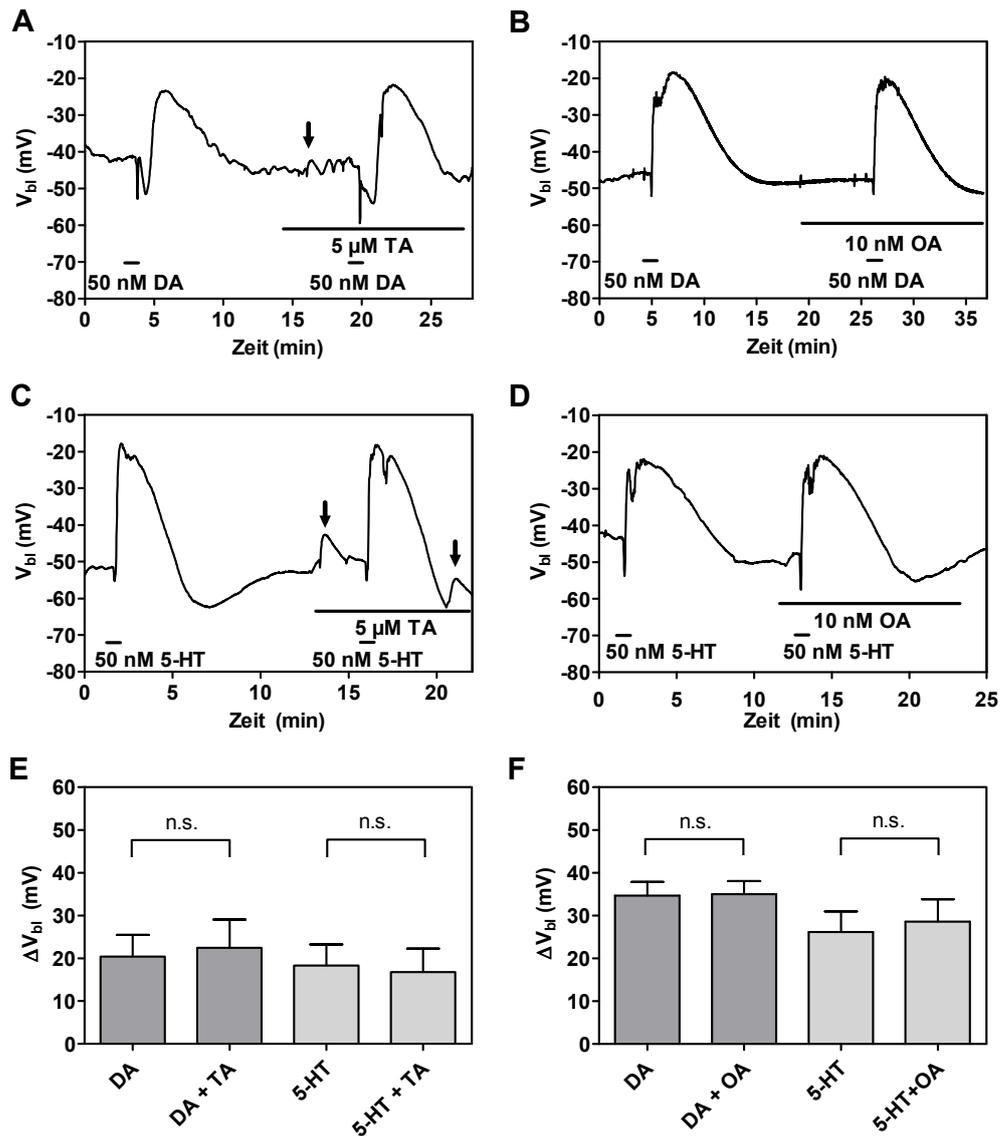


Abb. 3.4 Wirkung von Tyramin (TA) bzw. Octopamin (OA) auf das V_{bl} der Acinuszellen. Applikationszeitpunkt und -dauer sind durch horizontale Balken angezeigt. (A,B) Dopamin (DA) mit 5 μ M TA bzw. 10 nM OA co-appliziert. Weder TA noch OA haben modulierende Wirkung auf die DA-induzierte V_{bl} -Änderung der Acinuszellen. (C,D) 50 nM 5-HT mit 5 μ M TA bzw. 10 nM OA co-appliziert. Weder TA noch OA haben modulierende Wirkung auf die DA-induzierte V_{bl} -Änderung der Acinuszellen. Nach dem Einspülen von TA waren häufig spontane V_{bl} -Änderungen zu beobachten (Pfeile in A,C). (E,F) Quantitative Zusammenfassung der in A bis D gezeigten Experimente (DA + TA n = 5, 5-HT + TA n = 6, DA + OA n = 7, 5-HT + OA n = 5; gepaarter t-Test, $p > 0,05$).

3.2. Elektrische Stimulierung des Speicheldrüsennervs

Erwartungsgemäß hatten Dopamin und 5-HT eine erregende Wirkung auf die Acinuszellen. GABA, Tyramin und Octopamin hatten hingegen weder einen direkten Einfluss auf das Ruhe- V_{bl} der Acinuszellen, noch eine modulierende Wirkung auf Dopamin- bzw. 5-HT-induzierte V_{bl} -Änderungen. Diese Beobachtungen ließen die Vermutung zu, dass GABA, Tyramin und evtl. auch Octopamin ihre Wirkung präsynaptisch entfalten und die synaptische Erregungsübertragung beeinflussen. Um

diese Hypothese zu überprüfen, wurde ein Nerv-Speicheldrüsen-Präparat entwickelt, bei dem der Speicheldrüsenerv (SDN) mit einer Saugelektrode elektrisch stimuliert und simultan das basolaterale Membranpotential der Acinuszellen abgeleitet werden konnte. Elektrische Stimulierung (Sternchen in den folgenden Abbildungen) des SDN resultierte in biphasischen V_{bl} -Änderungen, die in Betrag und Kinetik den durch geringe Dopamin- bzw. 5-HT-Konzentrationen induzierten Änderungen sehr ähnlich waren (Abb. 3.5 A, B; Vgl. Abb. 3.1-3.3). Die Potentialänderungen bestanden aus einer schnellen, transienten initialen Hyperpolarisation von etwa 5 ± 1 mV und einer darauf folgenden transienten Depolarisation von etwa 8 ± 1 mV ($n = 21$, MW \pm SF). Die durchschnittliche Amplitude der so hervorgerufenen V_{bl} -Änderungen betrug 13 mV und lag somit im dynamischen Bereich der Dosis-Wirkungskurven für 5-HT und Dopamin (Vgl. Abb. 3.1 D; 3.2 C). Als Amplitude der Potentialänderung wurde auch hier die Differenz des ΔV_{bl} vom niedrigsten Punkt der Hyperpolarisation zum höchsten Punkt der Depolarisation gemessen (Abb. 3.5 A, gekennzeichnet durch einen vertikalen Balken).

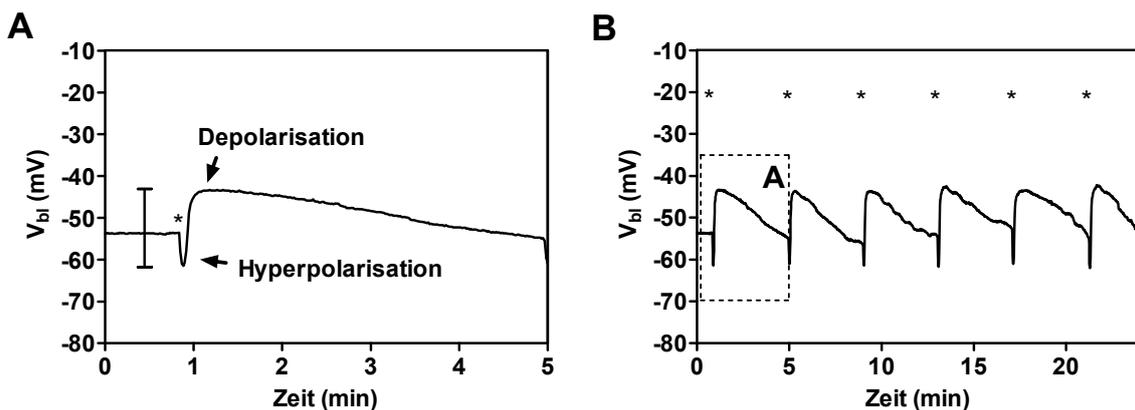


Abb. 3.5 SDN-Stimulierung induziert Änderungen des V_{bl} der Acinuszellen. (A,B) Sternchen markieren die Stimulierungszeitpunkte (5 V, 0,2 ms, 5 Hz, 2 s Salven). Eine Salve (10 Stimuli) induzierte biphasische Änderungen des V_{bl} , die sich aus einer initialen transienten Hyperpolarisation und einer darauf folgenden Depolarisation zusammensetzen. Der Kasten in B zeigt die elektrische Zellantwort in A. Die durchschnittliche Amplitude (vertikaler Balken in A) der elektrisch induzierten V_{bl} -Änderungen betrug $13 \pm 1,5$ mV ($n = 21$) und lag somit im dynamischen Bereich der Dosis-Wirkungskurven für Dopamin und 5-HT.

3.2.1. Wirkung von GABA, Tyramin und Octopamin auf die durch SDN-Stimulierung verursachten Potentialänderungen der Acinuszellen

3.2.1.1. GABA

GABA ist sowohl in Vertebraten als auch in Invertebraten als inhibitorischer Neurotransmitter bekannt, weil GABA im Allgemeinen hemmend auf die Transmitterfreisetzung wirkt. Sollte GABA eine inhibitorische Wirkung auf die synaptische Übertragung in den Speicheldrüsen haben, wäre zu erwarten, dass die durch SDN-

Stimulierung induzierten Potentialänderungen der Acinuszellen in Anwesenheit von GABA vermindert werden. Zur Untersuchung dieser Hypothese wurde der SDN elektrisch mit Salven von 10 Stimuli (0,2 ms, 5 V, 5 Hz) gereizt und simultan das V_{bl} einer Acinuszelle abgeleitet. Nach drei aufeinander folgenden Kontrollstimulierungen wurde GABA appliziert.

In Anwesenheit von 5 μM GABA löste Nervenstimulierung überraschenderweise Änderungen des V_{bl} der Acinuszellen aus, die mit einer durchschnittlichen Amplitude von $25 \pm 1,8$ mV etwa doppelt so groß waren wie in Abwesenheit von GABA ($13 \pm 1,5$ mV). Diese verstärkende Wirkung betraf sowohl die Hyperpolarisations- als auch die Depolarisationsphase der Potentialänderungen (Abb. 3.6), war reversibel und trat bereits bei der ersten elektrischen Stimulierung in Anwesenheit von GABA im Bad ein.

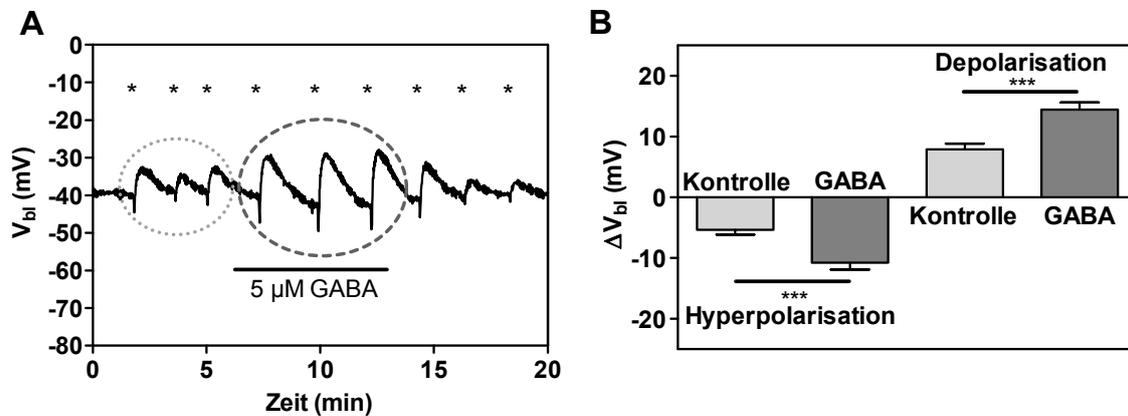


Abb. 3.6 GABA-Applikation während der elektrischen Stimulierung des SDN. **(A)** Reversible Verstärkung der V_{bl} -Änderungen der Acinuszellen durch Applikation von 5 μM GABA. Applikationszeitpunkt und -dauer sind durch einen horizontalen Balken angezeigt. **(B)** Quantitative Auswertung der in A dargestellten Experimente. Sowohl die Hyperpolarisations- als auch die Depolarisationsphasen der durch SDN-Stimulierung induzierten V_{bl} -Änderungen sind in Anwesenheit von GABA signifikant verstärkt. Aus je drei aufeinander folgenden Stimulierungen ohne (hellgraues Oval in A) bzw. mit (dunkelgraues Oval in A) GABA wurde der Mittelwert der V_{bl} -Änderung gebildet. Die Mittelwerte aus allen Experimenten wurden verglichen (gepaarter t-Test, $n = 21$, $\text{MW} \pm \text{SF}$, *** $p < 0,0001$).

Nach der zweiten Stimulierungssalve war die Verstärkung der Potentialänderungen bereits maximal. Nach dem Ausspülen von GABA dauerte es ca. 5-10 min, bis die Amplitude der V_{bl} -Änderungen ihren Ausgangswert erreichte. Ein gepaarter t-Test mit dem Mittelwert dreier aufeinander folgender Kontrollstimulierungen (Abb. 3.6 A, hellgraues Oval) und dem Mittelwert dreier aufeinander folgender Stimulierungen in Anwesenheit von GABA (Abb. 3.6 A, dunkelgraues Oval) ergab einen signifikanten Unterschied der V_{bl} -Änderungen (Abb. 3.6 B).

3.2.1.2. Pharmakologische Charakterisierung des GABA-Effekts

Bis heute sind drei GABA-Rezeptor-Subtypen beschrieben worden (BUCKINGHAM & SATTELLE 2005, CHEBIB & JOHNSTON 1999): 1. der metabotrope GABA_B-Rezeptor, 2. der ionotrope GABA_A-Rezeptor und 3. der ionotrope GABA_C-Rezeptor. Um Anhaltspunkte zu erhalten, welcher dieser drei Rezeptortypen für die GABA-Wirkung in der Schabenspeicheldrüse verantwortlich ist, wurden pharmakologische Experimente mit Subtypspezifischen GABA-Rezeptor Agonisten bzw. Antagonisten durchgeführt.

3.2.1.3. Der metabotrope GABA_B-Rezeptor

Als spezifische Agonisten des GABA_B-Rezeptors wurden Baclofen ((RS)-4-Amino-3-(4-chlorophenyl)butanoic acid) und SKF 97541 (3-Aminopropyl(methyl)phosphinic acid) verwendet (BAI & SATTELLE 1995, BETTLER *et al.* 2004). Die Agonisten wurden jeweils nach drei SDN-Kontrollstimulierungen appliziert. Beide verstärkten die durch SDN-Stimulierung hervorgerufenen elektrischen Antworten der Acinuszellen (Abb. 3.7 A, B, F). Dabei war SKF 97541 der wirksamere Agonist, da der verstärkende Effekt hier bei niedrigeren Konzentrationen (5 µM) auftrat als bei Baclofen (1 mM).

Als spezifische Antagonisten des GABA_B-Rezeptors wurden CGP 52432 und CGP 54626 verwendet (ENNA 2001, WILSON & LAURENT 2005). Nach drei SDN-Kontrollstimulierungen wurde 5 µM GABA appliziert. Nach dem Ausspülen von GABA wurde so lange wiederholt stimuliert, bis die Amplituden der Zellantworten in etwa den Ausgangswert erreicht hatten. Anschließend wurde der Antagonist (5 µM) appliziert. Nach drei weiteren Stimulierungen mit dem Antagonisten im Bad wurde zusätzlich GABA appliziert und wiederum dreimal stimuliert. CGP 52432 und CGP 54626 allein hatten keinen signifikanten Effekt auf die Amplitude der V_{bi}-Änderungen der Acinuszellen. Die verstärkende GABA-Wirkung auf die Zellantworten wurde in Gegenwart von CGP 52432 oder CGP 54626 unterdrückt (Abb. 3.7 C, E, F).

Um herauszufinden, ob sich auch die Agonisten-induzierte Verstärkung der Zellantworten durch einen Antagonisten blockieren ließ, wurde SKF 97541 zusammen mit CGP 52432 appliziert (Abb. 3.7 D, F). Wie erwartet wurde der verstärkende SKF 97541-Effekt durch den Antagonisten unterdrückt.

Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass ein GABA_B-Rezeptor die verstärkende Wirkung von GABA auf die durch SDN-Stimulierung induzierten Änderungen des V_{bi} der Acinuszellen vermittelt.

3.2.1.4. Die ionotropen GABA_A- und GABA_C-Rezeptoren

Um auch die Beteiligung anderer GABA-Rezeptor-Subtypen zu testen, wurden Agonisten und Antagonisten appliziert, die spezifisch zwischen GABA_A und GABA_C-Rezeptoren unterscheiden sollten. Um die Beteiligung eines GABA_A-Rezeptors zu untersuchen, wurde als spezifischer Agonist Muscimol verwendet (SATTELLE *et al.* 1991). Nach drei Kontrollstimulierungen wurde 100 µM Muscimol appliziert und weiterhin elektrisch stimuliert. Muscimol hatte keinen signifikanten Effekt auf die Amplituden der durch SDN-Stimulierung induzierten Acinuszellantworten (Abb. 3.8 A, F). Als GABA_A-Rezeptor-spezifische Blocker wurden 5 µM Bicucullin und 100 µM Picrotoxin verwendet (WALDROP *et al.* 1987, SATTELLE *et al.* 1991, OLSEN 2006). Picrotoxin hatte keinen signifikanten Effekt auf die durch SDN-Stimulierung hervorgerufenen Acinuszellantworten. Auch die GABA-induzierte Verstärkung der V_{bi} -Änderungen blieb in Gegenwart von Picrotoxin erhalten (Abb. 3.8 C, F). Bicucullin-Applikation führte dagegen zu einer signifikanten Verstärkung der Amplituden. Diese Verstärkung trat sowohl in An- als auch in Abwesenheit von GABA auf (Abb. 3.8 B, F).

THIP ist ein partieller GABA_A-Rezeptor-Agonist und ein spezifischer GABA_C-Rezeptor-Antagonist (WASZCZAK *et al.* 1980, WOODWARD *et al.* 1993, CHEBIB & JOHNSTON 1999). THIP (100 µM) hatte keinen Effekt auf die durch SDN-Stimulierung induzierten Acinuszellantworten. Der verstärkende GABA-Effekt blieb in Anwesenheit von THIP erhalten (Abb. 3.8 D, F). TPMPA (100 µM), ein weiterer GABA_C-Rezeptor-Antagonist (CHEBIB & JOHNSTON 1999), zeigte ebenfalls keinen signifikanten Effekt auf die Acinuszellantworten. Auch bei Applikation dieses Antagonisten blieb der GABA-Effekt erhalten (Abb. 3.8. E, F).

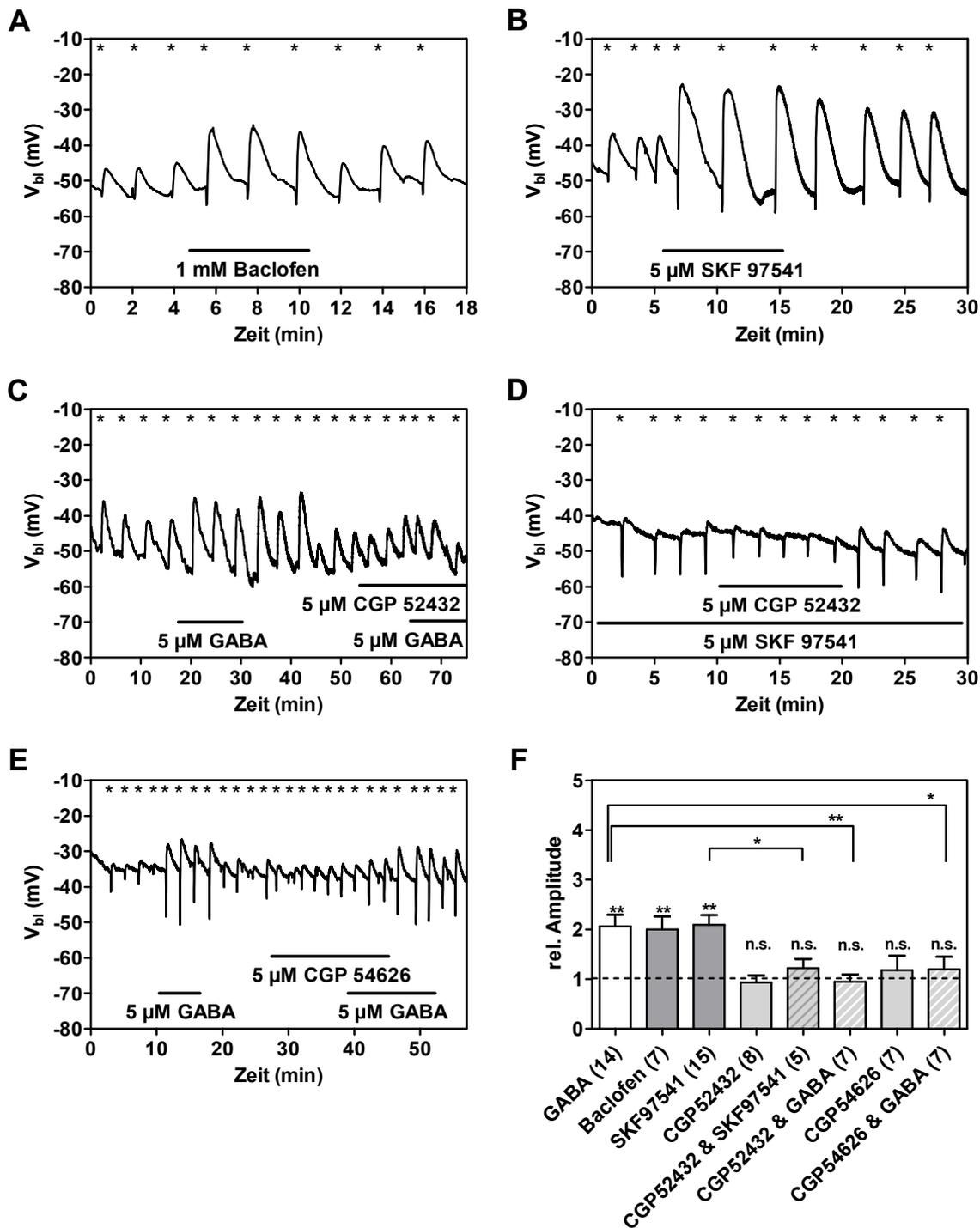


Abb. 3.7 Wirkungen GABA_B-Rezeptor (GABA_BR)-spezifischer Agonisten und Antagonisten. Applikationszeitpunkt und -dauer sind durch horizontale Balken, Zeitpunkte der elektrischen Stimulierung des Speicheldrüsenervs durch Sternchen angezeigt. **(A,B)** 1 mM Baclofen und 5 μ M SKF 97541 imitieren die GABA-induzierte Verstärkung der V_{bl}-Änderungen. **(C,D)** Der GABA_BR-Antagonist CGP 52432 unterdrückt die GABA- bzw. SKF 97541-induzierte Verstärkung der V_{bl}-Änderungen. **(E)** Der GABA_BR-Antagonist CGP 54626 unterdrückt ebenfalls die GABA-induzierte Verstärkung der V_{bl}-Änderungen. **(F)** Quantitative Zusammenfassung der in A-E gezeigten Experimente. Zur vereinfachten Darstellung wurden die gemessenen Amplituden auf die vor jeder pharmakologischen Behandlung ermittelten Kontrollamplituden normiert. Die statistische Auswertung der gepoolten, normierten Daten erfolgte mittels einer ANOVA mit nachfolgendem Tukey Test. Die Anzahl der Experimente zu jeder Substanz ist auf der X-Achse in Klammern indiziert (n.s. $p > 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$).

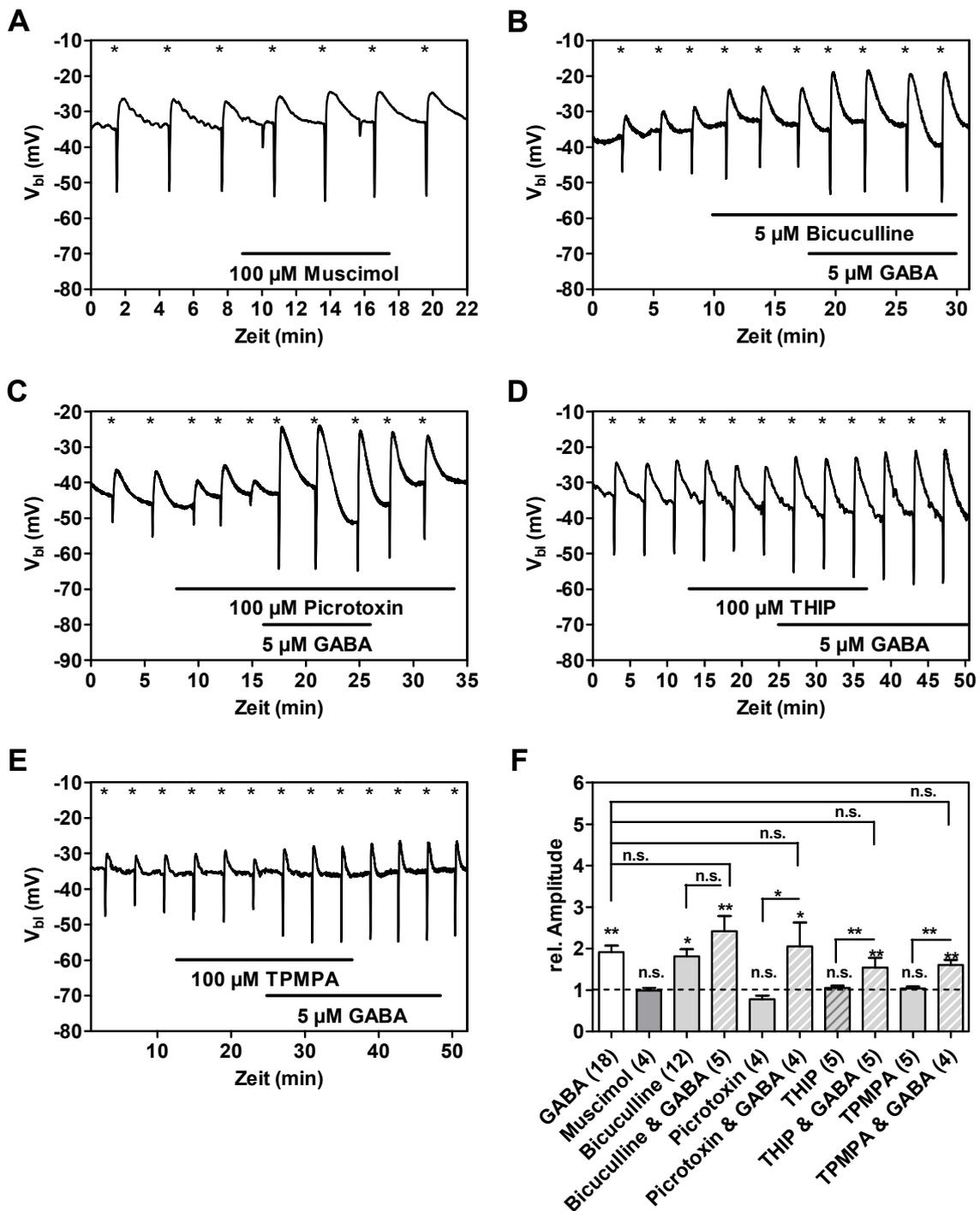


Abb. 3.8 Wirkungen GABA_A- bzw. GABA_C-Rezeptor (GABA_{A/C}R)-spezifischer Agonisten und Antagonisten. Applikationszeitpunkt und -dauer sind durch horizontale Balken, Zeitpunkte der elektrischen Stimulierung durch Sternchen angezeigt. **(A)** Der GABA_AR-Agonist Muscimol hat keinen Effekt auf die elektrisch induzierten Zellantworten. **(B)** Bicucullin, ein spezifischer GABA_AR-Antagonist, verstärkt die elektrisch induzierten Potentialänderungen sowohl in Ab- als auch in Anwesenheit von GABA. **(C)** Picrotoxin, ein spezifischer GABA_AR-Antagonist, hat keinen Effekt auf die Amplituden der durch SDN-Stimulierung induzierten Zellantworten in Ab- oder in Anwesenheit von GABA. **(D)** THIP, ein partieller GABA_AR-Agonist und ein spezifischer GABA_CR-Antagonist zeigte keinen Effekt auf die Amplituden der durch SDN-Stimulierung induzierten Zellantworten in Ab- oder in Anwesenheit von GABA. **(E)** TPMPA, ein spezifischer GABA_CR-Antagonist hatte ebenfalls keinen Effekt auf die Amplituden in Ab- oder Anwesenheit von GABA. **(F)** Quantitative Zusammenfassung der in A-E gezeigten Experimente. Zur vereinfachten Darstellung wurden die gemessenen Amplituden auf die vor jeder pharmakologischen Behandlung ermittelten Kontrollamplituden normiert. Die statistische Auswertung der gepoolten, normierten Daten erfolgte mittels einer ANOVA mit nachfolgendem Tukey Test. Die Anzahl der Experimente zu jeder Substanz ist auf der X-Achse in Klammern indiziert (n.s. $p > 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$).

3.2.1.5. Tyramin und Octopamin

Weder Tyramin noch Octopamin hatten einen direkten Einfluss auf das basolaterale Ruhe-Membranpotential der Acinuszellen. Ein modulierender Einfluss der beiden Amine auf die durch Dopamin- bzw. 5-HT-Badapplikation induzierten Potentialänderungen der Acinuszellen konnte ebenfalls nicht festgestellt werden. Aufgrund der in Anwesenheit von Tyramin auftretenden Minipotentialänderungen in den Acinuszellen war eine präsynaptische Wirkung dieses Amins denkbar. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde Tyramin während der elektrischen Stimulierung des SDN appliziert. Nach drei Kontrollstimulierungen wurde 1 μM Tyramin im Bad appliziert. Es zeigte sich, dass die V_{bl} -Änderungen der Acinuszellen, die durch elektrische Stimulierung des SDN verursacht werden, durch 1 μM Tyramin in der Badlösung durchschnittlich um den Faktor 1,7 verstärkt wurden (Abb. 3.9 A, C).

Da Tyramin die Vorstufe des Octopamins ist, wurde das gleiche Experiment mit Octopamin wiederholt. Nach drei elektrischen Kontrollstimulierungen des SDN wurde 10 nM bis 1 μM Octopamin in der Badlösung appliziert. Die Abbildung 3.9 B, D zeigt, dass bereits 10 nM Octopamin die V_{bl} -Änderungen der Acinuszellen etwa um den Faktor 1,6 verstärkten. 100 nM Octopamin verstärkten die V_{bl} -Änderungen etwa um den Faktor 2,4 und 1 μM Octopamin um den Faktor 2,5 (Abb. 3.9 C).

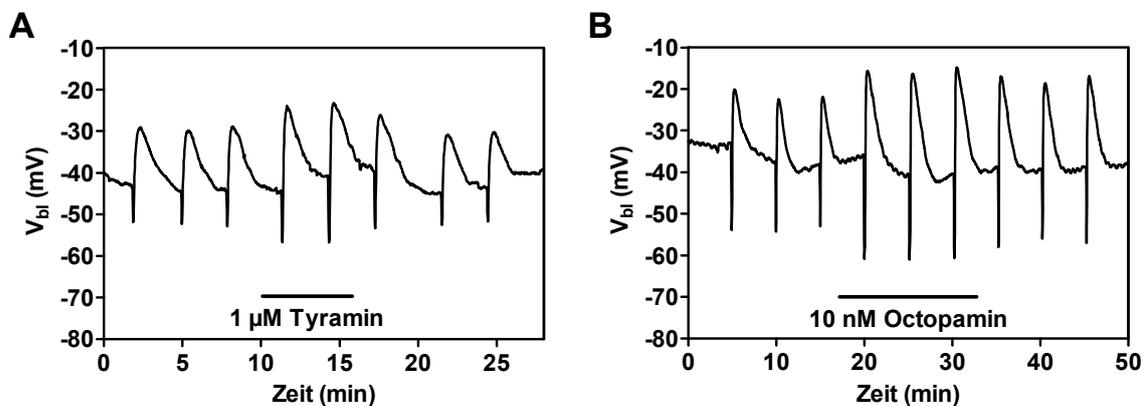


Abb. 3.9 Einfluss von Tyramin und Octopamin auf die durch SDN-Stimulierung induzierten V_{bl} -Änderungen der Acinuszellen. Applikationszeitpunkt und -dauer sind durch horizontale Balken dargestellt. **(A)** Verstärkung der Acinuszellantworten durch 1 μM Tyramin. **(B)** Verstärkung der Acinuszellantworten durch 10 nM Octopamin. **(C)** Quantitative Zusammenfassung der in A und B gezeigten Messungen. Zur vereinfachten Darstellung wurden die Daten normiert. (Tyramin $n = 6$, Octopamin 10 nM $n = 6$, 100 nM $n = 4$, 1 μM $n = 6$; * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$; gepaarter t-Test).

3.3. Der Einfluss von GABA auf die Sekretionsrate der Acinuszellen

Die oben beschriebenen Ergebnisse zeigten, dass GABA einen verstärkenden Einfluss auf die Potentialänderungen der Acinuszellen hatte, wenn diese durch elektrische Stimulierung des SDN induziert wurden. Da anzunehmen ist, dass die Potentialänderungen der Acinuszellen auch die sekretorische Aktivität der Speicheldrüsen begleiten, wurde getestet (1.) ob auch die Sekretion durch die elektrische Stimulierung des SDN messbar induziert werden kann und (2.) ob die so induzierten Sekretionsraten durch GABA beeinflusst werden.

Die isolierten Nerv-Drüsenpräparate zeigten in Ruhe keine sekretorische Aktivität. Wurde der SDN mit einer Frequenz von 10 Hz bei 8 V stimuliert (0,2 ms / Stimulus), sezernierten die Drüsen einen viskösen Speichel mit einer Rate von 202 ± 32 nl/min ($n = 7$). Um auch eine mögliche Erhöhung der Speichelsekretionsrate beobachten zu können, wurde die Stimulationsfrequenz nach 5 min auf 2 Hz erniedrigt. Bei dieser Frequenz sezernierten die Drüsen mit einer Rate von nur $6,8 \pm 1,1$ nl/min ($n = 7$) (Abb. 3.10 A, B). Wurde unter diesen Bedingungen GABA appliziert, stieg die Flüssigkeitssekretionsrate etwa um den Faktor 2,5 auf $16,7 \pm 1,7$ nl/min an (Abb. 3.10 A, B). Nach dem Ausspülen von GABA ging die Sekretionsrate wieder auf einen niedrigen Wert zurück. Zum Ende eines jeden Experiments wurde eine erneute Kontrollstimulierung mit einer Frequenz von 10 Hz durchgeführt, um die Funktionalität der Drüse zu testen.

Der Speichel von *P. americana* enthält auch Proteine, die von den C-Zellen der Acini sezerniert werden (KESSEL & BEAMS 1963, JUST & WALZ 1996). Da auch die C-Zellen durch Axone aus dem SDN innerviert werden (BAUMANN *et al.* 2002, 2004), war zu prüfen, ob GABA auch die Rate der Proteinsekretion beeinflusst, wenn der SDN elektrisch stimuliert wird. Zur Bestimmung der Proteinsekretionsraten in Ab- und in Anwesenheit von GABA wurde ein modifizierter Bradford-Assay genutzt (BRADFORD 1976, RIETDORF *et al.* 2005). Zuerst wurde das GeneQuant™ 1300 Spectrophotometer anhand von 8 Proteinlösungen bekannter Konzentrationen zwischen 0 und 100 µg/ml geeicht. Die gesammelten Speicheltropfen der ersten 5 Minuten während der elektrischen Kontrollstimulierung (weißes Rechteck in 2.10 A) bzw. die Tropfen der ersten 5 Minuten während der GABA-Applikation (dunkelgraues Rechteck in 2.10 A) wurden in je einem Eppendorf-Gefäß zusammengeführt und der Proteingehalt bestimmt. Anschließend wurde die Proteinsekretionsrate (µg/min) berechnet. Die Proteinsekretionsrate war in Anwesenheit von GABA gegenüber der Kontrollstimulierung um den Faktor 4 von $2,9 \pm 0,7$ auf $12 \pm 3,8$ µg/min ($n = 7$) erhöht (Abb. 3.10 C).

Diese Ergebnisse zeigen, dass GABA nicht nur die elektrischen Antworten der Acinuszellen verstärkt, sondern auch die Flüssigkeits- und die Proteinsekretionsrate erhöht.

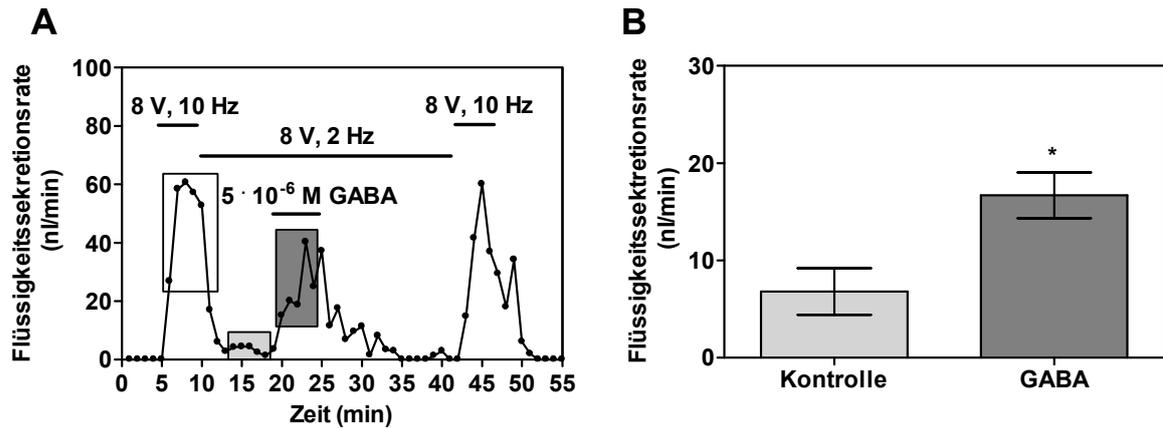
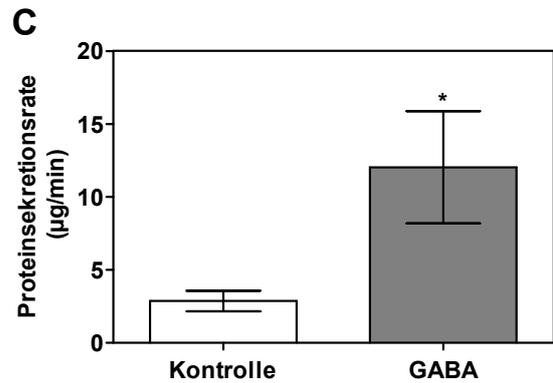


Abb. 3.10 Einfluss von GABA auf die Flüssigkeits- und Proteinsekretionsrate. **(A)** Flüssigkeitssekretionsrate während elektrischer SDN-Stimulierung. Stimulierungsstärke und -dauer, sowie die GABA-Applikationsdauer sind durch horizontale Balken indiziert. Jeder Einzelstimulus dauerte 0,2 ms. Das weiße Rechteck zeigt die 5 Speicheltropfen, die als Kontrolle für C dienen, das hellgraue Rechteck die 5 Speicheltropfen, die als Kontrolle für B dienen. **(B)** Quantitative Auswertung der 7 Versuche aus A. Signifikante Erhöhung der Flüssigkeitssekretionsrate von $6,8 \pm 1,1$ auf $16,7 \pm 1,7$ nl/min ($n = 7$, gepaarter t-Test, * $p < 0,05$). **(C)** Quantitative Auswertung der 7 Versuche aus A. Die Proteinsekretionsrate während 5 min der Kontrollstimulierung (weißes Rechteck in A) wurde mit der Proteinsekretionsrate aus 5 min während der Applikation von GABA (dunkelgraues Rechteck in A) verglichen. Es zeigte sich eine Erhöhung der Proteinsekretionsrate von $2,9 \pm 0,7$ auf $12 \pm 3,8$ μ g/min ($n = 7$, gepaarter t-Test * $p = 0,03$).



3.4. Die tyraminerge und octopaminerge Innervation der Drüse

Tyramin und Octopamin verstärkten die Potentialänderungen der Acinuszellen, die durch elektrische Stimulierung des SDN verursacht wurden. Daher wurde eine präsynaptische Wirkung der beiden Amine auf das Drüsen-assoziierte Nervengewebe angenommen. Um Informationen über eine tyraminerge und/oder octopaminerge Innervation zu erhalten, wurde die Verteilung der beiden Amine im Speicheldrüsenkomplex immunocytochemisch untersucht.

3.4.1. Spezifität der Antikörper

Zunächst wurde die Spezifität der eingesetzten Antikörper mittels Präabsorption untersucht. Dazu wurde der Tyramin-Antikörper für jeweils eine Stunde mit 1 mM Tyramin (Abb. 3.11 C) oder mit 1 mM Octopamin (Abb. 3.11 B) auf dem Schüttler präinkubiert. Der Octopamin-Antikörper wurde ebenso behandelt (Abb. 3.11 E, F). Die Kontrollmarkierungen (Abb. 3.11 A, D) wurden mit Antikörper durchgeführt, der eine Stunde in Blockierlösung geschüttelt wurde, um sicherzugehen, dass die Funktionalität der Antikörper durch das Schütteln nicht beeinträchtigt wurde. Die Octopamin-Immunfluoreszenz wurde nur durch Präabsorption des Antikörpers mit Octopamin unterdrückt (Abb. 3.11 E). Präabsorption des Octopamin-Antikörpers mit Tyramin beeinflusste die Markierung nicht. Dagegen zeigte sich, dass der Tyramin-Antikörper nicht spezifisch für Tyramin war, sondern auch an Octopamin binden konnte, da nach Präinkubation mit Octopamin keine Immunfluoreszenz mehr auftrat. (Abb. 3.11 B). Dieses Problem wurde jedoch als unkritisch angesehen, da ohnehin Tyramin-Immunfluoreszenz in Octopamin-positiven Nerven zu erwarten war, weil Tyramin das Substrat der T β H und somit eine Octopamin-Vorstufe ist.

Im weiteren Verlauf der Arbeit zeigte sich, dass trotz der Unspezifität des Tyramin-Antikörpers verlässliche Markierungen in den Speicheldrüsen der Schabe durchgeführt werden konnten. Eine Kreuzreaktivität der beiden Antikörper zu Dopamin konnte aufgrund des bekannten dopaminergen Innervationsmusters ausgeschlossen werden (siehe Diskussion). Die Spezifität des monoklonalen Octopamin-Antikörpers wurde außerdem durch DACKS *et al.* (2005) anhand einer Dot-Blot-Analyse bestätigt.

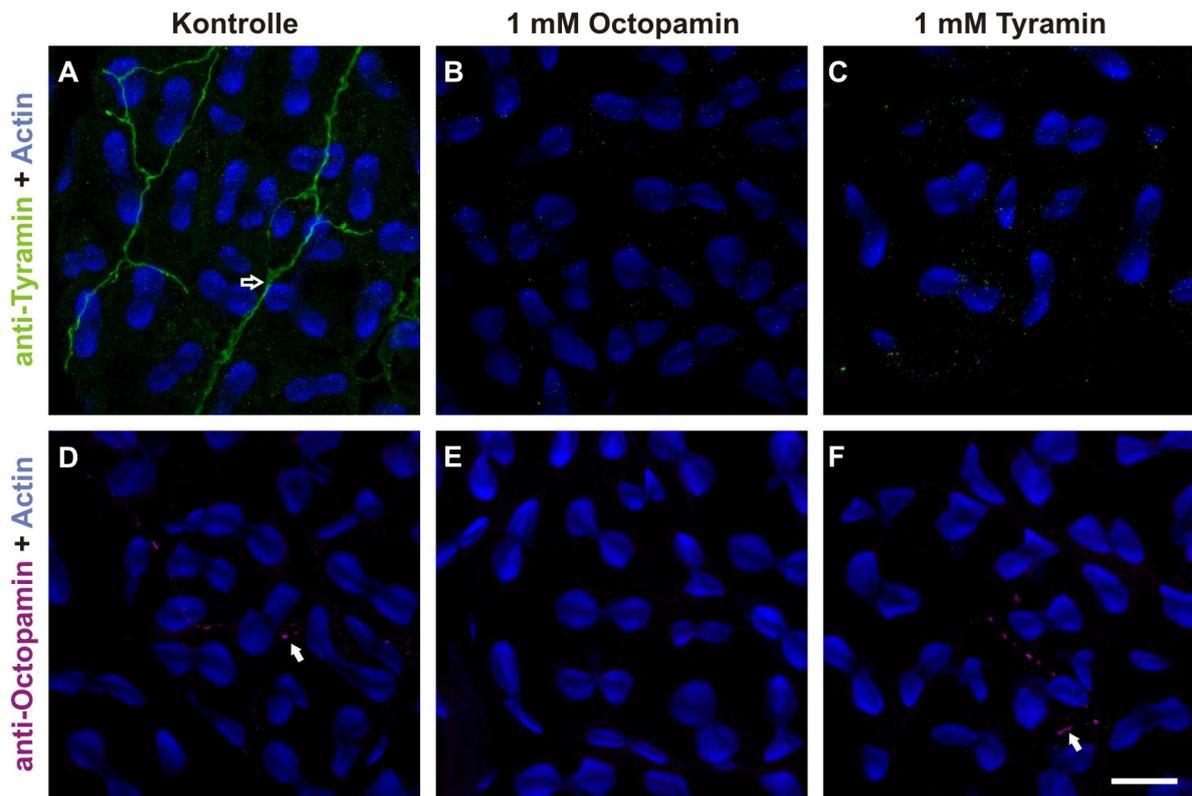


Abb. 3.11 Spezifität der Tyramin- und Octopamin-Markierung an Totalpräparaten. Die Abbildungen zeigen Projektionen von Z-Stapeln, die vom acinösen Gewebe aufgenommen wurden. (A,D) Kontrollmarkierungen mit nicht präinkubiertem Antikörper gegen Tyramin (A, grün) bzw. Octopamin (D, magenta). (B,E) Die Antikörper wurden jeweils mit 1 mM Octopamin präinkubiert. In beiden Präparaten ist keine Markierung vorhanden. (C,F) Die Antikörper wurden jeweils mit 1 mM Tyramin präinkubiert. Die Tyramin-Immunfluoreszenz ist vollständig unterdrückt. Die Octopamin-Markierung bleibt dagegen erhalten. Balken = 20 μ m.

3.4.2. Tyraminerge und octopaminerge Nervenfasern auf den Acini

Die Verteilung tyraminerger und octopaminерger Fasern auf bzw. in den Lobuli wurde an Totalpräparaten isolierter Drüsen untersucht, die mit anti-Tyramin und Alexa Fluor 633 Phalloidin (Abb. 3.12 A-F) oder mit anti-Octopamin und Alexa Fluor 633 Phalloidin (Abb. 3.12 G-L) fluoreszenzmarkiert wurden. Phalloidin markierte insbesondere die F-Actin-reichen apikalen Einfaltungen der P-Zellen und der Gangzellen. Die P-Zellen sind in den folgenden Abbildungen schleifenförmig in Paaren angeordnet. Je zwei P-Zellen indizieren die Basis eines Acinus. In allen Präparaten zeigte sich eine deutliche Immunreaktivität sowohl für Tyramin als auch für Octopamin. Auffallend war die hohe Dichte Tyramin-immunreaktiver Fasern im Vergleich zur Anzahl Octopamin-positiver Fasern. Die Acini der Drüse waren von zahlreichen Tyramin-positiven Nervenfasern überzogen. Wie Abbildung 3.12 zeigt, waren diese Fasern ausschließlich an der Oberfläche der Lobuli zu finden. In keinem der Präparate wurde ein Drüsenläppchen gefunden, bei dem Tyramin- oder Octopamin-immunreaktive Fasern zwischen den Acinuszellen hindurch in die Tiefe eines Drüsenläppchens zogen (Abb. 3.12).

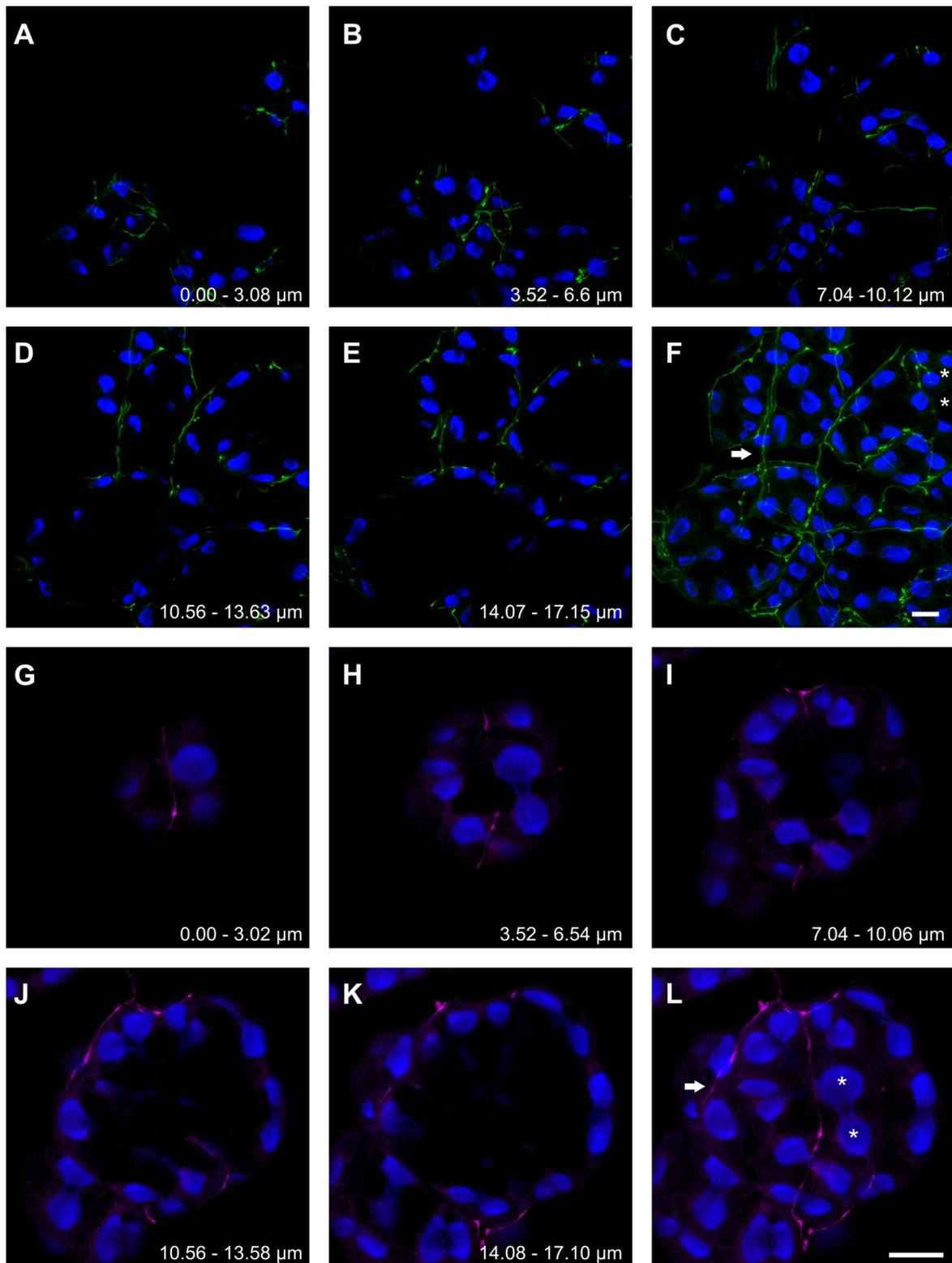


Abb. 3.12. Verteilung Tyramin- und Octopamin-positiver Nervenfasern über den Acini von Totalpräparaten. (A-F) Drüsenlobuli, auf deren Oberfläche Tyramin-immunreaktive Fasern entlang ziehen. Doppelmarkierung mit anti-Tyramin (grün) und Alexa Fluor 488 Phalloidin (blau). (G-L) Drüsenlobuli, auf deren Oberfläche Octopamin-immunreaktive Fasern entlang ziehen. Doppelmarkierung mit anti-Octopamin (magenta) und Alexa Fluor 488 Phalloidin (blau). A-E und G-K zeigen von der Oberfläche des Drüsenläppchens angefangen jeweils unterschiedliche Bereiche des Bildstapels als Projektion. F und L zeigen jeweils die Summation der Bildstapel aus A-E und G-K mit einer Gesamtdicke von etwa 17 µm. Balken in F, L = 20 µm.

3.4.3. Verteilung der Tyramin- und Octopamin-immunreaktiven Nervenfasern über dem Speicheldrüsenkomplex – Co-Lokalisation von Tyramin und Octopamin

Tyramin ist die Synthese-Vorstufe von Octopamin. Daher war zu erwarten, dass Octopamin-positive Nervenfasern auch Tyramin-Immunreaktivität zeigen. Wie oben gezeigt, war der Tyramin-Antikörper auch in der Lage, an Octopamin zu binden, so dass in doppelmarkierten Fasern sowohl Tyramin als auch Octopamin durch anti-Tyramin markiert sein konnten. Interessant war deshalb die Verteilung von Fasern, die zwar Tyramin-Immunreaktivität zeigten, jedoch Octopamin-negativ waren.

Gesamtpräparate wurden mit anti-Tyramin, anti-Octopamin und Alexa Fluor 633 Phalloidin dreifachmarkiert und die co-Lokalisation der beiden Amine untersucht. Dabei zeigte sich, dass sowohl die erwartete co-Lokalisation beider Amine als auch Tyramin-Immunreaktivität ohne Octopamin co-Lokalisation zu finden war. Es gab also Fasern, die Tyramin-positiv waren, und Fasern, die sowohl Tyramin- als auch Octopamin-positiv waren. Dabei war sehr oft zu beobachten, dass die Intensität der Tyramin-Markierung in den Tyramin-positiven Fasern scheinbar höher war als in Octopamin-positiven Fasern (Abb. 3.14). Diese Ergebnisse waren in vier unabhängigen Fluoreszenzmarkierungen an jeweils zwei bis vier dreifachmarkierten Präparaten reproduzierbar. Zur vereinfachenden Beschreibung werden in dieser Arbeit zwei Fasertypen unterschieden: Solche, die ausschließlich Tyramin-Immunreaktivität zeigten, werden im weiteren Verlauf dieser Arbeit als Typ1-Fasern bezeichnet. Fasern, die sowohl Tyramin- als auch Octopamin-immunreaktiv waren, werden als Typ2-Fasern bezeichnet.

Im Speicheldrüsenerv, der dem Reservoirgang anliegt, wurden in fast allen Präparaten dünne Fasern markiert (Abb. 3.13). Es waren maximal drei Typ2-Fasern pro SDN eindeutig identifizierbar. In einem Präparat war neben Typ2-Fasern auch eine Typ1-Faser im SDN enthalten.

Der SDN verzweigt sich zunehmend während er am Reservoirgang und zwischen bzw. über den Acini verläuft. Nervengewebe, das zwischen verschiedenen Acini oder zwischen Acini und dem Reservoir verlief, enthielt besonders viele Typ2-Fasern (Abb. 3.14). Auf den Acini hingegen wurden weniger Typ2- und deutlich mehr Typ1-Fasern markiert (Abb. 3.15, Vgl. Abb. 3.12 F, L).

Auf den Hauptausführgängen waren in allen Präparaten Netzwerke von Typ2-Fasern markiert (Abb. 3.16 A-D, I-L). Diese Netzwerke lagen nahe der Stelle, an der die Gänge sich zu einem Hauptausführgang vereinigen, also auf den Bereichen, die entlang der Reservoirgänge verlaufen. Die Gänge niedrigerer Ordnung waren im Allgemeinen frei von immunreaktiven Fasern beider Typen. Nur in zwei Präparaten konnte ein kleinerer Gang mit einer Faser auf der Oberfläche gefunden werden (Abb. 3.16 E-H). Die Netzwerk-bildenden Fasern auf den Speichelausführgängen, sowie die Fasern auf den Gängen

niedrigerer Ordnung verliefen nur oberflächlich über dem Gangepithel ohne in dieses einzudringen (Abb. 3.16 D, H, L).

Auf den Reservoiringängen wurden Nervenstränge gefunden, in denen sowohl Typ1- als auch Typ2-Fasern markiert wurden (Abb. 3.17 A-C).

Auf den Reservoirs wurden ebenfalls sowohl Typ1- als auch Typ2-Fasern gefärbt, die sich zum Teil weiträumig über dem Reservoir verzweigten (Abb. 3.17 D-F). Das Vorkommen der immunreaktiven Fasern war auf die Basisregion der Reservoirs beschränkt. Auf dem distalen Bereich der Reservoirs wurden keine Fasern markiert.

Der Reservoirmuskel war an seinem Ansatz ebenfalls durch beide Fasertypen innerviert (Abb. 3.17 G-I).

Abb. 3.13 Verteilung Tyramin- und Octopamin-immunreaktiver Fasern im SDN. **(A-H)** Gesamtpräparate wurden mit anti-Tyramin, anti-Octopamin und Alexa Fluor 633 Phalloidin dreifach markiert. Die Abbildungen zeigen Projektionen aus Z-Stapeln. **(E-H)** Im SDN fanden sich in vielen untersuchten Präparaten sowohl Typ1- (offene Pfeile) als auch Typ2-Fasern (gefüllte Pfeile). Rg = Reservoiringang. Balken in D, H = 10 µm.

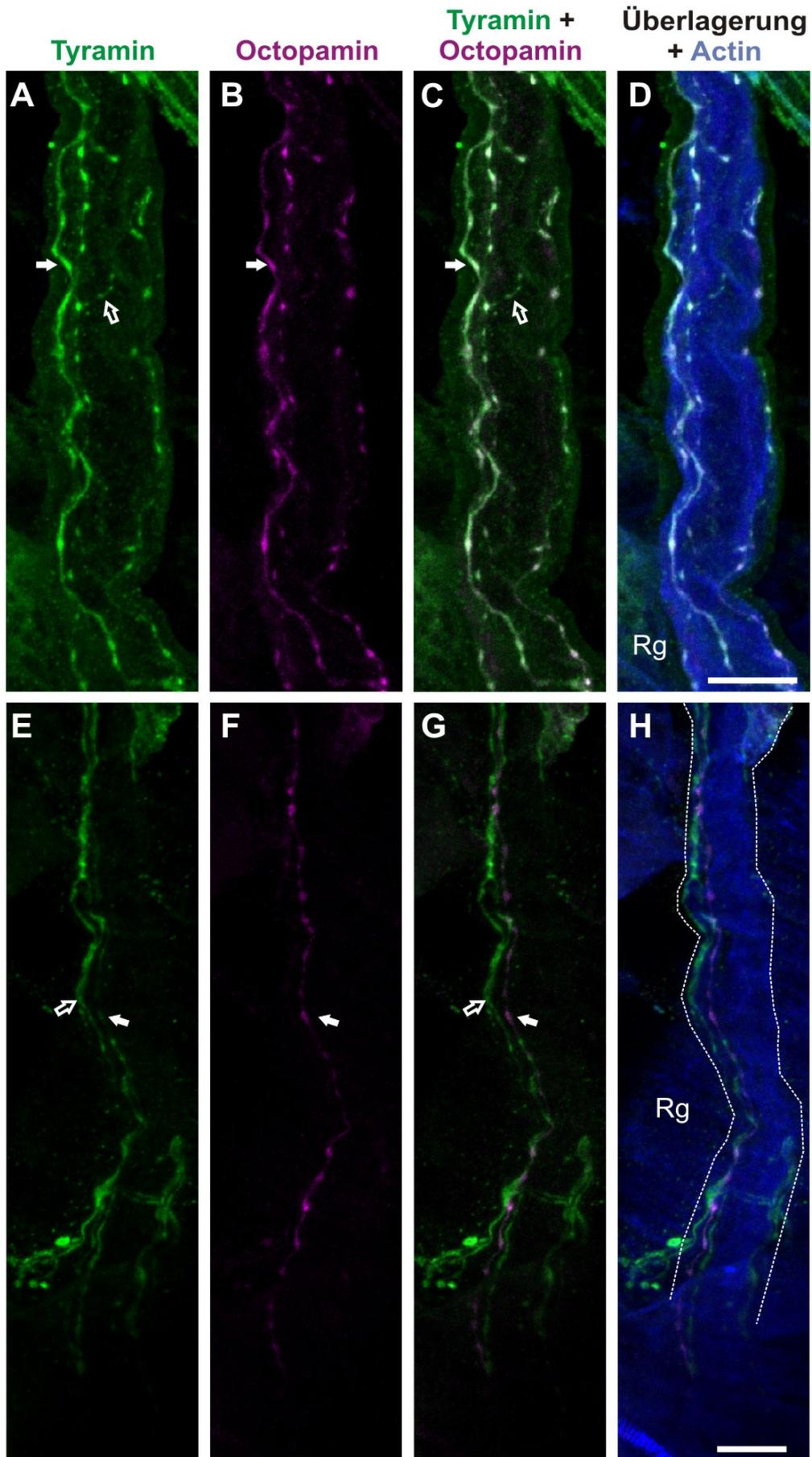


Abb. 3.13

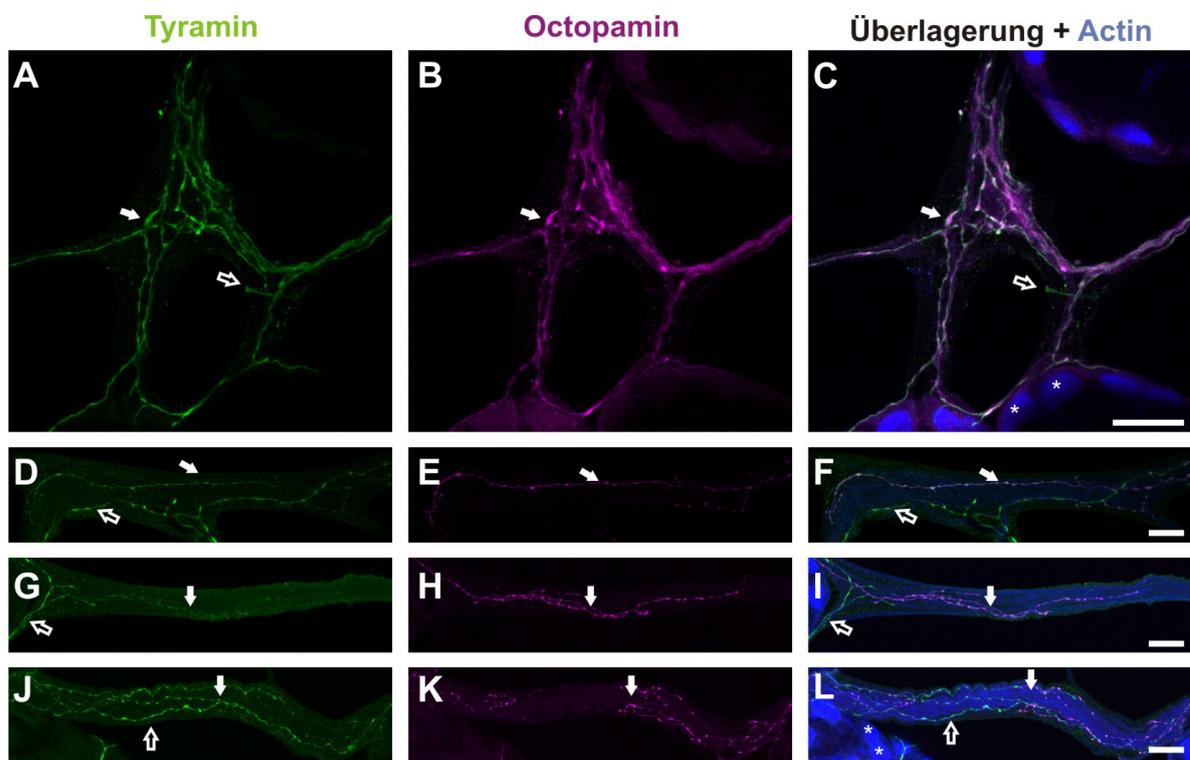


Abb. 3.14 (A-L) Nervenfasern, die verschiedene Lobuli miteinander verbinden. Dreifachmarkierung von Totalpräparaten mit anti-Tyramin (grün), anti-Octopamin (magenta) und Phalloidin (blau). Die Abbildungen zeigen Projektionen aus Z-Stapeln. Offene Pfeile deuten auf Typ1-, gefüllte Pfeile auf Typ2-Fasern. Alle Nervenstränge enthalten beide Fasertypen. Balken = 20 μ m.

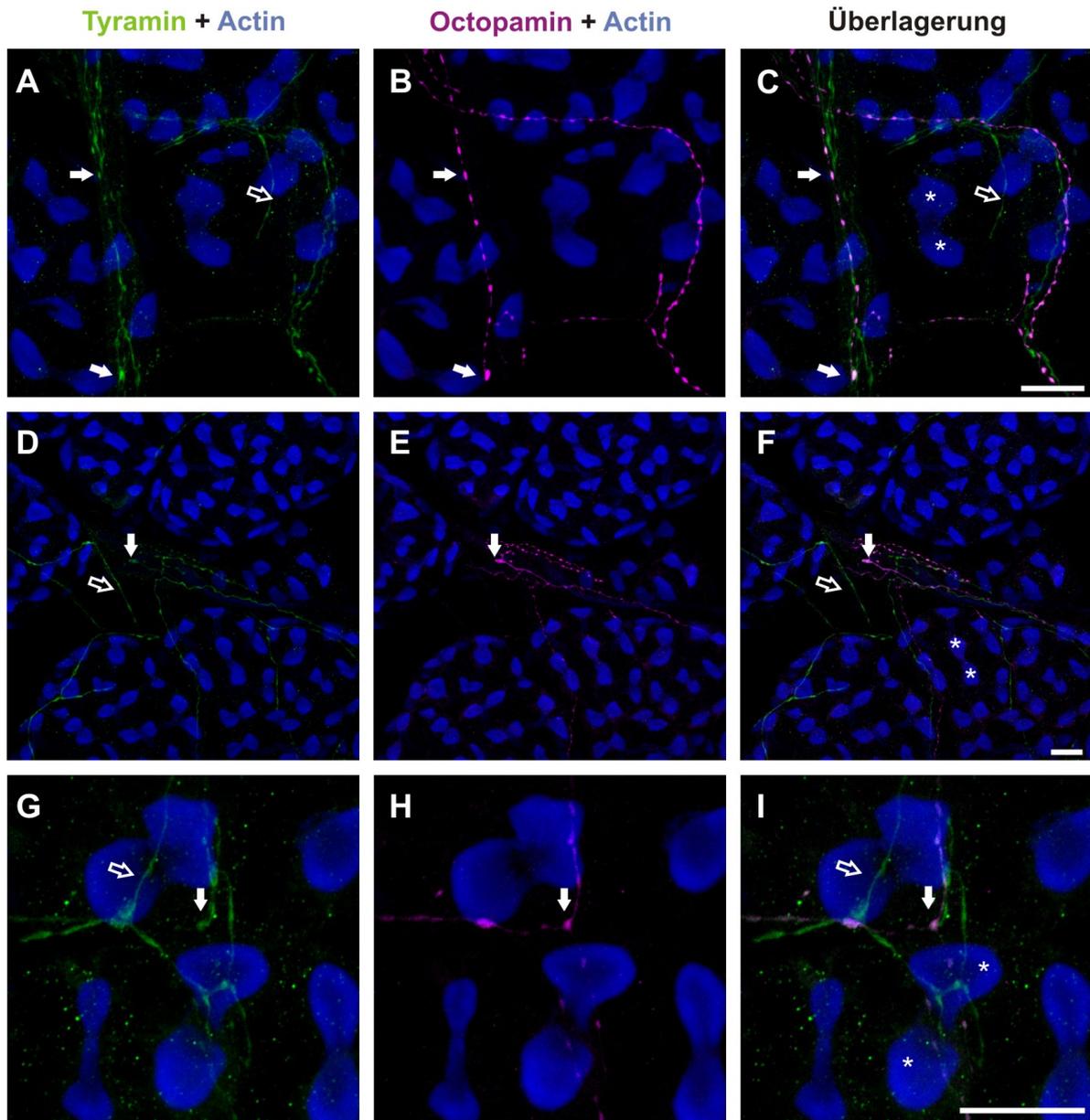


Abb. 3.15 Verteilung der beiden Fasertypen über den Acini. Dreifachmarkierung von Totalpräparaten mit anti-Tyramin (grün), anti-Octopamin (magenta) und Phalloidin (blau). Die Abbildungen zeigen Projektionen aus Z-Stapeln. Sterne markieren P-Zellen. Offene Pfeile deuten auf Typ1-Fasern, gefüllte Pfeile auf Typ2-Fasern. (A-C) Nervenfasern, die über verschiedene Lobuli ziehen und beide Fasertypen enthalten. (D-F) Nervenfasern, die mehrere Lobuli verbinden und über die Acini (Sternchen = P-Zellen) ziehen. Auch hier sind beide Fasertypen zu erkennen. (G-I) Nervenfasern in stärkerer Vergrößerung. Die Tyramin-Immunreaktivität ist in Typ1-Fasern stärker ausgeprägt als in Typ2-Fasern. Balken = 20 μm .

Abb. 3.16 Innervation der Speicheldrüsengänge. Dreifachmarkierung von Totalpräparaten mit anti-Tyramin (grün), anti-Octopamin (magenta) und Phalloidin (blau). Die Abbildungen zeigen Projektionen aus Z-Stapeln. Auf den Gängen wurden ausschließlich Typ2-Fasern gefunden. (A-D) Nervenstrang mit Typ2-Fasern über dem Hauptausführgang. (D) Optischer Querschnitt durch den Bildstapel in C. Die Nervenfasern dringen nicht in das Gangepithel ein. (E-G) Typ2-Faser über einem Gang niedrigerer Ordnung in der Nähe der Acini. An diesen Gängen konnte nur in zwei Präparaten eine Tyramin- bzw. Octopamin-positive Innervation nachgewiesen werden, von denen hier ein Beispiel gezeigt ist. (H) Optischer Querschnitt durch den Bildstapel in G. Die Faser verläuft oberflächlich auf dem Gangepithel. (I-L) Auf dem Hauptausführgang befanden sich in den meisten Präparaten relativ dichte Netzwerke von Typ2-Fasern, die ebenfalls nur auf der Oberfläche des Epithels verliefen (L). lu = Ganglumen. e = Gangepithel. Balken in C, K = 20 μm , G = 10 μm .

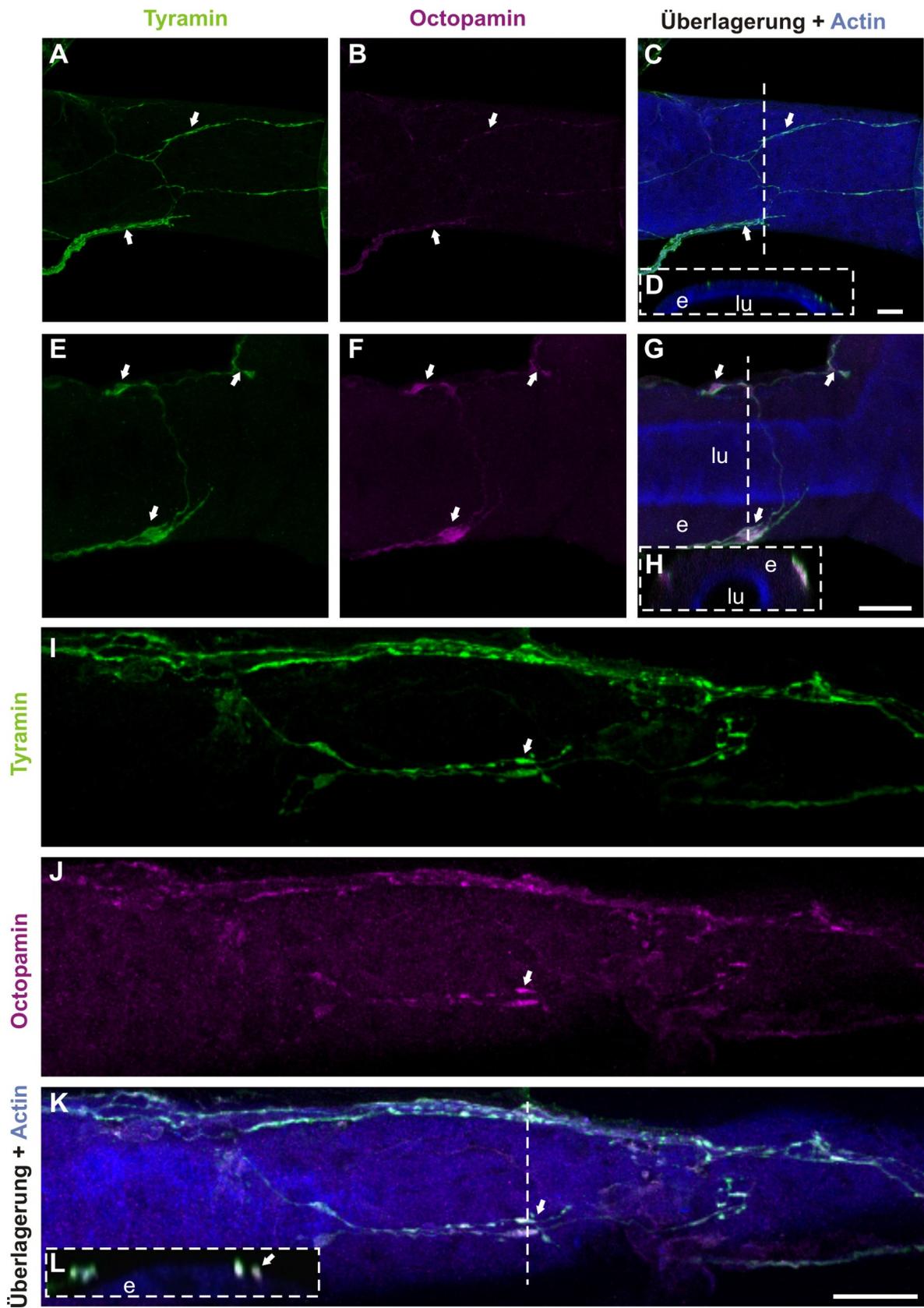


Abb. 3.16

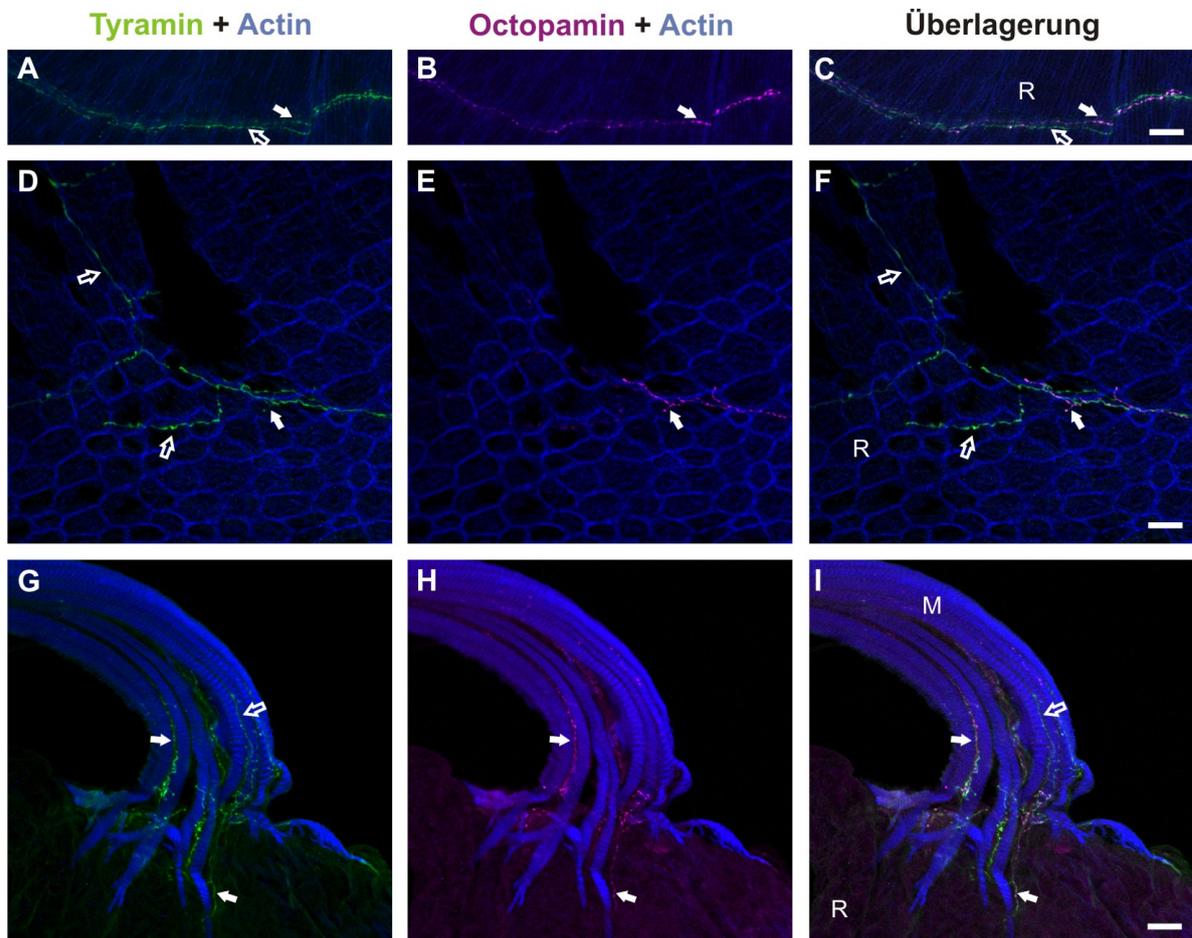


Abb. 3.17 Reservoir und Reservoirmuskel. Dreifachmarkierung von Totalpräparaten mit anti-Tyramin (grün), anti-Octopamin (magenta) und Phalloidin (blau). Die Abbildungen zeigen Projektionen aus Z-Stapeln. Offene Pfeile deuten auf Typ1-Fasern, gefüllte Pfeile auf Typ2-Fasern. **(A-C)** Reservoiringang (R) mit Faserstrang in dem beide Fasertypen verlaufen. **(D-F)** Typ1- und Typ2-Fasern, die oberflächlich auf dem Reservoir (R) verlaufen. **(G-I)** Ansatz des Reservoirmuskels (M) am Reservoir. Der Muskel wird durch beide Fasertypen innerviert. Balken = 20 μ m.

3.5. Verteilung des Tyramin-Rezeptors PeaTYR1 im Speicheldrüsenkomplex

Ein bereits charakterisierter Tyramin-Rezeptor der Schabe (PeaTYR1) konnte mittels RT-PCR auch in den Speicheldrüsen nachgewiesen werden (C. KRACH, Dissertation 2006, ROTTE *et al.* 2009b). Im Zuge jener Arbeit wurde auch ein spezifischer Antikörper gegen den Rezeptor generiert. Aufgrund methodischer Probleme konnte die eindeutige Verteilung des Rezeptors in der Speicheldrüse jedoch nicht aufgeklärt werden. Daher habe ich die Untersuchung der Rezeptorverteilung erneut aufgegriffen. Gesamtpräparate wurden mit Paraformaldehyd fixiert und mit anti-PeaTYR1 und Alexa Fluor 488 Phalloidin doppelmarkiert. Dabei zeigte sich eine hochlokale Ansammlung der PeaTYR1-Immunfluoreszenz in einem paarigen Nerv unbekanntes Ursprungs, der das acinöse Gewebe der Drüse beidseitig etwa in Höhe der Reservoirbasis erreicht (Abb. 3.19 A, schematische Darstellung). Dieser Nerv wurde oft von einer Tracheole begleitet. Der variköse Nerv verzweigt sich anschließend über den peripheren Lobuli, wo er oberflächlich über die Acini zieht.

3.5.1. Lokalisation von Transmitterfreisetzungsstellen an dem PeaTYR1-immunreaktiven Nerven

Die PeaTYR1-Immunfluoreszenz war an lokalen Aufweitungen der markierten Axone besonders intensiv. Es sollte untersucht werden, ob es sich dabei um Transmitterfreisetzungsstellen (Varikositäten) handelt, und ob sich die Rezeptor-immunreaktiven Regionen in der Nähe anderer Freisetzungsstellen befinden. Dazu wurden Paraformaldehyd-fixierte Totalpräparate mit anti-PeaTYR1-CPL3, anti-Synapsin (SYNORF1) und Alexa Fluor 633 Phalloidin dreifachmarkiert. Synapsin vermittelt die Verankerung von Transmitter-gefüllten Vesikeln im Aktin-Netzwerk (KLAGGES *et al.* 1996). Der monoklonale Antikörper SYNORF1 gegen *Drosophila* Synapsin kreuzreagiert mit dem Synapsin der Schabe, wie bereits durch BAUMANN *et al.* (2004) gezeigt wurde.

Die Rezeptormarkierung co-lokalisiert nur teilweise mit der Synapsin-Markierung. Sowohl Rezeptor- als auch Synapsin-Markierung waren perlschnurartig über die Fasern verteilt, co-lokalisierten aber kaum. Jedoch befinden sich zumindest in der Nähe der Rezeptormarkierung meist Synapsin-Foci.

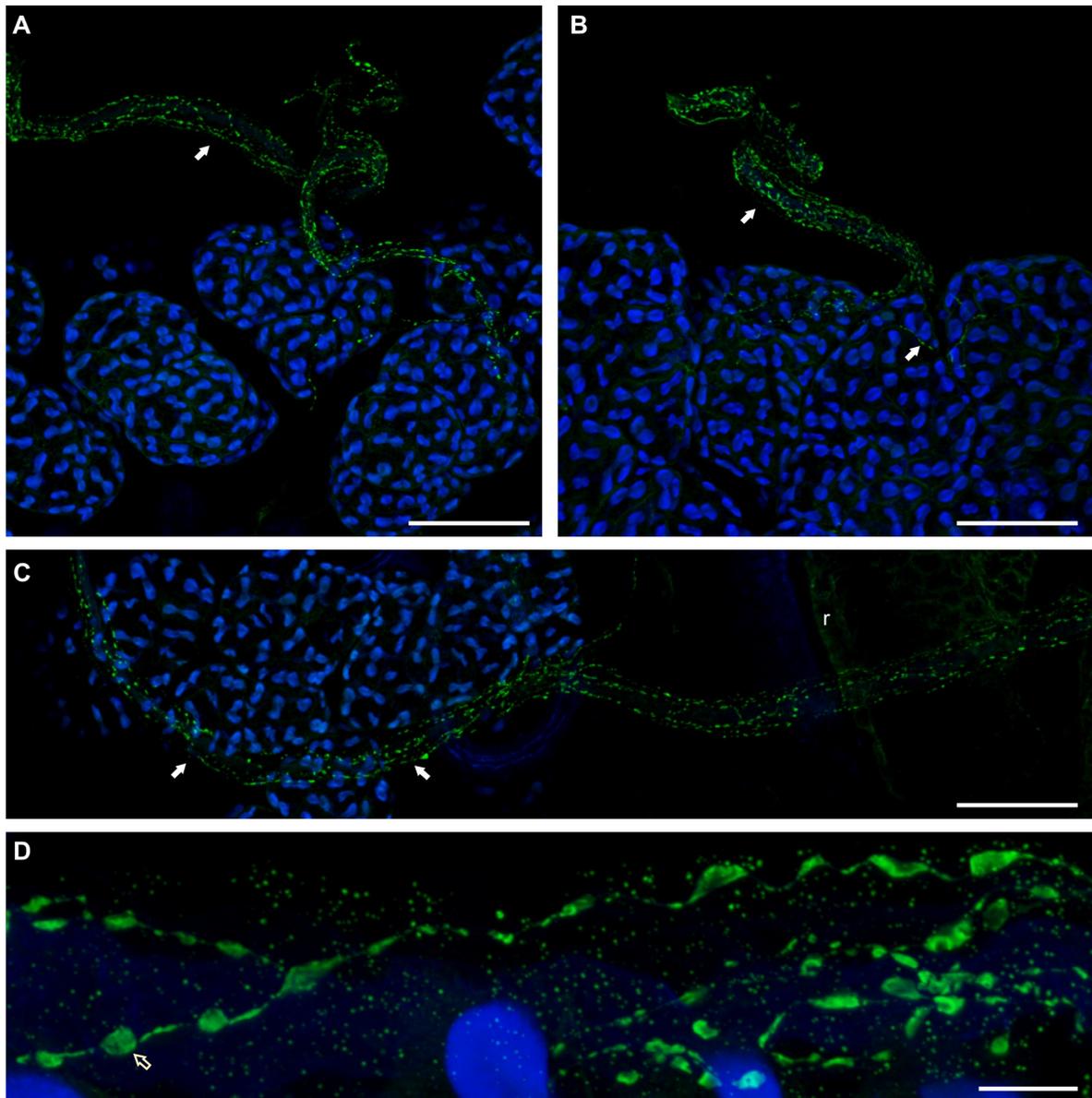


Abb. 3.18 Verteilung des Tyramin-Rezeptors PeaTYR1 in Totalpräparaten. Doppelmarkierung mit anti-PeaTYR1-CPL3 (grün) und Alexa Fluor 488 Phalloidin (blau). (**A-C**) Übersichtsaufnahmen. Der Nerv (gefüllte Pfeile) zieht lateral zur Drüse und verzweigt sich über den peripheren Acini. (**D**) Nerv in der Nähe der P-Zellen peripherer Lobuli. Die Aufweitungen der Fasern repräsentieren wahrscheinlich Transmitterfreisetzungstellen (offener Pfeil). Balken in A-C = 100 μ m, D = 10 μ m.

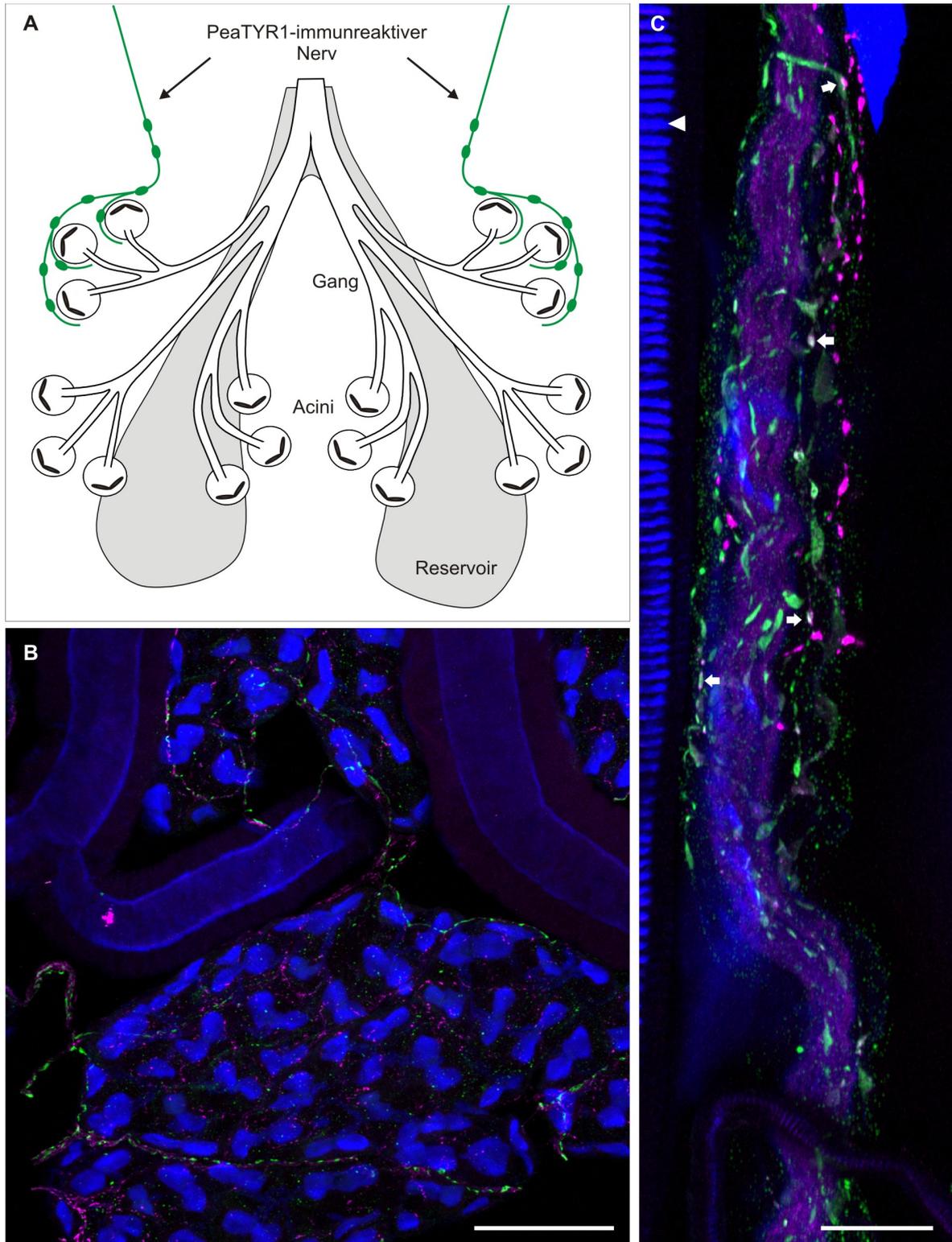


Abb. 3.19 Assoziation des PeaTYR1 mit Synapsin-Foci. Dreifachmarkierung an Gesamtpräparaten mit anti-PeaTYR1 (grün), SYNORF1 (Magenta) und Alexa Fluor 633 Phalloidin (blau). B und C zeigen Projektionen aus Z-Stapeln. (A) Schematische Darstellung der Drüse mit Eintrittsregion des PeaTYR1-immunreaktiven Nervs. (B) Übersichtsaufnahme peripherer Acini und Gänge. In der äußeren Region der Drüse verzweigt sich der PeaTYR1-immunreaktive Nerv über den Acini. (C) Größere Darstellung eines PeaTYR1-immunreaktiven Nervs. Der Rezeptor co-lokalisiert hier nur teilweise mit Synapsin (weiße Pfeile). Der Nerv erreichte die Drüse in den meisten Präparaten zusammen mit einer Tracheole (Pfeilkopf). Balken in B = 50 µm, in C = 20 µm.

3.6. Eigenschaften der Dopamin-induzierten Änderungen des basolateralen Membranpotentials

3.6.1. Die ionalen Konzentrationsgradienten an der basolateralen Membran

Dopamin verursachte multiphasische Änderungen des V_{bl} . Um die Dopamin-induzierten Potentialänderungen der basolateralen Membran zu untersuchen und zu verstehen, war es wichtig, die ionalen Konzentrationsgradienten zu kennen. GUPTA & HALL (1983) untersuchten die ionale Zusammensetzung des Cytoplasmas in Acinuszellen von unstimulierten und stimulierten *P. americana* Speicheldrüsen mit Hilfe der Elektronenstrahl-Röntgenmikroanalyse. Anhand der in dieser Arbeit veröffentlichten Konzentrationswerte konnten anhand der Nernst-Gleichung $E_{ion} = 58 / z \times \log ([ion]_a / [ion]_i)$ näherungsweise die Gleichgewichtspotentiale für Na^+ , K^+ und Cl^- vor und während einer Dopamin-Stimulierung berechnet werden. Die berechneten Potentiale ($E_{ion,ruhe}$ für unstimulierte Drüsen, $E_{ion,stim}$ für stimulierte Drüsen) sind in Tabelle 3.1 und in Abb. 3.20 A dargestellt. Abbildung 3.20 A zeigt außerdem die mittleren Potentialänderungen während einer Dopamin-Stimulierung aus 28 Messungen.

Das Ruhe- V_{bl} der Acinuszellen betrug -49 ± 1 mV ($n = 28$, MW \pm SF) und lag somit zwischen den Gleichgewichtspotentialen für K^+ und Cl^- . Stimulierung der Drüsen mit $1 \mu M$ Dopamin verändert die ionale Zusammensetzung des Cytoplasmas. Dabei steigt $[Na^+]_i$ von 10 auf 25 mM, $[K^+]_i$ von 110 auf 177 mM und $[Cl^-]_i$ von 39 auf 58 mM (GUPTA & HALL 1983).

Bei Stimulierung der Drüsen mit $1 \mu M$ Dopamin hyperpolarisierte das V_{bl} auf -61 ± 1 mV ($n = 28$, MW \pm SF). Dieser Wert entsprach etwa dem E_K (Abb. 3.20 A). Anschließend depolarisierte das V_{bl} auf -24 ± 1 mV ($n = 28$, MW \pm SF), wobei es sich dem E_{Cl} annäherte (Abb. 3.20 A).

Tab. 3.1 Ionale Zusammensetzung des Cytoplasmas der Acinuszellen vor und während der Stimulierung mit $1 \mu M$ Dopamin und die daraus berechneten Gleichgewichtspotentiale für Na^+ , K^+ und Cl^- . *aus GUPTA & HALL (1983).

	Konzentration extrazellulär (mM)	Konzentration* intrazellulär unstimuliert (mM)	$E_{ion,ruhe}$ (mV)	Konzentration* intrazellulär stimuliert (mM)	$E_{ion,stim}$ (mV)
Na^+	160	10	+70	25	+47
K^+	10	110	-60	177	-72
Cl^-	178	39	-38	58	-28

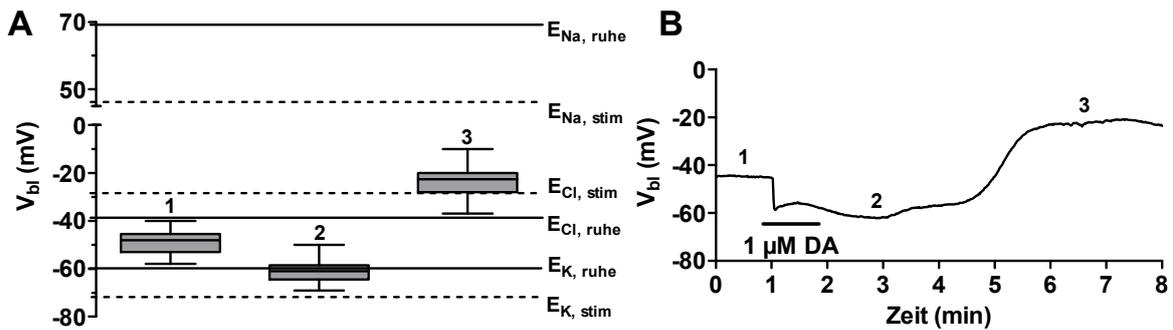
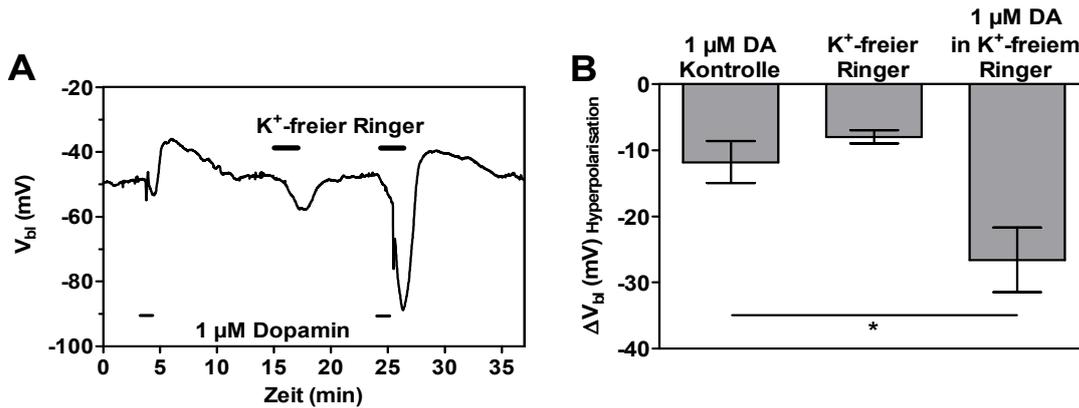


Abb. 3.20 (A) Durchschnittliche Dopamin-induzierte V_{bl} -Änderungen (mV) in den Acinuszellen ($n = 28$). Die Gleichgewichtspotentiale E_{ion} für Na^+ , K^+ und Cl^- wurden für stimulierte und unstimulierte Drüsen dargestellt. Die Berechnung erfolgte mittels der durch GUPTA & HALL (1983) publizierten Werte. (B) Beispielregistrierung. Die Drüse wurde mit $1 \mu M$ Dopamin stimuliert (horizontaler Balken). Die in A dargestellten Antwortphasen sind wie folgt gekennzeichnet: 1 = Ruhemembranpotential, 2 = Hyperpolarisation, 3 = Depolarisation.

3.6.2. Der basolaterale Ca^{2+} -gesteuerte K^+ -Kanal

Da sich das V_{bl} nach Dopamin-Stimulierung während der Hyperpolarisation dem E_K nähert, sollte untersucht werden, ob sich während der Hyperpolarisationsphase die K^+ -Leitfähigkeit ändert. Dazu wurde während der Dopamin-Stimulierung für zwei Minuten die elektrochemische Triebkraft für K^+ durch Einspülen eines K^+ -freien Ringers erhöht. Nach einer Kontrollstimulierung mit $1 \mu M$ Dopamin in Tris-Ringer wurde für zwei Minuten K^+ -freier Ringer eingespült. Dabei trat eine langsame Hyperpolarisation der Membran um etwa 8 ± 1 mV ($n = 3$) auf. Nachdem das Membranpotential in Tris-Ringer zum Ruhewert repolarisiert war, wurde für weitere zwei Minuten K^+ -freier Ringer eingespült, wobei die Drüsen während der 1. Minute mit $1 \mu M$ Dopamin stimuliert wurden (Abb. 3.21 A). Dies führte zu einer Hyperpolarisation auf -72 ± 5 mV ($n = 5$). Diese war gegenüber der Hyperpolarisation während der Kontrollstimulierung in Tris-Ringer (-58 ± 3 mV) um 13 ± 5 mV stärker (Abb. 3.21 B). Diese Ergebnisse sind ein starker Hinweis auf eine erhöhte K^+ -Leitfähigkeit während der Dopamin-Stimulierung.

Abb. 3.21 Abhängigkeit der ΔV_{bl} während der Hyperpolarisation von der extrazellulären K^+ -Konzentration. (A) Kontrollstimulierung mit Dopamin resultiert in multiphasischen V_{bl} -Änderungen. Applikation von K^+ -freiem Ringer führt zu einer Hyperpolarisation des V_{bl} um 8 ± 1 mV ($n = 3$). Kurzzeitige Erhöhung der elektrochemischen Triebkraft für K^+ während der Dopamin-Stimulierung resultiert in einer stärkeren Hyperpolarisation. (B) Quantitative Zusammenfassung der Messungen aus A. Signifikante Verstärkung der Dopamin-induzierten Hyperpolarisation ($1 \mu M$ DA Kontrolle und $1 \mu M$ DA in K^+ -freiem Ringer $n = 5$, MW \pm SF, gepaarter t-Test, $p = 0,04$; K^+ -freier Ringer $n = 3$).



In *N. cinerea* Acinuszellen, die ebenfalls mit einer Hyperpolarisation auf eine Dopamin-Stimulierung antworten, wurde durch GINSBORG *et al.* (1980a,b) gezeigt, dass diese Hyperpolarisation durch die Aktivierung eines Ca^{2+} -gesteuerten K^+ -Kanals verursacht wird. Zur Untersuchung der Ca^{2+} -Abhängigkeit der Hyperpolarisation in *P. americana* Speicheldrüsen wurden die Drüsen in Ca^{2+} -freiem Ringer stimuliert. Nach einer Kontrollstimulierung mit $1 \mu M$ Dopamin wurde Ca^{2+} -freier Ringer eingespült und erneut stimuliert. Erst nach wiederholter Stimulierung in Ca^{2+} -freiem Ringer verkleinerten sich die V_{bi} -Änderungen, wobei zunächst die Hyperpolarisation ausblieb und die Depolarisation stark verkleinert war. Diese Experimente zeigen, dass kein Ca^{2+} -Einstrom aus dem Extrazellularraum notwendig ist, um eine vollständige Dopamin-induzierte Zellantwort zu induzieren. Interessanterweise depolarisierte das Membranpotential der Acinuszellen in Ca^{2+} -freiem Ringer um $8,5 \pm 1$ mV von -52 ± 2 mV auf -44 ± 2 mV (MW \pm SF, $n = 8$). Nach Einspülen von Tris-Ringer repolarisierte das V_{bi} wieder zum Ruhewert (Abb. 3.22 A).

Da die Dopamin-induzierte Hyperpolarisation des V_{bi} erst einmal unempfindlich gegenüber der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration war, wurde eine intrazelluläre Ca^{2+} -Freisetzung angenommen, die zur Öffnung der K^+ -Kanäle führt. Zur Untersuchung dieser Hypothese wurden die Drüsen geteilt und je eine Stunde in Tris-Ringer, in DMSO-haltigem Tris-Ringer oder in $20 \mu M$ BAPTA/AM inkubiert. Der Acetoxymethylester des Ca^{2+} -Chelators BAPTA kann aufgrund seiner Hydrophobizität die Membran passieren. Zelleigene Esterasen spalten dann den Methylrest ab und der Ca^{2+} -Chelator liegt als freie Form im Cytoplasma vor.

Dopamin-Stimulierung der Drüsen, die in Tris- und DMSO-haltigem Tris-Ringer inkubiert wurden, verursachte multiphasische Änderungen des V_{bi} , wie sie bereits unter 3.1. beschrieben wurden (Abb. 3.22 C). Wurden die BAPTA-inkubierten Drüsen mit $1 \mu M$ Dopamin stimuliert, blieb die Hyperpolarisation vollständig aus (Abb. 3.22 D). Die Amplitude der Depolarisationsphase der Zellantworten war unter diesen Bedingungen von 18 ± 1 mV auf 25 ± 2 mV ($n = 8$, MW \pm SF, $p = 0,01$) signifikant verstärkt.

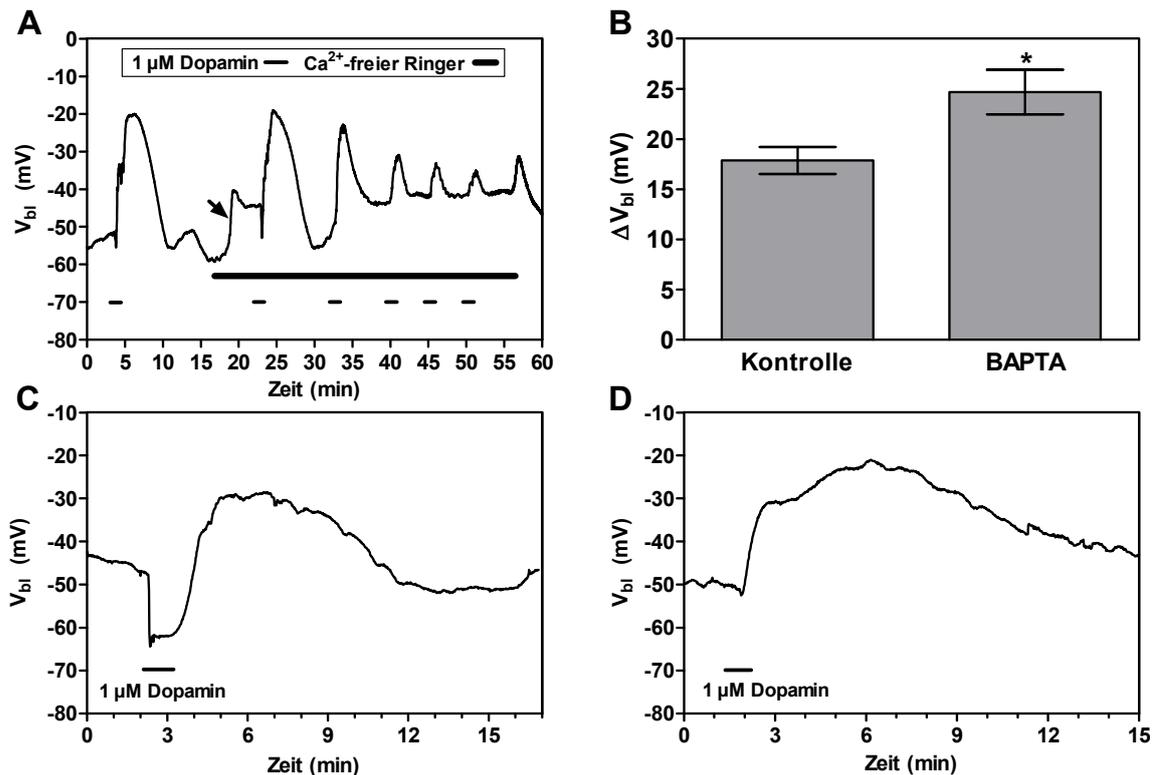


Abb. 3.22 Abhängigkeit der Dopamin-induzierten V_{bi} -Änderungen von der Verfügbarkeit extrazellulärer bzw. intrazellulärer Ca^{2+} -Ionen. **(A)** Dopamin-Stimulierung in Ca^{2+} -haltigem und Ca^{2+} -freiem Ringer. Nach einer Kontrollstimulierung wurde Ca^{2+} -freier Ringer eingespült (dicker Balken). Dabei depolarisierte das V_{bi} um $8,5 \pm 1$ mV ($n = 8$). Nachdem Tris-Ringer eingespült wurde, repolarisierte das V_{bi} wieder zum Ruhewert. Wiederholte Dopamin-Stimulierung in Abwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} führt zur schrittweisen Abnahme der Antwortamplituden. Bereits bei der zweiten Stimulierung fehlte die Hyperpolarisationsphase. **(B-D)** Abhängigkeit der Hyperpolarisationsphase von intrazellulärer Ca^{2+} -Freisetzung. **(C)** Kontrollstimulierung einer Drüse, die 1 Stunde in Ringer inkubiert wurde. **(D)** Stimulierung einer Drüse, die 1 Stunde in 20 μ M BAPTA/AM inkubiert wurde. Die Hyperpolarisation ist vollständig unterdrückt. **(B)** Die Amplitude der Depolarisationsphase ist in BAPTA-beladenen Drüsen signifikant vergrößert.

3.6.3. Messungen intrazellulärer Ca^{2+} -Änderungen

Die oben beschriebenen Experimente lassen vermuten, dass die Dopamin-induzierte Hyperpolarisation in den Acinuszellen durch eine Ca^{2+} -gesteuerte K^+ -Leitfähigkeit hervorgerufen wird. Des Weiteren wurde gezeigt, dass das Auftreten der Hyperpolarisation eine Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern erfordert. Demzufolge sollte in den Acinuszellen nach Dopamin-Stimulierung ein intrazellulärer Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration erfolgen. Diese Hypothese wurde mittels mikrofluorometrischer Messungen mit dem Ca^{2+} -sensitiven Fluoreszenzfarbstoff Fura Red untersucht. Nach einer Stunde Inkubationszeit mit 40 μ M Fura Red zeigte sich in den Gangzellen grundsätzlich eine intensivere Beladung als in den Acinuszellen. Darüber hinaus beluden im acinösen Gewebe ausschließlich die P-Zellen mit Fura Red, wobei die Beladung weniger intensiv war als im Gangepithel. In den C-Zellen konnte kein Signal detektiert werden. Aus diesem Grund wurde die Beladungszeit auf bis zu 4 Stunden verlängert. Die Beladung der

Acinuszellen verbesserte sich dennoch nicht wesentlich. Um eine stärkere Farbstoffaufnahme zu erreichen, wurden die Drüsen außerdem 15 min bis 60 min in hypoosmotischem Ringer (1 Teil Aqua dest., 2 Teile Ringer) mit 40 μM Fura Red inkubiert. Auch dabei konnte keine bessere Beladung der Acinuszellen erreicht werden. Trotzdem wurde versucht, einen Dopamin-induzierten $[\text{Ca}^{2+}]$ -Anstieg zu messen.

Stimulierung der Drüsen mit 1 μM Dopamin resultierte in einem deutlichen Ca^{2+} -Anstieg in den Gangepithelzellen, wie er zuvor durch HILLE & WALZ (2008) beschrieben wurde. In den Acinuszellen konnte auch nach wiederholter Dopamin-Stimulierung keine Ca^{2+} -Änderung registriert werden. Um zu überprüfen, ob dies an einer zu geringen Beladung der Zellen mit Fura Red oder an unzureichender Aktivität zelleigener Esterasen lag, wurden 10 μM Ionomycin-haltige Ringerlösungen mit drei definierten Ca^{2+} -Konzentrationen hergestellt. Ionomycin ist ein Ca^{2+} -Ionophor, der von dem Bakterium *Streptomyces conglobatus* synthetisiert wird. Der Ionophor erhöht die Permeabilität der Membran für Ca^{2+} und bewirkt somit einen Ausgleich der intra- und extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Die Ca^{2+} -Konzentration der Ringerlösungen betrug 0 nM, 65 nM und 10 mM. Die einzuwiegende CaCl_2 -Menge der 65 nM Ca^{2+} -Lösung wurde nach DEITMER & SCHILD (2000) wie folgt berechnet:

$$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{frei}} = K_{\text{D(EGTA)}} / ([\text{EGTA}]_{\text{total}} / [\text{Ca}^{2+}]_{\text{total}}) - 1 \quad (K_{\text{D(EGTA)}} = 65 \text{ nM bei pH } 7,4)$$

Die *ratio* der beiden Fluoreszenzsignale während der Applikation von 0 nM Ca^{2+} wurde als R_{min} bezeichnet, von 65 nM Ca^{2+} als R_{def} und von 10 mM Ca^{2+} als R_{max} . Bei Applikation der verschiedenen Ca^{2+} -Konzentrationen traten auch in den Acini deutliche antiparallele Änderungen der Fluoreszenzintensitäten bei 420 nm und 488 nm und somit der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ auf (Abb. 3.24 C, D). Die Stärke dieser *ratio*-Änderungen war mit den unter diesen Bedingungen aus dem Gangepithel registrierten Änderungen vergleichbar (Abb. 3.24 A, B). Die Beladung der Zellen war somit ausreichend zur Registrierung von intrazellulären Ca^{2+} -Anstiegen. Zum Ende eines jeden Experiments wurde die Fura Red Fluoreszenz mit MnCl_2 *gequencht*. Die zuletzt aufgenommenen Werte einer Registrierung wurden dann als Hintergrundreferenz von allen vorher aufgenommenen Werten abgezogen.

Abb. 3.23 Fluoreszenzbilder einer mit 40 μM Fura Red beladenen, unstimulierten Drüse bei Anregung mit (A) 420 nm und (B) 488 nm. (C) *ratio* der Fluoreszenzintensitäten bei 420 und 488 nm. (D) Durchlichtaufnahme des Ausschnittes aus A-C. Die Fluoreszenzbilder sind in Falschfarben dargestellt. Kalte Farben stehen für niedrige, warme Farben für hohe Ca^{2+} -Konzentrationen. Die Ellipsoide in B zeigen die Regionen, aus denen die Fluoreszenzwerte in Abb. 3.24 aufgenommen wurden.

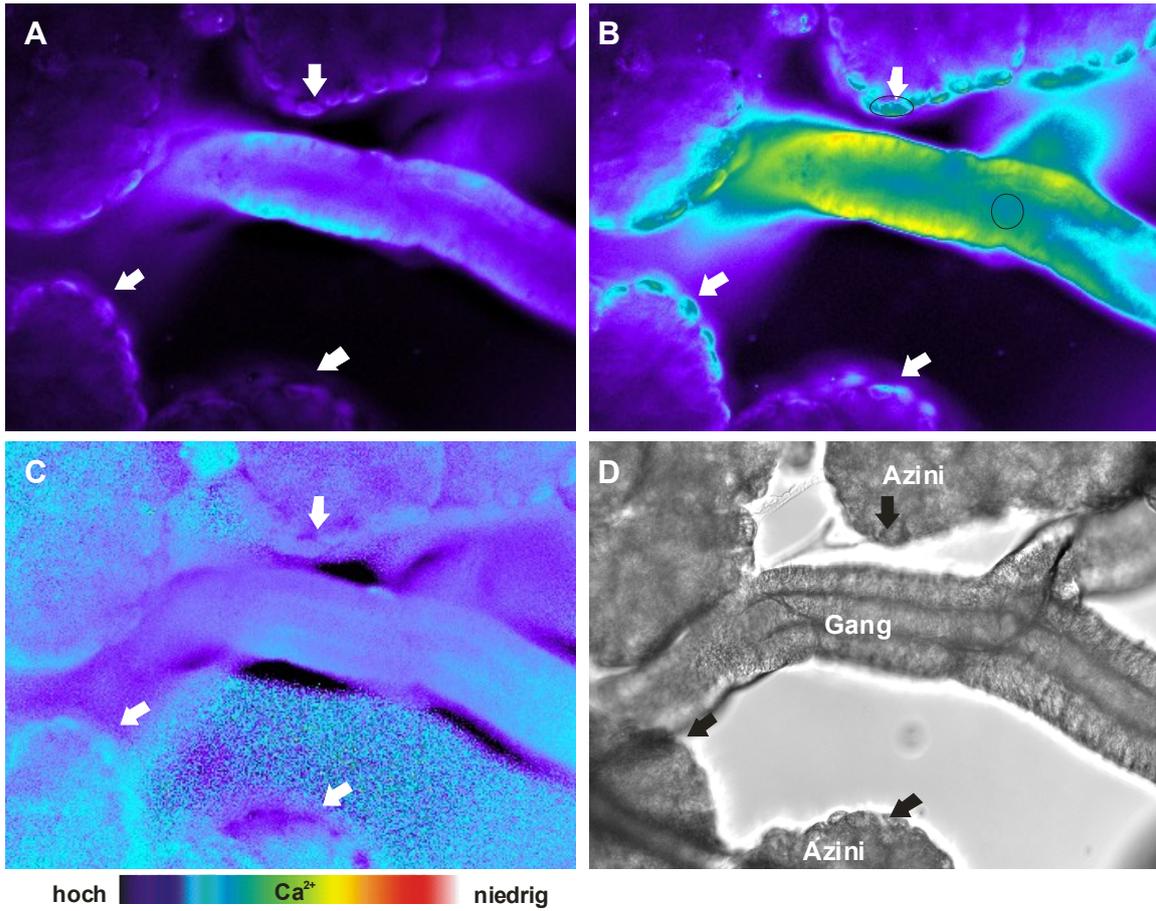


Abb. 2.23

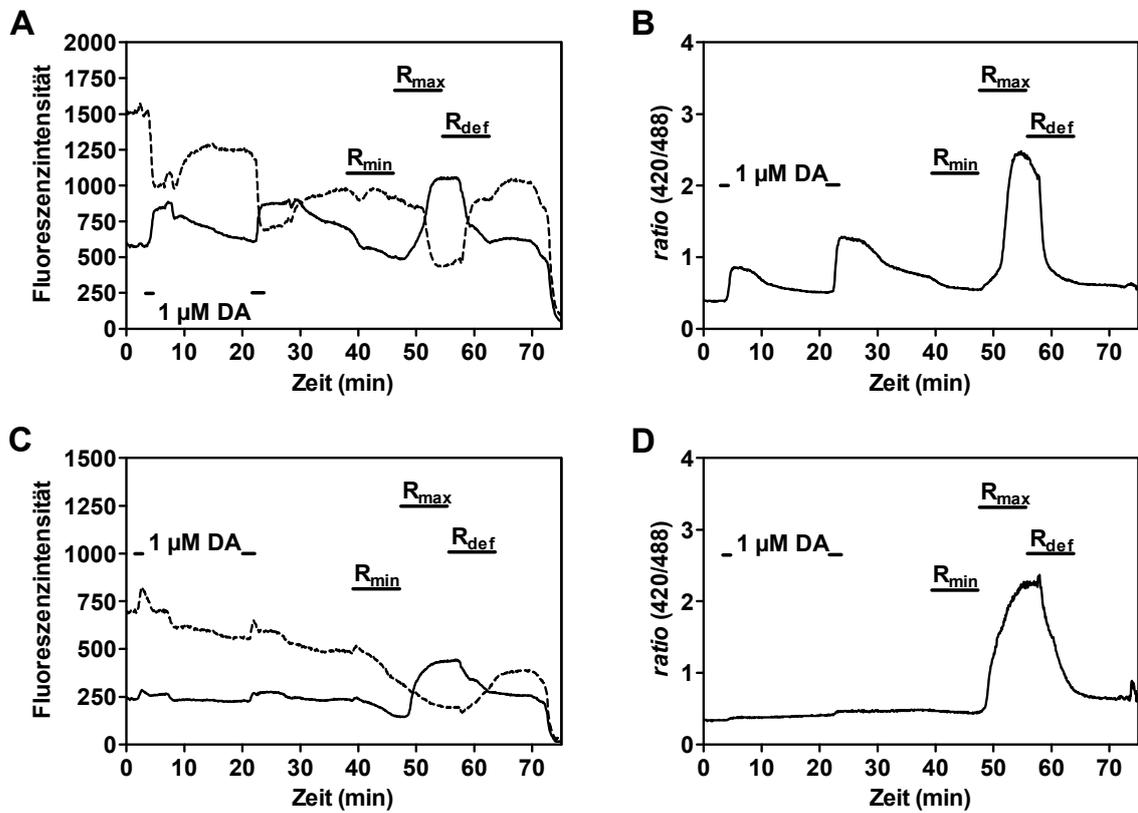


Abb. 2.24

Abb. 3.24 Dopamin-induzierte intrazelluläre Ca^{2+} -Änderungen. Balken zeigen die Dauer der Stimulierung. (A,C) Fluoreszenzintensitäten bei den Anregungswellenlängen 420 nm (durchgehende Linie) und 488 nm (gestrichelte Linie). (B,D) *ratio*-Werte ($R = F_{420}/F_{488}$) aus (B) dem Gangepithel und (D) einem Acinus. (A-D) Applikation von Ionomycin-haltigem Ringer mit 0 Ca^{2+} (R_{\min}), 65 nM Ca^{2+} (R_{def}) und 10 mM Ca^{2+} (R_{\max}) zeigt, dass die Beladung der Acini ausreichend ist, um ein Ca^{2+} -Signal zu registrieren. In den Gängen erfolgte Dopamin-induziert ein intrazellulärer Ca^{2+} -Anstieg, während in den Acini keine Änderung der intrazellulären $[\text{Ca}^{2+}]$ messbar war.

3.6.4. Die Abhängigkeit der Depolarisation von extrazellulärem Na^+ und der Aktivität des $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ -Symporters

Dopamin-Stimulierung induziert multiphasische Änderungen des V_{bl} der Acinuszellen. In den vorherigen Abschnitten wurde gezeigt, dass die Dopamin-induzierte Erhöhung einer Ca^{2+} -abhängigen K^+ -Leitfähigkeit für die Hyperpolarisationsphase der Acinuszellen verantwortlich ist. Es stellte sich die Frage, welche Transportvorgänge für die prominente Depolarisationsphase verantwortlich sind. Eine Depolarisation kann entweder durch Auswärtsströme verursacht werden, die von negativen Ladungen (Cl^-) getragen werden oder durch Einwärtsströme, die von positiven Ladungen (Na^+ , Ca^{2+}) getragen werden. Da der sezernierte Speichel vor allem NaCl enthält, wurde untersucht, in welcher Weise die Dopamin-induzierten V_{bl} -Änderungen von extrazellulärem Na^+ und von der Aktivität des postulierten $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ -Symporters (NKCC) abhängen.

3.6.4.1. Stimulierung der Acinuszellen in Na^+ -freiem Ringer

Das Einspülen Na^+ -freien Ringers hatte sehr variable Effekte auf das V_{bl} der Acinuszellen. Von 14 getesteten Drüsen reagierten 7 mit einer transienten Hyperpolarisation, der eine Depolarisation folgte, 5 mit einer transienten Depolarisation und 2 zeigten keine V_{bl} -Änderungen der Acinuszellen (nicht dargestellt). Einheitliche Ergebnisse zeigten sich, wenn die Drüsen in Na^+ -freiem Ringer mit Dopamin oder 5-HT stimuliert wurden. Dazu wurde jeweils eine Kontrollstimulierung durchgeführt und anschließend Na^+ -freier Ringer eingespült. Nachdem das V_{bl} einen stabilen Wert erreicht hatte, wurde erneut mit Dopamin oder 5-HT stimuliert. In Na^+ -freiem Ringer blieb sowohl die Dopamin- als auch die 5-HT-induzierte Depolarisation aus (Abb. 3.25 A, B). Die Hyperpolarisation hielt länger an als bei Stimulierung in normalem Ringer. Die Depolarisation tritt also nur auf, wenn extrazellulär Na^+ zu Verfügung steht.

3.6.4.2. Blockierung des $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ -Symporters mit Bumetanid

Der NKCC nutzt den nach innen gerichteten Na^+ -Gradienten zum Transport von K^+ und Cl^- . Daher ist der Ionentransport durch den NKCC von der Verfügbarkeit extrazellulären Na^+ abhängig. RIETDORF *et al.* (2003) zeigten, dass die Speichelsekretion kritisch von der Aktivität des NKCC abhängt. Daher wurde getestet, ob die Aktivität dieses elektroneutral transportierenden Symporters indirekt an der Entstehung der Depolarisation beteiligt ist. Als spezifischer Blocker des NKCC wurde Bumetanid verwendet. Nach einer Kontrollstimulierung mit $1 \mu\text{M}$ Dopamin wurde $10 \mu\text{M}$ Bumetanid eingespült und erneut mit $1 \mu\text{M}$ Dopamin stimuliert. In Gegenwart von Bumetanid blieb die Depolarisationsphase aus (Abb. 3.25 C). Wie bei Stimulierung in Na^+ -freiem Ringer war die Hyperpolarisationsphase deutlich verlängert.

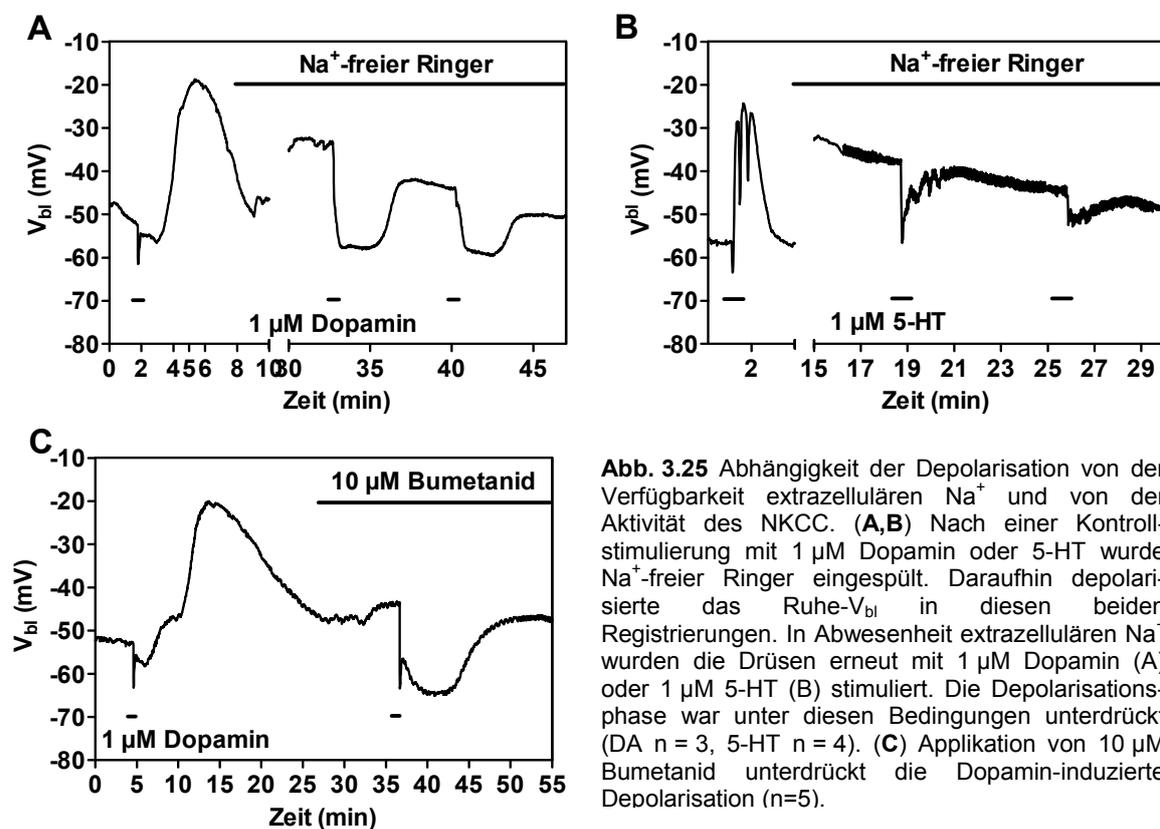


Abb. 3.25 Abhängigkeit der Depolarisation von der Verfügbarkeit extrazellulären Na^+ und von der Aktivität des NKCC. (A,B) Nach einer Kontrollstimulierung mit $1 \mu\text{M}$ Dopamin oder 5-HT wurde Na^+ -freier Ringer eingespült. Daraufhin depolarisierte das Ruhe- V_{bi} in diesen beiden Registrierungen. In Abwesenheit extrazellulären Na^+ wurden die Drüsen erneut mit $1 \mu\text{M}$ Dopamin (A) oder $1 \mu\text{M}$ 5-HT (B) stimuliert. Die Depolarisationsphase war unter diesen Bedingungen unterdrückt (DA $n = 3$, 5-HT $n = 4$). (C) Applikation von $10 \mu\text{M}$ Bumetanid unterdrückt die Dopamin-induzierte Depolarisation ($n=5$).

Die Drüsen wurden in Na^+ -freiem Ringer oder in Gegenwart von Bumetanid mit Dopamin stimuliert. Das Wiedereinspülen von Na^+ -haltigem Ringer oder das Ausspülen von Bumetanid nach einer Dopamin-Stimulierung verursachte eine starke transiente Hyperpolarisation um $33 \pm 3 \text{ mV}$ auf $-76 \pm 4 \text{ mV}$ ($n = 13$, nicht dargestellt). Daher stellte sich die Frage, ob diese Hyperpolarisation eine Sekretion widerspiegelte, die vielleicht auftrat, nachdem wieder Na^+ in die Zellen transportiert werden konnte. An dieser Stelle wurden Sekretionsmessungen in Na^+ -freiem Ringer und in Gegenwart von $10 \mu\text{M}$

Bumetanid durchgeführt. Die Drüsen wurden in jedem Experiment zur Kontrolle mit $1 \mu\text{M}$ Dopamin stimuliert. Anschließend wurde Na^+ -freier Ringer (Abb. 3.26 A) oder $10 \mu\text{M}$ Bumetanid (Abb. 3.26 B) eingespült. Unter diesen Bedingungen war die Flüssigkeitssekretion weitgehend (Bumetanid) oder gänzlich (Na^+ -freier Ringer) blockiert (siehe auch RIETDORF *et al.* 2003). Auch nach dem Ausspülen von Bumetanid oder dem Einspülen von Na^+ -haltigem Ringer fand keine Sekretion statt.

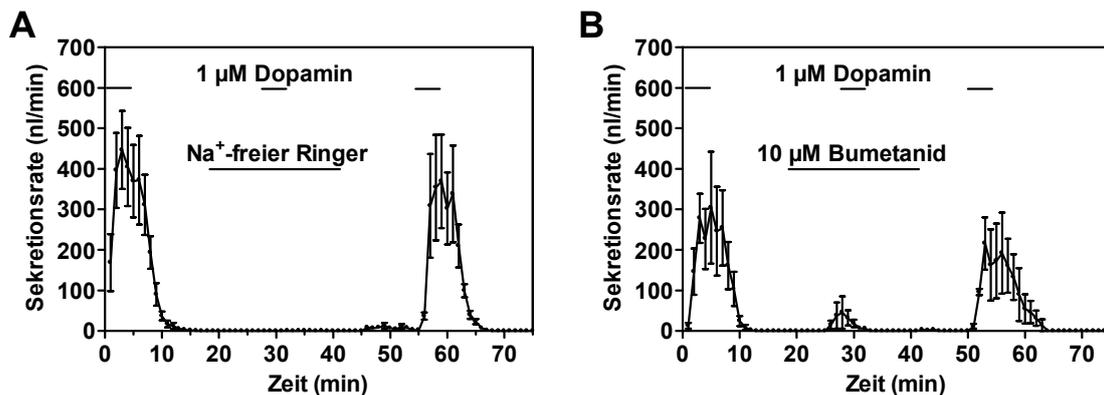


Abb. 3.26 Abhängigkeit der Flüssigkeitssekretion von der Verfügbarkeit extrazellulären Na^+ und der Aktivität des NKCC. (A) In Na^+ -freiem Ringer ist die Speichelsekretion vollständig unterdrückt. Auch nach dem Einspülen von Na^+ -haltigem Ringer tritt keine Sekretion auf ($n = 7$, $\text{MW} \pm \text{SF}$). (B) Blockierung des NKCC durch $10 \mu\text{M}$ Bumetanid unterdrückt weitgehend die Flüssigkeitssekretion. Nach dem Ausspülen von Bumetanid tritt ebenfalls keine vermehrte Sekretion auf ($n = 5$, $\text{MW} \pm \text{SF}$).

Der Transport des NKCC erfolgt elektroneutral. Daher kann dieser Transporter nicht allein verantwortlich für die in den Acinuszellen gemessene Dopamin-induzierte Depolarisation sein. Da die Depolarisation vollständig durch Bumetanid blockiert war, ist eine Beteiligung basolateraler Na^+ -Kanäle, die zu einer Depolarisation beitragen könnten, unwahrscheinlich. Der basolaterale K^+ -Ausstrom hyperpolarisiert die Membran und kann daher ebenfalls nicht zur Depolarisation beitragen. Eine weitere Möglichkeit, die Membran zu depolarisieren wäre ein Efflux negativer Ladungen.

Die elektrochemische Triebkraft für Cl^- ist sowohl in Ruhe als auch während der Stimulierung nach außen gerichtet und daher ein Cl^- -Ausstrom über Kanäle durchaus denkbar. Zur Untersuchung dieser Annahme wurde NPPB, ein Cl^- -Kanal-Blocker, verwendet.

Leider konnten mit NPPB keine eindeutigen Ergebnisse erzielt werden. In geringen Konzentrationen ($10 \mu\text{M}$) hatte NPPB keinen Effekt auf die Dopamin-induzierten V_{bl} -Änderungen. In höheren Konzentrationen von 100 bis $200 \mu\text{M}$ schien der Blocker den Zellen zu schaden. Meist stellte sich in Gegenwart von NPPB das Ruhepotential nach der Dopamin-Stimulierung und nach Ausspülen des Blockers nicht mehr ein. In allen durchgeführten Ableitungen war die initiale Hyperpolarisation verkleinert bzw. zeitlich verkürzt. Literaturrecherchen ergaben, dass NPPB auch Ca^{2+} -gesteuerte K^+ -Kanäle

blockieren kann (FIORETTI *et al.* 2004). Da auch in der Speicheldrüse der Schabe die Aktivierung eines Ca^{2+} -gesteuerten K^+ -Kanals postuliert wird, wurde die Wirkung von NPPB an dieser Stelle nicht weiter untersucht.

Die vorherigen Experimente zeigten deutlich, dass die Depolarisation von der Verfügbarkeit extrazellulären Na^+ und von der Aktivität des NKCC abhängig ist.

4. Diskussion

Speicheldrüsen von Insekten sezernieren eine wässrige Elektrolytlösung, die auch Verdauungsenzyme und andere Substanzen enthalten kann. In den Speicheldrüsen von *Periplaneta americana*, *Nauphoeta cinerea* und *Locusta migratoria* induzieren die Neurotransmitter Dopamin und 5-HT die Sekretion (SMITH & HOUSE 1977, BAINES & TYRER 1989, JUST & WALZ 1996, KEATING & ORCHARD 2004). Die Speicheldrüsen von *P. americana* sezernieren einen NaCl-haltigen, hypotonen Speichel. Hierbei lässt sich der Sekretionsvorgang in zwei Phasen unterteilen: 1. Die sekretorisch aktiven Acini sezernieren einen NaCl-haltigen Primärspeichel, der isoton zur Hämolymphe ist (GUPTA & HALL 1983, RIETDORF *et al.* 2003). 2. Anschließend wird der Primärspeichel durch das Ausführungssystem abgeleitet, wo er durch NaCl-Reabsorption zu einem hypotonen Endspeichel modifiziert wird (LANG & WALZ 1999). Die Wirkungen von Dopamin und 5-HT auf die sekretorische Aktivität der Drüsen und einige Transportprozesse in den Ausführungszellen sind recht gut charakterisiert (JUST & WALZ 1996, RIETDORF *et al.* 2003, 2005, WALZ *et al.* 2006, HILLE & WALZ 2008). In dieser Arbeit wurden die Wirkungen von Dopamin und 5-HT auf das Membranpotential der sekretorisch aktiven Acinuszellen von *P. americana* erstmals mittels intrazellulärer Ableitungen untersucht. Diese Messungen sollten einerseits erste Informationen über Transportvorgänge an der basolateralen Membran liefern, andererseits waren diese Messungen Voraussetzung für das Verständnis der bisher völlig unbekanntem Wirkungen von Tyramin, Octopamin und GABA. Zur Untersuchung dieser Neurotransmitter/Neuromodulatoren war es zudem notwendig, ein Nerv-Speicheldrüsen-Präparat zu entwickeln, das die elektrische Stimulierung des Speicheldrüsennervs (SDN) bei gleichzeitiger Ableitung des Membranpotentials der Acinuszellen ermöglichte.

4.1. Dopamin- und 5-HT- induzierte Änderungen des V_{bl}

Die Acini der Speicheldrüsen bestehen aus zwei Zelltypen, den Elektrolyt-sezernierenden P- und den Protein-sezernierenden C-Zellen (JUST & WALZ 1994a). Die Ableitelektroden wurden zwar unter mikroskopischer Kontrolle in das acinöse Gewebe der Speicheldrüse eingeführt, es war jedoch nicht möglich, diese beiden Zelltypen gezielt anzustechen. Deshalb konnte der penetrierte Zelltyp nicht identifiziert werden. Auf eine färberische Markierung der abgeleiteten Zelle wurde verzichtet, da die Acinuszellen sowohl elektrisch (GINSBORG *et al.* 1973, HOUSE 1975) als auch Farbstoff-gekoppelt sind (MAXWELL 1981, LANG & WALZ 1999). Im Verlauf der Arbeit zeigte sich jedoch schnell, dass die elektrischen Signale, die aus den Acini abgeleitet werden konnten unter gegebenen experimentellen Bedingungen immer dieselben kinetischen Eigenschaften hatten. Dieser Umstand kann als ein weiteres Indiz für die elektrische Kopplung der Acinuszellen gewertet werden. Ganz offensichtlich sind die elektrischen Signale identisch, unabhängig davon, ob sie aus P- oder C-Zellen abgeleitet werden.

Die Neurotransmitter Dopamin und 5-HT induzierten in den Acinuszellen von *P. americana* multiphasische Potentialänderungen. Die elektrischen Antworten zeigten eine initiale Hyperpolarisation (bis zu 20 mV), der stets eine starke, lang anhaltende und transiente Depolarisation (bis zu 30 mV) folgte. Die Amplituden der V_{bl} -Änderungen waren Dosis-abhängig. Dopamin- und 5-HT-Konzentrationen ab 100 nM verursachten außerdem häufig eine Nachhyperpolarisation.

Die multiphasischen Potentialänderungen nach Stimulierung mit Dopamin und 5-HT waren ein unerwartetes Ergebnis, denn im Gegensatz zu den komplexen zeitlichen Änderungen des V_{bl} in *P. americana* Speicheldrüsen wurden in den Acinuszellen von *N. cinerea* und *L. migratoria* nach Stimulierung mit Dopamin nur monophasische V_{bl} -Änderungen (transiente Hyperpolarisationen) gemessen (BOWSER-RILEY & HOUSE 1975, KEATING & ORCHARD 2001). Nur in wenigen Ableitungen folgte der Hyperpolarisation eine geringfügige Depolarisation. In *P. americana* dagegen wurde die robuste Depolarisation in jeder Ableitung gemessen und trat auch bei sehr niedrigen Dopamin- oder 5-HT-Konzentrationen auf, d.h. unter Bedingungen, bei denen die Hyperpolarisation bereits stark verkürzt war. Diese dramatischen Unterschiede im Zeitverlauf der Dopamin-induzierten Änderungen des V_{bl} lassen vermuten, dass sich auch zu den Änderungen des Membranpotentials beitragende Ionentransport-Mechanismen, die an der Speichelbildung mitwirken, in den Speicheldrüsen von *P. americana*, *N. cinerea* und *L. migratoria* unterscheiden.

Ein deutlicher Unterschied bestand in der Kinetik der Dopamin- und 5-HT-induzierten Änderungen des Membranpotentials. Während die 5-HT-induzierte Hyperpolarisation auch bei hohen 5-HT-Konzentrationen stets noch in Anwesenheit des Amins in die transiente Depolarisation überging, blieb die initiale, durch hohe Dopamin-Konzentrationen (ab ca. 250 nM) induzierte Hyperpolarisation auch nach dem Ausspülen des Amins erhalten und ging erst nach 2-3 min in die transiente Depolarisation über. Erst bei geringeren Dopamin-Konzentrationen (bis etwa 100 nM) war die Hyperpolarisation wie bei einer 5-HT-Stimulierung verkürzt. Dieser Unterschied in den Dopamin- und 5-HT-induzierten Zellantworten könnte in der unterschiedlichen Empfindlichkeit der Acinuszellen für diese beiden Neurotransmitter liegen, die sich sowohl in der Speichelsekretionsrate (JUST & WALZ 1996) als auch in der hier erstellten Dosis-Wirkungskurve zeigte, da die Dosis-Wirkungskurve für 5-HT über höheren Konzentrationen lag. Der EC_{50} für die Dopamin- bzw. 5-HT-induzierten Potentialänderungen lag bei 30 nM Dopamin und 47 nM 5-HT. Diese Werte sind durchaus mit anderen bereits veröffentlichten EC_{50} -Werten vergleichbar. So liegt der EC_{50} für die Dopamin-induzierte Speichelsekretion in Speicheldrüsen von *P. americana* bzw. *N. cinerea* bei ca. 110 nM DA bzw. 88 nM DA (HOUSE & SMITH 1978, JUST & WALZ 1996). Die Dopamin-induzierte Hyperpolarisation der acinösen Zellen der Speicheldrüse von *N. cinerea* hat einen EC_{50} von 42 nM (BOWSER-RILEY & HOUSE 1976). Der EC_{50} für die 5-HT-induzierte Speichelsekretion liegt allerdings bei 600 nM 5-HT (JUST & WALZ 1996, TROPFMANN *et al.* 2007). Es ist nicht klar, warum der EC_{50} für die 5-HT-induzierte Sekretion um mehr als 10-fach höher liegt als der EC_{50} für die 5-HT-induzierte Potentialänderung der Acinuszellen. Der Unterschied könnte darin liegen, dass die Vorgänge, die in den Acinuszellen an den Änderungen des Membranpotentials beteiligt sind, mit der Sekretion des Primärspeichels zusammenhängen, Sekretionsmessungen jedoch den Endspeichel registrieren, dessen Menge durch Transportvorgänge in den Ausführgängen mit beeinflusst wird.

4.2. Elektrische Stimulierung des Speicheldrüsennervs vs. Badapplikation von Dopamin und 5-HT

Ein wesentlicher Teil dieser Arbeit bestand in der Entwicklung eines Nerv-Speicheldrüsen-Präparates, das die elektrische Reizung des Speicheldrüsennervs (SDN) bei gleichzeitiger Ableitung des Membranpotentials der Acinuszellen ermöglicht. An diesem Nerv-Speicheldrüsen-Präparat sollte die Wirkung potentieller Neuromodulatoren auf die Neurotransmission untersucht werden.

Badapplikation von hohen Dopamin- oder 5-HT-Konzentrationen verursachten multiphasische, niedrige Konzentrationen biphasische Änderungen des Membran-

potentials. Elektrische Stimulierung des SDN verursachte in den Acinuszellen ebenfalls biphasische Änderungen des Membranpotentials, deren durchschnittliche Amplitude 13 mV betrug und somit im dynamischen Bereich der Dosis-Wirkungskurven für Dopamin und 5-HT lag. Die Kinetik der durch Dopamin- oder 5-HT-Badapplikation bzw. durch SDN-Stimulierung induzierten Antworten war weitgehend identisch. Die durch SDN-Stimulierung induzierten Antworten hatten jedoch einen schnelleren zeitlichen Verlauf. Dies ist durch das langsame Ein- und Ausspülen von Dopamin und 5-HT erklärbar. Die während der Nervenstimulierung an der Drüse freigesetzten Transmitter werden wahrscheinlich durch Wiederaufnahme in die Nervenfasern und durch den kontinuierlichen Ringerfluss schnell wieder aus dem Bad entfernt.

Die Sekretionsmessungen zeigten, dass die Speichelsekretion sowohl durch Badapplikation von Dopamin und 5-HT, als auch durch SDN-Stimulierung angeregt werden konnte. Bei SDN-Stimulierung hing die Menge des sezernierten Speichels bei gegebener Amplitude und Dauer der elektrischen Einzelreize von der Stimulierungsfrequenz ab (202 ± 32 nl/min bei 8 Hz; $6,8 \pm 1$ nl/min bei 2 Hz). Proteinbestimmungen zeigten weiterhin, dass der durch SDN-Stimulierung induzierte Speichel Proteine enthielt. Da 5-HT, nicht aber Dopamin, die Bildung eines Protein-haltigen Speichels induziert, kann davon ausgegangen werden, dass während der SDN-Stimulierung nicht nur Dopamin sondern auch 5-HT freigesetzt wurde.

Die Stimulierung des SDN und die simultane Messung des Membranpotentials bzw. der Speichelsekretionsrate eigneten sich daher hervorragend zur Untersuchung und Charakterisierung präsynaptischer Wirkungen putativer Neuromodulatoren.

4.3. Die Wirkung von GABA auf die glanduläre Neurotransmission

Die Speicheldrüsen von *P. americana* sind aus mindestens zwei Quellen des Nervensystems innerviert: Der SDN hat seinen Ursprung im SOG, und der Speichelnerv zieht aus dem stomatogastrischen Nervensystem zur Drüse (WILLEY 1961, DAVIS 1985, HOUSE & GINSBORG 1985, GIFFORD *et al.* 1991, ELIA *et al.* 1994, ALI 1997). Der SDN enthält u.a. die Axone der beiden Speichelneurone SN1 (dopaminerg) und SN2 (ELIA *et al.* 1994, BAUMANN *et al.* 2002). Im Verlauf dieser Arbeit zeigten wir, dass SN2 GABAerg ist (ROTTE *et al.* 2009a). Wie in der Einleitung beschrieben, steigt die Aktivität dieser beiden Neurone, sobald der Schabe eine Zuckerlösung angeboten wird (WATANABE & MIZUNAMI 2006). Die Funktion der GABAergen Innervation war jedoch völlig unbekannt. Deshalb wurde in dieser Arbeit untersucht, welche Aufgabe die GABAerge Innervation bei der Speichelbildung übernimmt.

Zunächst wurde durch Badapplikation die direkte Wirkung von GABA auf die Acinuszellen untersucht. GABA beeinflusste weder das Ruhemembranpotential, noch die Dopamin- oder 5-HT-induzierten Potentialänderungen der Acinuszellen. Diese Ergebnisse ließen vermuten, dass GABA möglicherweise präsynaptisch wirkt. Diese Annahme konnte mit dem in dieser Arbeit entwickelten Nerv-Speicheldrüsen-Präparat getestet werden. Tatsächlich zeigte sich, dass sowohl die durch elektrische SDN-Stimulierung induzierten Änderungen des Membranpotentials der Acinuszellen, als auch die Flüssigkeits- und Proteinsekretionsraten signifikant verstärkt waren, wenn der Badlösung GABA hinzugefügt wurde. Bei elektrischer Stimulierung des SDN reichten bereits 5 μ M GABA aus, um die Potentialänderungen der Acinuszellen zu verdoppeln.

Dieses Ergebnis unterscheidet sich von den Befunden, die in einer älteren Arbeit (BOWSER-RILEY & HOUSE 1976) an *N. cinerea* Speicheldrüsen erhoben wurden. Hier wurden 100 μ M GABA (eine unphysiologisch hohe Konzentration) benötigt, um die durch SDN-Stimulierung hervorgerufenen Potentialänderungen der Acinuszellen geringfügig zu vermindern.

Auch das SN2 von *Schistocerca gregaria* und *Locusta migratoria* zeigte GABA-Immunreaktivität, allerdings wurde die Wirkung von GABA in der Speicheldrüse dieser Spezies bislang nicht untersucht (WATKINS & BURROWS 1989, STAUFER *et al.* 1994, SCHACHTNER & BRÄUNIG 1995). Eine GABAerge Innervierung der Speicheldrüsen von *N. cinerea* wurde bisher ebenfalls nicht untersucht. In *L. migratoria* wurde weiterhin gezeigt, dass das SN2 neben GABA offenbar auch 5-HT enthält (ALI *et al.* 1993).

Die in dieser Arbeit aufgeklärte präsynaptische GABA-Wirkung ist also durchaus ein großer Schritt zum Verständnis der komplexen neuronalen Steuerung der sekretorischen Aktivität der Speicheldrüsen von *P. americana*.

4.3.1. Die erregende Wirkung von GABA wird durch einen GABA_BR vermittelt

GABA ist in Vertebraten und Invertebraten einer der wichtigsten inhibitorischen Neurotransmitter. In dieser Arbeit konnte jedoch sowohl eine exzitatorische (s.o.) als auch eine inhibitorische (s.u.) Wirkung von GABA gezeigt werden, die offensichtlich durch unterschiedliche GABA-Rezeptor-Subtypen vermittelt wird. Anhand des pharmakologischen Profils der untersuchten GABA-Rezeptoren konnte eindeutig gezeigt werden, dass bei elektrischer Stimulierung des SDN die verstärkende Wirkung von GABA auf die Potentialänderungen der Acinuszellen durch einen metabotropen GABA_BR vermittelt wird. Die verstärkende Wirkung von GABA auf die Neurotransmission konnte durch zwei GABA_BR-Agonisten (SKF 97541 und Baclofen) imitiert werden. Spezifische Blocker unterdrückten die erregende Wirkung von GABA und SKF 97541.

GABA_BR sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR), die vor allem an G α , und G α oder an G $\beta\gamma$ -Untereinheiten koppeln (HILL *et al.* 1984, BETTLER *et al.* 2004). Sie können als Autorezeptoren auf dem GABAergen Neuron selbst lokalisiert sein, oder die Ausschüttung anderer Neurotransmitter als Heterorezeptoren regulieren.

Es ist auszuschließen, dass der in der Speicheldrüse der Schabe verstärkend wirkende GABA_BR als Autorezeptor wirkt. GABA-Badapplikation während der SDN-Stimulierung hätte auf diese Weise keine Verstärkung der Potentialänderungen der Acinuszellen bewirken können, da eine verminderte GABA-Freisetzung aus den GABAergen Nervenfasern aufgrund der hohen GABA-Konzentration in der Badlösung im Experiment kaum registrierbar wäre. Der GABA_BR muss also die Freisetzung anderer Transmitter modulieren und somit als Heterorezeptor wirken.

Eine Möglichkeit wäre die verminderte Freisetzung eines weiteren inhibitorischen Transmitters, z.B. Histamin. Histamin-Rezeptoren können GPCRs oder Cl⁻-Kanäle sein. Beide können inhibitorisch auf die Freisetzung anderer Transmitter wirken (BLENAU & BAUMANN 2001). Bisher gibt es in den Speicheldrüsen von *P. americana* jedoch keine Anhaltspunkte für einen inhibitorischen Transmitter neben GABA.

Die andere und viel interessantere Möglichkeit ist, dass in der Speicheldrüse der meist inhibitorisch wirkende GABA_BR die Freisetzung eines exzitatorischen Transmitters verstärkt. In anderen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung eines GABA_BR durchaus auch exzitatorische Wirkung haben kann. So zeigten ZHANG *et al.* (1998), dass die Aktivierung von GABA_BR in Ganglionzellen der Retina des Tigersalamanders zu einer Verstärkung starker und zu einer Inhibierung schwacher exzitatorischer Eingänge führt. Die Voraussetzung dafür ist die co-Expression spannungsgesteuerter Ca²⁺-Kanäle, Ca²⁺-gesteuerter K⁺-Kanäle und Ca²⁺-unabhängiger K⁺-Kanäle in derselben Membran. Die spannungsgesteuerten Ca²⁺-Kanäle können in diesen Zellen durch die G $\beta\gamma$ -Untereinheit des aktivierten G-Proteins gehemmt werden, sodass ein K⁺-Ausstrom über Ca²⁺-gesteuerte K⁺-Kanäle unterbleibt.

GABA_BR können auch exzitatorisch wirken, indem sie, indirekt über die Aktivierung einer Phospholipase C, Ca²⁺-Kanäle öffnen. Der Ca²⁺-Influx triggert dann die Transmitterausschüttung (HIRONO *et al.* 2001).

Weiterhin wurde gezeigt, dass die G $\beta\gamma$ -Untereinheit durch G-Protein *crossstalk* verschiedene Isoformen der Adenylylcyclase co-aktivieren kann, was zu einem Anstieg des cAMP-Spiegels führt, der wiederum den Ca²⁺-Influx in die Präsynapse erleichtert. Voraussetzung für diese Wirkung ist jedoch die Aktivierung eines G α oder eines G α -Proteins durch einen weiteren GPCR (BOWERY *et al.* 2002, HASHIMOTO & KURIYAMA 1997, OLIANAS & ONALI 1999).

Der genaue Mechanismus der präsynaptischen GABA_BR-vermittelten Verstärkung der Neurotransmission in den Speicheldrüsen kann jedoch ohne eine Charakterisierung der elektrischen Eigenschaften der beteiligten Neurone nicht geklärt werden.

Im Gegensatz zu Dopamin induziert 5-HT die Sekretion eines Protein-haltigen Speichels. Die Verstärkung der durch SDN-Stimulierung induzierten Proteinsekretionsrate durch GABA zeigt, dass der verstärkende Effekt von GABA und somit der GABA_BR zumindest auf die serotonerge Neurotransmission wirkt. Wäre allein die Dopamin-Freisetzung verstärkt, würde aufgrund der vermehrten Flüssigkeitssekretion durch die P-Zellen eine stärkere Verdünnung des sezernierten Proteins aus den C-Zellen erwartet werden. Es zeigte sich aber, dass sowohl Flüssigkeits- als auch Proteinsekretion verstärkt waren.

Die pharmakologischen Experimente dieser Arbeit zeigten also, dass GABA seine verstärkende Wirkung auf die Neurotransmission über einen GABA_BR entfaltet. Im zeitlichen Verlauf dieser Arbeit konnte dann auch mit Hilfe molekularbiologischer Methoden ein GABA_BR in den Speicheldrüsen von *P. americana* nachgewiesen werden (W. BLENAU, persönliche Mitteilung).

4.3.2. Ein präsynaptischer, ionotroper GABA-Rezeptor vermittelt inhibitorische Wirkung von GABA

Möglicherweise hat GABA im Speicheldrüsenkomplex auch eine inhibitorische Wirkung. Diese wurde durch Applikation des GABA_AR-spezifischen Blockers Bicucullin sichtbar. Bicucullin verstärkte bei SDN-Stimulierung die Amplitude der Potentialänderungen in den Acinuszellen um den Faktor 1,8.

GABA_AR bilden anionenpermeable Poren, die für Cl⁻ durchlässig sind (BUCKINGHAM & SATTELLE 2005). Je nach elektrochemischer Triebkraft kann die Öffnung des Kanals durch einen Cl⁻-Influx hyperpolarisierend (BUCKINGHAM *et al.* 2005), oder durch einen Cl⁻-Efflux depolarisierend (STEIN & NICOLL 2003, TYZIO *et al.* 2006) wirken und so die Transmitterfreisetzung modulieren. Ionotrope GABA-Rezeptoren können prä- oder postsynaptisch vorkommen. Die hier durchgeführten Experimente zeigten, dass der GABA_AR-spezifische Antagonist Bicucullin zu einer Verstärkung der elektrischen Antworten der Acinuszellen führt. Dies deutet auf die Expression eines GABA_AR im Nervengewebe der Drüse hin. Da die serotonerge Neurotransmission durch GABA verstärkt wird, ist davon auszugehen, dass der GABA_AR nicht in diesen Fasern lokalisiert ist. Da neben 5-HT nur Dopamin Potentialänderungen der Acinuszellen induziert, ist es gut möglich und wahrscheinlich, dass der Rezeptor die dopaminerge Neurotransmission

beeinflusst. Die Lokalisation und Funktion dieses GABA-Rezeptors im Drüsenkomplex bleibt jedoch noch zu klären.

4.3.3. Die physiologische Rolle der GABAergen Innervierung

Diese Arbeit zeigt erstmals, dass GABA in den Speicheldrüsen von *P. americana* die Proteinsekretion beeinflusst. Die pharmakologischen Experimente am Nerv-Speicheldrüsen-Präparat zeigten, dass die serotonerge Neurotransmission durch GABA verstärkt wird. GABA hatte offenbar jedoch auch eine inhibitorische Wirkung.

WATANABE & MIZUNAMI (2006, 2007) zeigten, dass sowohl die Aktivität der beiden Speichelneurone SN1 und SN2 als auch die Sekretionsrate ansteigt, wenn der Schabe Sucrose oder NaCl-Lösung angeboten wird. SCHACHTNER & BRÄUNIG (1993, 1995) leiteten vom SDN in lebenden *L. migratoria* ab. Sie zeigten, dass die Aktivität beider Speichelneurone kurz vor der Nahrungsaufnahme beginnt. Die Aktivität des dopaminergen SN1 schien mit der Aktivität des Mandibularmuskels (M9) assoziiert zu sein. Das heißt, Bewegungen der Mundwerkzeuge gehen mit SN1-Aktivität einher. Dies wurde auch durch WATANABE & MIZUNAMI (2006) in der Schabe beschrieben. Weiterhin wurde gezeigt, dass SN1 in *L. migratoria* zwischen den Phasen der Nahrungsaufnahme aktiv ist. Das SN1 von *P. americana* zeigte ebenfalls spontane Aktivität. Die dopaminerge Stimulierung der Drüse durch die Aktivität des SN1 führt zur Bildung eines wässrigen Speichels, der keine Proteine enthält. Daher kann davon ausgegangen werden, dass der durch SN1-Aktivität gebildete Speichel sowohl in *L. migratoria* als auch in *P. americana* zur Nahrungsaufnahme und in den Phasen dazwischen zur Reinigung der Mundwerkzeuge dient.

Nach Angaben von SCHACHTNER & BRÄUNIG (1995) (STAUFER *et al.* 1994) enthält das SN2 von *L. migratoria* 5-HT und GABA. Seine Aktivität war auf die Dauer der Nahrungsaufnahme beschränkt. In *P. americana* wurde zwar auch eine Ruheaktivität des SN2 gemessen (WATANABE & MIZUNAMI 2006), deren Frequenz (0-10 Hz) jedoch weitaus geringer war als die des SN1 (10-30 Hz). Das SN2 der Schabe enthält GABA. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass GABA die serotonerge Neurotransmission verstärkt. Serotonerge Stimulierung der Drüsen führt zur Bildung eines viskösen, Protein-haltigen Speichels. Die auf die Nahrungsaufnahme beschränkte Aktivität des SN2 von *L. migratoria* und die geringe Ruheaktivität des SN2 von *P. americana* deuten darauf hin, dass nur während der Nahrungsaufnahme nennenswerte Mengen eines Protein-haltigen Speichels gebildet werden. In der Schabe scheint das aus dem SN2 ausgeschüttete GABA auf die mit dem SDN zur Drüse ziehenden serotonergen Fasern zu wirken. Diese Hypothese ist darin begründet, dass der verstärkende Effekt auf die serotonerge

Neurotransmission auftrat, wenn der SDN der isolierten Drüse stimuliert wurde. Das bedeutet, dass die GABA-empfindlichen serotonergen Fasern während dieser Zeit aktiv sein mussten. Diese serotonergen Fasern entstammen möglicherweise dem sog. Satellitennervensystem (SNS). Das SNS von *L. migratoria* besteht aus 6 serotonergen Neuronen, deren Zellkörper im SOG lokalisiert sind und deren Fortsätze alle peripheren Nerven des SOG begleiten (BRÄUNIG 1987). SCHACHTNER & BRÄUNIG (1993) zeigten, dass das SNS ausschließlich im Zusammenhang mit der Nahrungsaufnahme aktiv ist. Auch in *P. americana* wurde ein Pendant zu diesem SNS gefunden (DAVIS 1987). Allerdings wurde dort bisher nicht untersucht, wann diese Neurone aktiv sind. Weiterhin scheinen sie nicht die Acini zu innervieren, sondern bilden neurohämale Freisetzungstellen auf den peripheren Nerven des SOG. Die im SDN enthaltenen serotonergen Fasern könnten auch dem stomatogastrischen Nervensystem entstammen, welches die Drüsen serotonerg innerviert (DAVIS 1985).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die GABA-Freisetzung aus dem SN2 mit hoher Wahrscheinlichkeit mit der Nahrungsaufnahme assoziiert ist (WATANABE & MIZUNAMI 2006, SCHACHTNER & BRÄUNIG 1995). Da GABA die serotonerge Neurotransmission verstärkt, würde auf diese Weise vermehrt Protein-haltiger Speichel sezerniert werden, der die Verdauung einleitet. Zwischen den Phasen der Nahrungsaufnahme wird anscheinend überwiegend Protein-freier Speichel sezerniert, der zur Reinigung der Mundwerkzeuge und zum Anfeuchten der Mundhöhle dient.

GABA hatte auch inhibitorische Wirkung auf die glanduläre Neurotransmission. Man stelle sich in dem oben beschriebenen Modell vor, dass GABA während der Nahrungsaufnahme ausgeschüttet wird, und die dopaminerge Neurotransmission herunterreguliert. Dies würde *in vivo* nicht unbedingt die Speichelmenge, wohl aber die Speichelqualität beeinflussen. So könnte bedarfsgerecht Speichel unterschiedlicher Qualitäten produziert werden.

4.4. Die Wirkungen der biogenen Amine Tyramin und Octopamin auf die Acinuszellen und auf die glanduläre Neurotransmission

Im Verlauf dieser Arbeit wurde in unserer Arbeitsgruppe der erste Tyramin-Rezeptor der Schabe (PeaTYR1) charakterisiert. Dieser konnte molekularbiologisch auch im Speicheldrüsengewebe nachgewiesen werden (C. KRACH, Dissertation 2006, ROTTE *et al.* 2009b). Tyramin ist eine Synthese-Vorstufe des Octopamins. Octopamin wurde wiederum erstmals in den Speicheldrüsen von *Octopus vulgaris* entdeckt (ERSPAMER & BORETTI

1951). Die Speicheldrüsen von *L. migratoria* sind durch Äste eines octopaminergen DUM-Neurons innerviert (BRÄUNIG *et al.* 1994), dessen Funktion in Zusammenhang mit der Speichelsekretion jedoch nicht untersucht ist. Daher stellte sich die Frage nach einer möglichen physiologischen Rolle der beiden Phenolamine Tyramin und Octopamin in den Speicheldrüsen von *P. americana*.

Tyramin und Octopamin (je 1 μM) hatten weder eine direkte Wirkung auf das V_{bl} der Acinuszellen, noch modulierten sie die Dopamin- oder 5-HT-induzierten Potentialänderungen. Sehr hohe Tyramin-Konzentrationen verursachten jedoch Potentialänderungen in den Acinuszellen, die mit den Dopamin-induzierten Änderungen kinetisch identisch waren. Allerdings musste dazu im Vergleich zu Dopamin (1 μM) die unphysiologisch hohe Tyraminkonzentration von 1 mM eingesetzt werden. Es kann deshalb angenommen werden, dass diese Tyramin-Wirkung nicht über Tyramin-Rezeptoren auf den Acinuszellen hervorgerufen wurde, sondern aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der beiden Amine durch unspezifische Bindung des Tyramins an Dopamin-Rezeptoren.

Bei Badapplikation von 1 μM Tyramin wurde das vermehrte Auftreten von Miniaturpotentialen beobachtet, deren Amplitude in der Regel nicht mehr als 4 mV betrug. Diese Miniaturpotentiale bestanden aus einer kleinen initialen Hyperpolarisation und einer darauf folgenden Depolarisation. Damit ähnelten sie kinetisch den durch SDN-Stimulierung bzw. durch Dopamin- oder 5-HT-Badapplikation induzierten Potentialänderungen. Diese Beobachtung deutete auf eine Tyramin-induzierte, spontane Freisetzung kleiner Transmittermengen und somit auf eine präsynaptische Wirkung von Tyramin im Drüsenkomplex hin. Derartige Minipotentialen beobachteten bereits GINSBORG *et al.* (1976) in Messungen des V_{bl} von *N. cinerea* Speicheldrüsenzellen, ohne dass deren Ursachen weiter untersucht wurden.

Badapplikation von 10 μM bis 1 mM Octopamin induzierte eine leichte Hyperpolarisation des V_{bl} der Acinuszellen von *N. cinerea*, deren Amplitude jedoch weniger als 25 % der Dopamin-Kontrolle betrug (BOWSER-RILEY & HOUSE, 1976). Die Wirkungen derartig unphysiologisch hoher Octopamin-Konzentrationen auf das Ruhe- V_{bl} der Acinuszellen wurden in der vorliegenden Arbeit nicht weiter untersucht. BOWSER-RILEY & HOUSE (1976) konnten auch zeigen, dass 100 nM Octopamin die durch SDN-Stimulierung induzierten Potentialänderungen der Acinuszellen um 30 % im Vergleich zur Kontrolle verstärkten, untersuchten diesen Effekt jedoch nicht weiter.

In der vorliegenden Arbeit waren die durch elektrische SDN-Stimulierung induzierten Potentialänderungen der Acinuszellen sowohl durch Tyramin als auch durch Octopamin

signifikant verstärkt. Allerdings war die 100-fache Konzentration von Tyramin (1 μM) notwendig, um die durch 10 nM Octopamin induzierte 1,6fache Verstärkung der Potentialänderungen in den Acinuszellen zu erhalten.

Das Nervensystem der Insekten enthält nur eine verhältnismäßig geringe Anzahl octopaminergener Neurone, deren Fortsätze jedoch in nahezu alle Bereiche des Nervensystems ziehen (ROEDER 2005). Octopamin und Tyramin haben oft entgegengesetzte Wirkungen auf das Verhalten und den Metabolismus des Tieres (ROEDER *et al.* 2003). Tyramin- und Octopamin-Rezeptoren gehören zur Familie der GPCRs. Diese Rezeptorfamilie kann - je nach aktiviertem G-Protein - an unterschiedliche Signalwege koppeln. Octopamin- bzw. Tyramin-Rezeptoren können sowohl durch Tyramin als auch durch Octopamin aktiviert werden (FAROOQUI 2007). Octopamin-Rezeptoren haben jedoch eine höhere Affinität für Octopamin und *vice versa*.

In *P. americana* wurde bis zu diesem Zeitpunkt nur jeweils ein Tyramin- und Octopamin-Rezeptor charakterisiert. Der durch BISCHOF & ENAN (2004) untersuchte Octopamin-Rezeptor (Paoa1) aktivierte in HEK-293-Zellen sowohl den cAMP- als auch den $\text{IP}_3\text{-Ca}^{2+}$ -Signalweg unabhängig voneinander. Beide Signalwege können - sofern der Rezeptor in der neuronalen Membran exprimiert ist - zu einer vermehrten Transmitterausschüttung führen (CHAVIS *et al.* 1998, EVANS & MORGAN 2003, NEHER & SAKABA 2008).

Der durch ROTTE *et al.* (2009b) charakterisierte Tyramin-Rezeptor der Schabe (PeaTYR1) koppelte in HEK-Zellen negativ an den cAMP-Signalweg. Daher ist anzunehmen, dass dieser Rezeptor nicht die Tyramin-induzierte Verstärkung der Acinuszellantworten vermittelt. Diese Annahme wird durch die begrenzte Verteilung des Rezeptorproteins im Drüsenkomplex unterstützt (s.u. 4.4.1.).

Bisher wurden Tyramin-Rezeptoren in verschiedenen Insektenspezies wie *Drosophila melanogaster*, *Bombyx mori*, *Locusta migratoria* und *Apis mellifera* charakterisiert. Die meisten dieser Rezeptoren inhibieren die Adenylylcyclase über ein $G_i\alpha$ -Protein und senken somit den intrazellulären cAMP-Spiegel (SAUDOU *et al.* 1999, BLENAU *et al.* 2000, POELS *et al.* 2001, REX & KOMMUNIECKI 2002, OHTA *et al.* 2003). Aufgrund der unterschiedlichen Schwellenkonzentrationen für beide Amine wäre es durchaus denkbar, dass der exzitatorische Effekt von Tyramin und Octopamin durch nur einen einzigen präsynaptisch lokalisierten Rezeptor vermittelt wird, der eine höhere Affinität zu Octopamin hat und daher als Octopamin-Rezeptor einzuordnen ist. Ob es sich hierbei um den durch BISCHOF & ENAN (2004) bereits charakterisierten Paoa1 handelt, bleibt zu klären.

Einige Mitglieder der Tyramin-Rezeptor-Familie (z.B. DmTyrR aus *Drosophila*, LocTYR1 aus *L. migratoria*) aktivierten den $\text{IP}_3\text{-Ca}^{2+}$ -Signalweg (ROBB *et al.* 1994, REALE *et al.* 1997, POELS *et al.* 2001, ENAN 2005). Die Aktivierung des $\text{IP}_3\text{-Ca}^{2+}$ -Signalweges kann zu

einer erhöhten Transmitterfreisetzung führen. Daher ist auch eine erregende Wirkung von Tyramin im Drüsenkomplex über einen bisher in der Schabe nicht charakterisierten Rezeptor denkbar.

Zur eindeutigen Identifizierung des in die Verstärkung der Acinuszellantworten involvierten Rezeptortyps wäre die Erstellung eines pharmakologischen Profils des Tyramin- und des Octopamin-Effekts hilfreich. Tyramin- und Octopamin-Rezeptoren können durch ihre Empfindlichkeit für Yohimbin bzw. Epinastin unterschieden werden (BLENAU & BAUMANN 2001, ROEDER 2005). Ist die durch Tyramin induzierte Verstärkung der Acinuszellantworten durch Yohimbin blockierbar, so wird der exzitatorische Effekt höchstwahrscheinlich durch einen Tyramin-Rezeptor, und nicht über unspezifische Bindung an einen Octopamin-Rezeptor, vermittelt.

Um Anhaltspunkte über die Lokalisierung des oder der Rezeptoren zu erhalten, wären weitere Sekretionsmessungen nötig, bei denen die Wirkung der beiden Amine auf die durch SDN-Stimulierung induzierte Flüssigkeits- und Proteinsekretion untersucht wird.

4.4.1. Die Verteilung des Tyramin-Rezeptors PeaTYR1 im Drüsenkomplex

Die Verteilung des in Rotte *et al.* (2009b) charakterisierten Tyramin-Rezeptors PeaTYR1 wurde in der vorliegenden Arbeit anhand von Antikörpermarkierungen im Speicheldrüsenkomplex untersucht. Dazu wurde ein spezifischer Antikörper genutzt, der eigens gegen diesen PeaTYR1 generiert wurde.

Die Acinuszellmembranen enthielten keine PeaTYR1-Immunreaktivität. Dies war nicht überraschend, da Tyramin keinen direkten (bzw. spezifischen) Effekt auf das Membranpotential der Acinuszellen hatte. Auch die Gangzellen, das Reservoir und der Reservoirmuskel wurden nicht durch den Antikörper markiert.

Eine intensive Rezeptormarkierung wurde in einem paarigen Nerv unbekanntem Ursprungs gefunden, der die Drüse jeweils lateral in Höhe der Reservoirbasis erreicht. Dieser Nerv enthielt mindestens eine PeaTYR1-immunreaktive Faser. Diese schien stark verästelt und ein peripheres Netzwerk über einer oder mehreren nicht gefärbten zentralen Fasern stärkeren Durchmessers zu bilden. Die Rezeptormarkierung war perlschnurartig an lokalen Aufweitungen der Faser(n) lokalisiert, die kaum mit Synapsin-Foci colokalisierten, jedoch stets in der Nähe anderer Freisetzungstellen lagen, die keine PeaTYR1-Immunreaktivität zeigten.

Da sowohl der Tyramin- als auch der PeaTYR1-CPL3-Antikörper aus dem Kaninchen stammten, wurde auf eine Doppelmarkierung verzichtet. Der PeaTYR1-immunreaktive Nerv konnte jedoch aufgrund seiner Lage auch in anti-Tyramin-markierten Präparaten

identifiziert werden. Einige variköse Fasern zeigten deutlich Tyramin-Immunreaktivität, die an lokalen Aufweitungen besonders intensiv war (Abb. 4.1).

Einige Fasern des Nerven waren auch durch den Octopamin-Antikörper markiert. Daher ist unklar, ob aus diesen Fasern Tyramin oder Octopamin freigesetzt wird. Offen bleibt auch die Frage, ob der Rezeptor als Autorezeptor in einer tyraminergen Faser, oder als Heterorezeptor die Tyramin-Wirkung vermittelt.

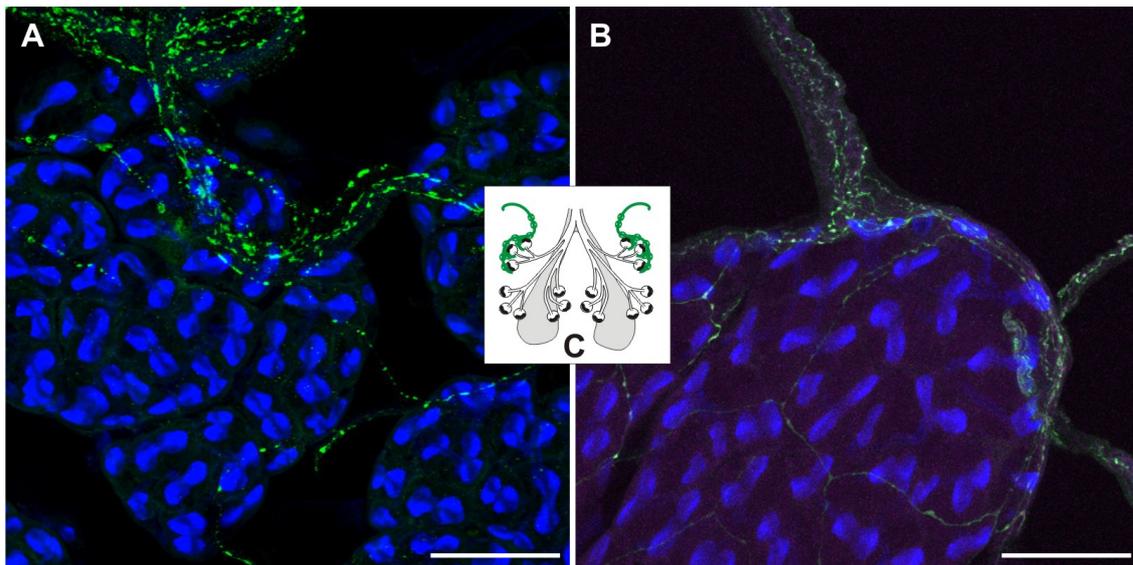


Abb. 4.1 Immunocytochemische Markierungen von Totalpräparaten. Gezeigt ist ein Nerv unbekanntes Ursprungs, der einige periphere Acini der Drüse innerviert. **(A)** Doppelmarkierung mit Alexa Fluor 488 Phalloidin (blau) und anti-PeaTYR1-CPL3 (grün). **(B)** Dreifachmarkierung mit Alexa Fluor 488 Phalloidin (blau), anti-Octopamin (magenta) und anti-Tyramin (grün). Der Nerv (in grün schematisch dargestellt in **C**) enthält sowohl Fasern, die den Rezeptor exprimieren als auch Typ1- und Typ2-Fasern. Balken = 50 μm .

Der PeaTYR1-immunreaktive Nerv wurde bei SDN-Stimulierung nicht in die Saug-elektrode aufgenommen und somit nicht stimuliert. Außerdem war der Nerv durch die Präparation von seinem Ursprung abgerissen. Weiterhin innervierte dieser Nerv nur wenige periphere Lobuli. Die Ableitungen aus den Acini erfolgten jedoch in unterschiedlichen Drüsenregionen.

In jedem Fall kann aufgrund der negativen Kopplung des PeaTYR1 an den cAMP-Signalweg (ROTTE *et al.* 2009b) festgehalten werden, dass der Rezeptor nicht die Tyramin-induzierte Verstärkung der durch SDN-Stimulierung induzierten Acinuszellantworten vermittelt, sondern - zumindest in diesem Nerv - die Freisetzung eines anderen Transmitters herunterreguliert. Interessant wäre daher der Ursprung und Transmittergehalt des Nerven.

4.4.2. Die Verteilung von Tyramin und Octopamin im Drüsenkomplex

Tyramin und Octopamin wirken präsynaptisch und verstärken die durch elektrische SDN-Stimulierung induzierten Potentialänderungen der Acinuszellen. Dies geschieht vermutlich durch eine vermehrte Transmitterfreisetzung aus dopaminergen und/oder serotonergen Fasern. Es stellte sich daher auch die Frage, ob und wie die beiden Amine im Nervengewebe des Speicheldrüsenkomplexes verteilt sind.

Immunocytochemische Markierungen mit anti-Tyramin und anti-Octopamin ergaben zwei unterschiedlich markierte variköse Fasertypen, die mit dem SDN zur Drüse zogen und sich über dem gesamten Speicheldrüsenkomplex verzweigten. Es wurden Fasern gefärbt, die ausschließlich Tyramin-Immunreaktivität zeigten (Typ1), und solche, in denen Octopamin- und Tyramin-Immunreaktivität co-lokalisierten (Typ2). Die Präabsorptionsexperimente zur Spezifität der Antikörper zeigten, dass die anti-Tyramin-Immunfluoreszenz im Gewebe sowohl mit Tyramin- als auch mit Octopamin-Präabsorption unterdrückt werden konnte. Daher ist davon auszugehen, dass der Tyramin-Antikörper auch Octopamin markierte. Aufgrund des Octopamin-Syntheseweges, in dem Tyramin als Substrat der Tyramin- β -Hydroxylase (T β H) vorkommt, wurde ohnehin Tyramin-Immunreaktivität in Octopamin-positiven Fasern erwartet und die unspezifische Bindung von anti-Tyramin an Octopamin als unproblematisch angesehen.

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit von Tyramin, Octopamin und Dopamin wäre eine Kreuzreaktivität der Tyramin- und Octopamin-Antikörper zu Dopamin durchaus denkbar. Es kann jedoch ausgeschlossen werden, dass diese im Drüsengewebe Dopamin markiert haben, da keine Färbung des SN1 oder an Ausführungsgängen zu beobachten war, die deutlich durch dopaminerge Fasern innerviert sind. Zwar war auf den Hauptspeichelgängen ein Netzwerk von Typ2-Fasern markiert, auf Gängen niedrigerer Ordnung waren jedoch nur in zwei Präparaten (insgesamt auf zwei Ausführungsgängen) Fasern gefärbt, die nicht in das Gangepithel eindringen.

Die anti-Octopamin-Markierungen waren nur durch Präabsorption des Antikörpers mit Octopamin, nicht aber mit Tyramin zu unterdrücken. DACKS *et al.* (2005) zeigten außerdem mittels eines kompetitiven ELISA, dass der Antikörper spezifisch an Octopamin, nur in geringem Maß an Tyramin, und nicht an Dopamin bindet.

Aus den hier vorliegenden Ergebnissen geht hervor, dass die Drüse neben dopaminergem, serotonergem und GABAerger auch tyraminergem und octopaminergem Innervierung empfängt. Es wird daher davon ausgegangen, dass beide Amine als unabhängige Neuromodulatoren im Speicheldrüsenkomplex wirken. Abbildung 4.2 zeigt schematisch die Innervierungsmuster durch tyraminerge (Typ1) und octopaminerge (Typ2) Nervenfasern. Beide Fasertypen wurden auf nahezu allen Drüsenbestandteilen markiert.

Wie die dopaminergen Fasern verliefen Typ1- und Typ2-Fasern stets an der Oberfläche der Acini, ohne in diese einzudringen. Die Acini wurden intensiv durch Typ1-Fasern und nur spärlich durch Typ2-Fasern innerviert. In den Nerven, die verschiedene Acini miteinander verbinden, schienen deutlich mehr Typ2-Fasern markiert zu sein. Tyraminerge und Octopaminerge Fasern wurden so gut wie nie auf Gängen gefunden. Eine Ausnahme waren jedoch die Hauptspeichelgänge, auf denen deutliche Netzwerke von Typ2- Fasern markiert waren.

Der vordere Bereich des Reservoirs wurde ebenfalls durch beide Fasertypen innerviert. Hier stellt sich die Frage, ob die Transmitterfreisetzung aus diesen Fasern eine direkte Wirkung auf das Reservoirepithel hat, oder dieses als Substrat nutzen, auf dem die Nervenstränge entlang ziehen. Der Reservoirmuskel ist ebenfalls durch beide Fasertypen innerviert, die entweder parallel zwischen den Muskelfasern verlaufen, oder ein Netzwerk über deren Oberfläche bilden. Die Wirkungen von Dopamin, Serotonin, Tyramin, Octopamin und GABA auf den Reservoirmuskel und das Reservoir epithel selbst sind bisher nicht untersucht.

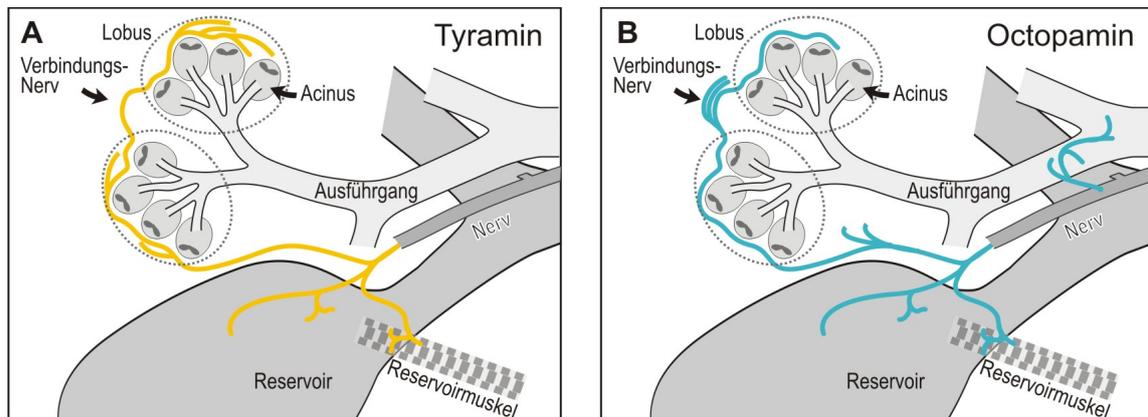


Abb. 4.2 Vergleich der tyraminergen und octopaminergen Innervierung des Speicheldrüsenkomplexes. Typ1-Fasern (tyraminerge) sind in **A** dargestellt, Typ2-Fasern (octopaminerg) in **B**. Erläuterungen siehe Text.

Der Ursprung der tyraminergen Faser(n) ist bislang unbekannt, könnte jedoch durch eine retrograde Färbung aufgeklärt werden. In den hier untersuchten Präparaten wurden in jedem SDN Typ1-Fasern gefunden, die jeweils einen geringen Durchmesser (bis 1 μm) hatten. Die Lokalisation der zugehörigen Somata bleibt jedoch unbekannt. Leider wurde bisher bei keinem anderen Insekt eine tyraminerge Innervierung der Speicheldrüsen untersucht, die Anhaltspunkte über die Herkunft der Nervenfasern geben könnte.

Der Ursprung der octopaminergen Innervierung ist vermutlich ein DUM (*dorsal unpaired median*)-Neuron. DUM-Neurone sind die wichtigsten Octopamin-Quellen im thoraco-abdominalen Nervensystem der Insekten (ROEDER 2005). Sie modulieren u.a. Skelettmuskeln und die viscerale Muskulatur (ROEDER 1999). Ihre unpaaren Somata liegen in den dorsal-medianen Regionen der thorakalen und abdominalen Ganglien. In *L. migratoria* wurde gezeigt, dass ein octopaminerges DUM-Neuron, *viz.* DUM1b, die Speicheldrüsen innerviert (BRÄUNIG *et al.* 1994). Abbildung 4.3 zeigt eine Zeichnung aus jener Arbeit, in der zur deutlicheren Darstellung unilateral der Weg des DUM1b zur Speicheldrüse von *L. migratoria* rot nachgezeichnet wurde.

Das Soma dieses DUM-Neurons befindet sich im Metathorakalganglion und sendet ein Axon in den 1. Nerv des Ganglions (N1), der sich zusammen mit dem DUM1b-Axon mehrfach verästelt. Abzweigungen des DUM1b-Axons ziehen unter anderem weiter durch Nerv 1B, der neben thorakalen Muskeln auch die Speicheldrüse innerviert. Nerv 1B sendet Äste des DUM1b in den Transversalnerv, der wiederum mit dem SDN verbunden ist und auch durch diesen Äste des DUM1b zur Drüse sendet. Analog ist im Mesothorakalganglion ein DUM1b-Neuron lokalisiert, das ein identisches peripheres Verzweigungsmuster zeigt, also ebenfalls die Speicheldrüse innerviert (BRÄUNIG *et al.* 1994). Auch im SDN der Schabe wurden neben Typ1-Fasern stets Typ2-Fasern gefärbt. Zur eindeutigen Klärung der Herkunft dieser Fasern müsste jedoch eine retrograde Färbung des SDN durchgeführt werden.

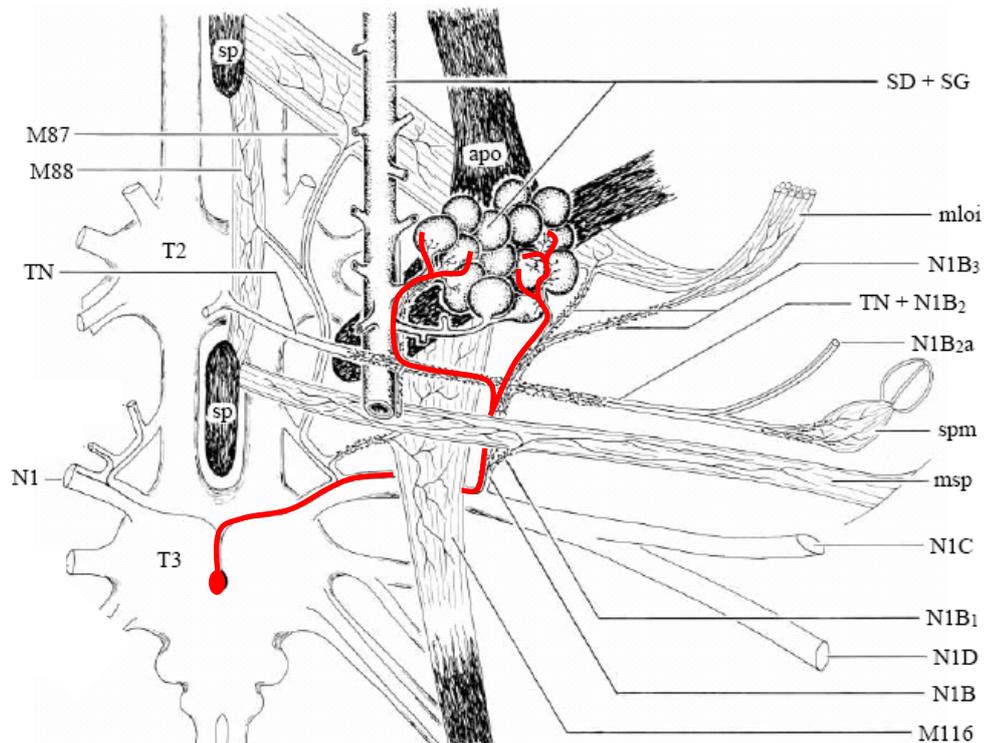


Abb. 4.3 (nach BRÄUNIG *et al.*, 1994) Dargestellt sind die peripheren Wege des DUM1b-Neurons, dessen Soma im Metathorakalganglion lokalisiert ist. DUM1b innerviert neben einer Vielzahl von Muskeln auch die Speicheldrüsen in *Locusta migratoria* (rot nachgezeichnet). Abkürzungen: M87, M88, mloi, msp, spm = Muskeln, die durch DUM1b innerviert werden; N1 = 1. Nerv des Metathorakalganglions; SD = Speicheldrüse; SG = Speichelgang; TN = Transversalnerv; T2 & T3 = Meso- bzw. Metathorakalganglion.

4.4.4. Die physiologische Rolle der tyraminergen und octopaminergen Innervierung

Octopamin und Tyramin beeinflussen in Insekten die Motorik und den Metabolismus. Dabei haben sie oft entgegengesetzte Wirkung (ROEDER *et al.* 2003). Daher werden diese Amine auch als das Gegenstück zum adrenergen System der Vertebraten betrachtet. Während Octopamin die intrazelluläre cAMP- oder Ca^{2+} -Konzentration über Gs- oder Gq-gekoppelte Rezeptoren anhebt, bewirkt Tyramin das Gegenteil durch Aktivierung von Gi-Proteinen (ROEDER, 2005). Octopamin wirkt daher meist erregend auf seine Zielzelle, Tyramin dagegen hemmend. Dies deckt sich einerseits mit den Kopplungseigenschaften des Tyramin-Rezeptors PeaTYR1, der auch in der Speicheldrüse exprimiert wird (s.o.) und andererseits mit dem exzitatorischen Effekt geringer Octopamin-Konzentrationen auf die sekretorischen Potentiale der Acinuszellen.

Bislang ist relativ wenig über die Wirkungen von Tyramin in Insekten bekannt. Eine *Drosophila*-Mutante (*honoka*), die eine geringe Konzentration von Tyramin-Rezeptoren besitzt, zeigt ein eingeschränktes olfaktorisches Verhalten und ist im Gegensatz zum Wildtyp leicht hyperaktiv (KUTSUKAKE *et al.* 2000). Auch eine parakrine Wirkung von endogen synthetisiertem Tyramin in Malpighischen Gefäßen von *Drosophila* wurde untersucht. Dort führt Tyramin zu einer erhöhten Cl^{-} -Permeabilität und wirkt somit diuretisch (BLUMENTHAL 2003).

Die Expression des Tyramin-Rezeptors PeaTYR1 und die reichliche Innervierung der Drüsenbestandteile durch Typ1-Nervenfasern unterstützen die Hypothese, dass Tyramin nicht nur das Substrat der T β H ist, sondern auch eine Funktion als unabhängiger Neuromodulator im Drüsenkomplex hat. Eine immunocytochemische Lokalisierung der T β H könnte Aufschluss darüber geben. Fehlt sie in tyraminergen Fasern, kann davon ausgegangen werden, dass diese Fasern Tyramin als Transmitter bzw. Neuromodulator freisetzen. Ist sie vorhanden, könnten Tyramin und Octopamin oder nur Octopamin freigesetzt werden.

Wie bereits weiter oben diskutiert, gehe ich davon aus, dass Tyramin zwar eine physiologische Rolle im Drüsenkomplex spielt, jedoch nicht primär für eine erhöhte Transmitterfreisetzung verantwortlich ist. Tyramin scheint eher ein inhibitorisch wirkender Transmitter im Drüsenkomplex zu sein. Auch wenn sich diese Aussage ausschließlich auf die Eigenschaften des in HEK-Zellen exprimierten PeaTYR1 stützt, gehe ich davon aus,

dass Tyramin die durch den Nerv (unbekannten Ursprungs) zur Drüse gesendeten Impulse unterdrückt, bzw. deren Transmitterfreisetzung verringert, und somit die durch diesen Nerv induzierte Sekretion mindert. Leider ist der Transmittergehalt der dickeren Fasern in diesem Nerv bislang unbekannt. Daher ist auch unklar, welche Rolle diese Fasern in der Speichelsekretion spielen.

Die Wirkungen von Octopamin in Insekten sind besser charakterisiert als die von Tyramin. Stress kann beispielsweise zu einem erhöhten Octopaminspiegel in der Hämolymphe führen (MÖBIUS & PENZLIN 1993). Des Weiteren wurde gezeigt, dass Octopamin die Muskelspannung und Relaxationsrate eines Beinmuskels von *S. gregaria* erhöht (EVANS & O'SHEA 1977, EVANS & SIEGLER 1982). Es wird angenommen, dass dadurch die Reaktionszeit des Muskels an schnelle Bewegungen (Laufen) gegenüber der Haltespannung während des Fluges angepasst wird. Octopamin ist auch in die Modulierung der Flugmuskulatur involviert, wo Octopamin an der Umschaltung der primären Energiequelle (Kohlehydrate oder Fett), die während der Muskelarbeit genutzt wird, beteiligt ist (MENTEL *et al.* 2003). Während des Fluges verstärkt Octopamin die Muskeleffizienz (MALAMUD *et al.* 1988). Zusammenfassend wirkt Octopamin meist erregend auf die Neurotransmission und damit auf seine Zielorgane. Diese erregende Wirkung kann prä- oder postsynaptisch vermittelt werden.

Octopamin wurde zwar erstmals in einer Speicheldrüse (*Octopus*) entdeckt, aber bis heute gab es keine Anhaltspunkte über die Funktion des Amins in diesem Organ (ERSPAMER & BORETTI 1951). Die vorliegende Arbeit zeigt deutlich, dass die durch SDN-Stimulierung induzierten Potentialänderungen der Acinuszellen von *P. americana* bereits durch sehr geringe Octopamin-Konzentrationen verstärkt wurden, was auf eine modulierte serotonerge und/oder dopaminerge Neurotransmission im Drüsenkomplex zurückzuführen war. Zwar wurden mit Octopamin bislang keine Sekretionsmessungen durchgeführt, aufgrund der präsynaptischen Wirkung und der Parallelen zum GABA-Effekt kann jedoch auch hier davon ausgegangen werden, dass die Sekretionsrate durch Octopamin erhöht wird. In der vorliegenden Arbeit wird somit ein weiteres Beispiel für eine präsynaptische erregende Wirkung von Octopamin in Insekten beschrieben.

Der Reservoirmuskel ist durch dopaminerge, serotonerge, GABAerge, tyraminerge und octopaminerge Fasern innerviert. Aufgrund der Anatomie des Muskelansatzes am Reservoir wird vermutet, dass eine Kontraktion des Reservoirmuskels das Reservoir verschließt (SUTHERLAND & CHILLSEY 1968). Dies kann einerseits die Leerung des Reservoirs, andererseits aber auch dessen Füllung unterdrücken, so dass der produzierte

Speichel nicht in das Reservoir zurückfließt, sondern direkt in den Hypopharynx abgegeben wird. Bowser-Riley (1978) hat während der Stimulierung des SDN bei *N. cinerea* Kontraktionen dieses Muskels beobachtet. Möglicherweise haben Octopamin und Tyramin hier ebenfalls eine modulierende Wirkung.

Unter bestimmten physiologischen Bedingungen könnte somit der Speichelfluss in den Hypopharynx durch Octopamin- und/oder Tyramin-Freisetzung und deren Wirkung auf die sekretorischen Potentiale der Acinuszellen und die Füllung oder Leerung des Reservoirs verstärkt oder erniedrigt werden.

Die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse lassen vermuten, dass Octopamin die Transmitterfreisetzung erhöht, während Tyramin diese - zumindest in einem Nerv - herunterreguliert. Trotzdem ist die Charakterisierung weiterer Tyramin-Rezeptoren notwendig. Es kann natürlich nicht ausgeschlossen werden, dass in den Speicheldrüsen von *P. americana* ein Tyramin-Rezeptor exprimiert wird, der erregende Wirkung vermittelt. Eine negative Modulierung der Sekretion macht angesichts der exzitatorischen Transmitter Octopamin und GABA durchaus Sinn und ist zur Regulation der Sekretion wahrscheinlich sogar notwendig. Besonders unter Mangelbedingungen (Schaben können einige Wochen ohne Wasser und Nahrung überleben) darf das Tier keine Flüssigkeit verlieren.

Die Modulierung der intraglandulären Dopamin- und 5-HT-Freisetzung durch die drei Neuromodulatoren GABA, Octopamin und Tyramin erlaubt wahrscheinlich eine Feinabstimmung der Sekretionsrate, der Speichelqualität, dessen Speicherung und Abgabe unter verschiedenen physiologischen Bedingungen. Dies macht jedoch nur dann Sinn, wenn die einzelnen Neuromodulatoren nur unter bestimmten Bedingungen freigesetzt werden. Das impliziert auch, dass die Drüse aus verschiedenen Regionen bzw. funktionellen Anteilen des Nervensystems innerviert wird, die eben nur unter bestimmten physiologischen Bedingungen Impulse zur Drüse senden.

Dem SOG entspringen die Nerven, die sowohl die Mundwerkzeuge als auch die Speicheldrüsen innervieren. Dazu zählen der Mandibularnerv, der Maxillarnerv, der Labialnerv und natürlich der Speicheldrüsenerv (SDN). WATANABE & MIZUNAMI (2006) haben gezeigt, dass aufgrund eines olfaktorischen Stimulus und sogar durch Bewegungen der Mundwerkzeuge die im SDN enthaltenen Speichelneuronen Aktionspotentiale zur Drüse senden und somit die Speichelsekretion anregen. Dies dient wahrscheinlich vorerst der erleichterten Nahrungsaufnahme, dem Einweichen fester Nahrung vor der Aufnahme und der Reinigung der Mundwerkzeuge.

Wie oben beschrieben, wird die Drüse auch durch einen paarigen Speichelnerv des stomatogastrischen Nervensystems innerviert (WILLEY 1961, DAVIS 1985). Der Speichelnerv ist ein Ast des Oesophagealnervs, der dem Hypocerebralganglion (HCG) entspringt. Dieses ist wiederum über den *Nervus recurrens* mit dem Frontalganglion (FG) verbunden. DAVEY & TREHERNE (1963) konnten zeigen, dass nach der Durchtrennung des Oesophagealnervs von *P. americana* die Leerung des Vorderdarmes nach der Nahrungsaufnahme weitgehend unterdrückt wird. Mit dem Durchtrennen des 5. Nervs des FG wurde der gleiche Effekt erzielt. Daraus schlossen sie, dass es einen Rückkopplungsmechanismus geben muss, der über Afferenzen des 5. Nervs dem FG die Füllung des Vorderdarmes anzeigt. Dadurch könnte sich auch die Aktivität des Oesophageal- und somit des Speichelnervs erhöhen. Dies würde dann zu einer vermehrten 5-HT-Freisetzung an der Speicheldrüse und zur Speichelsekretion führen. DAVEY & TREHERNE (1963) fanden in der Tat, dass Nerv 5 des FG an einem paarigen sensorischen Organ in der Intima des dorsalen Pharynx entspringt. Sie nahmen an, dass es sich dabei um einen Osmorezeptor handelt. So könnte es doch gut sein, dass der Oesophagealnerv neben der motorischen Steuerung viszeraler Darmmuskulatur auch die Speichelsekretion über den Speichelnerv anregt, um eben diesen Nahrungstransport zu erleichtern.

Das stomatogastrische Nervensystem steht außerdem mit dem zentralen Nervensystem und mit den Thorakalganglien in Verbindung, wie BRÄUNIG (2008) in *L. migratoria* zeigen konnte. Dort ziehen Axone von (octopaminergen) DUM-Neuronen über die Frontalkonnektive in das FG. Es wäre möglich, dass im FG dann wiederum die Aktivität der Fasern des Oesophagealnervs moduliert wird.

Diese Beispiele sollen vor allem zeigen, dass alle an der Sekretion und deren Modulation beteiligten Neurone auf sehr komplexe Weise zusammenwirken. In Abbildung 4.4 wurde ein Versuch unternommen, dieses Zusammenspiel anhand der in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse und anderer Arbeiten modellhaft und stark vereinfacht, jedoch anschaulich darzustellen. Dennoch ist dieses Modell aufgrund der derzeitigen Datenlage spekulativ.

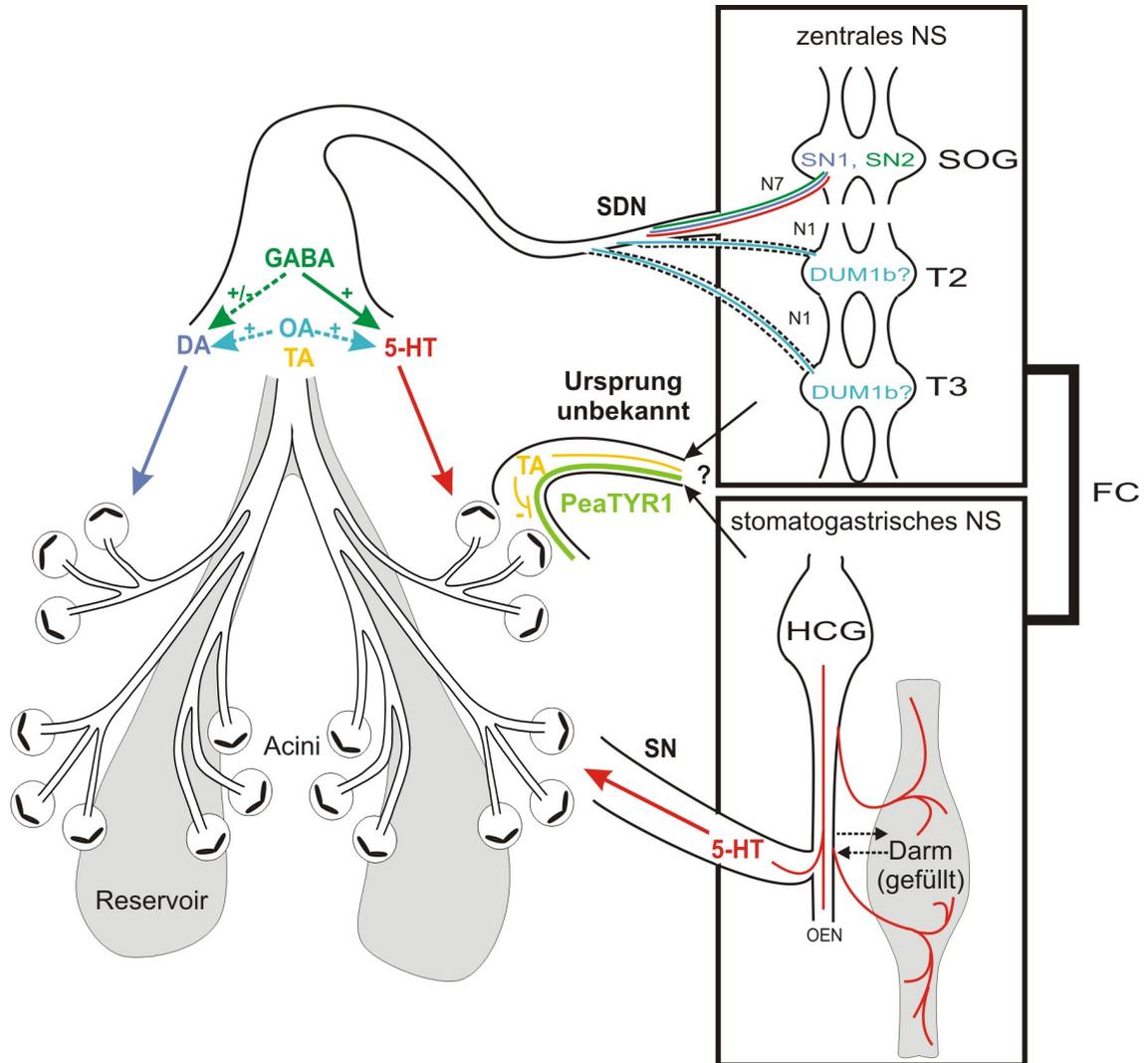


Abb. 4.4 Zusammenfassung der Wirkungen der Neurotransmitter und Neuromodulatoren in den Speicheldrüsen von *Periplaneta americana*. Erläuterungen und Referenzen finden sich im Text. Abkürzungen: 5-HT = Serotonin, DA = Dopamin, DUM1b = dorsal unpaired median Neuron 1b, FC = Frontalkonnektiv, HCG = Hypocerebralganglion, N1,7 = 1. bzw. 7. Nerv des jeweiligen Ganglions, NS = Nervensystem, OA = Octopamin, OEN = Oesophagealnerv, SDN = Speicheldrüsenerv, SN = Speichelnerv, SN1,2 = Speichelneurone 1 und 2, SOG = Subesophagealganglion, T2 = Mesothorakganglion, T3 = Metathorakganglion, TA = Tyramin.

4.5. Die Dopamin-induzierten Änderungen des basolateralen Membranpotentials

4.5.1. Die Ca^{2+} -abhängigkeit der Dopamin-induzierten Hyperpolarisation

Badapplikation von Dopamin verursacht in den Acinuszellen von *P. americana* Änderungen des basolateralen Membranpotentials (V_{bl}). Die Dopamin-induzierte Hyperpolarisation hing ganz offensichtlich von einer intrazellulären Ca^{2+} -Freisetzung ab. Es zeigte sich nämlich, dass die extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration die Potentialänderungen als Folge der ersten elektrischen Stimulierung des SDN nicht beeinflusste. Die Potentialänderungen auf darauf folgende Stimulierungen waren dagegen stark verkleinert, und die Hyperpolarisation war unterdrückt. Dies deutet darauf hin, dass zur Generierung der Potentialänderungen der Acinuszellen zunächst nur intrazellulär freigesetztes Ca^{2+} benötigt wird. Nach einem intrazellulären Ca^{2+} -Anstieg wird dieses jedoch nicht nur in das endoplasmatische Reticulum zurückgepumpt sondern auch über plasmamembranständige Ca^{2+} -Transporter in den Extrazellularraum transportiert (AMBUDKAR 2000). Sind die internen Speicher geleert, tritt in vielen Zellen ein kapazitiver Ca^{2+} -Influx über sog. SOCCs (*store-operated Ca^{2+} channels*) auf, der auch dem Wiederauffüllen geleerter intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher dient (AMBUDKAR 2000). Aufgrund der unter Ca^{2+} -freien Bedingungen nicht wieder aufgefüllten internen Ca^{2+} -Speicher resultiert eine erneute Stimulierung mit Dopamin in einer reduzierten Zellantwort, bei der die Ca^{2+} -abhängige Hyperpolarisation fehlt.

Wurde eine intrazelluläre Ca^{2+} -Erhöhung durch den Ca^{2+} -Chelator BAPTA abgepuffert, war die initiale Hyperpolarisation vollständig unterdrückt, während die Depolarisation erhalten blieb. Zusammengefasst zeigten diese Ergebnisse, dass Dopamin eine intrazelluläre Ca^{2+} -Freisetzung induziert, die zur Hyperpolarisation des V_{bl} führt.

Zwei Beobachtungen sprachen für die Ca^{2+} -abhängige Aktivierung einer basolateralen K^+ -Leitfähigkeit, die zur initialen Hyperpolarisation führt: 1.) Das V_{bl} ging während der Hyperpolarisation gegen das E_K bei -60 mV. 2.) Die experimentellen Erhöhung der elektrochemischen Triebkraft für K^+ durch Applikation einer K^+ -freien Ringerlösung während der Hyperpolarisation führte zu einer signifikant verstärkten Hyperpolarisation.

In den Speicheldrüsen von *N. cinerea* wurden die an der Dopamin-induzierten Hyperpolarisation beteiligten Transporter ebenfalls untersucht. Dort nahm die Amplitude der Dopamin-induzierten Hyperpolarisation in Ca^{2+} -freiem Ringer sukzessiv ab (GINSBORG *et al.* 1980a). Es wurde auch gezeigt, dass die Hyperpolarisation durch die Öffnung

basolateraler K^+ -Kanäle erfolgt (MITCHELL & MARTIN 1980, GINSBORG *et al.* 1980b). Die Speichelsekretion erfolgte in Ca^{2+} -freiem Ringer nur transient (GRAY & HOUSE 1982).

Zusammenfassend kann aus diesen Ergebnissen geschlossen werden, dass in *P. americana* Speicheldrüsen eine Dopamin-induzierte intrazelluläre Ca^{2+} -Freisetzung stattfindet, die zur Öffnung basolateraler K^+ -Kanäle und somit zur Hyperpolarisation des V_{bl} führt.

Leider war es in dieser Arbeit aus methodischen Gründen nicht möglich, an isolierten Drüsen den postulierte Dopamin-induzierte intrazelluläre Ca^{2+} -Anstieg mikrofluorometrisch zu messen und zu charakterisieren.

Bisher wurde Fura-2 zur Messung intrazellulärer Ca^{2+} -Änderungen in den Acinuszellen der Speicheldrüse von *P. americana* verwendet (K. RIETDORF, Dissertation an der Uni Potsdam, 2003). Fura-2 wird mit ultraviolettem Licht der Wellenlängen 340 nm und 380 nm angeregt. Dabei zeigte sich, dass die Drüsen bei Anregung mit Licht dieses Wellenlängenbereiches eine starke Autofluoreszenz haben. Zudem änderte sich die Intensität der Autofluoreszenz während der Stimulierung der Drüsen mit Dopamin. Zelluläre Autofluoreszenz wird insbesondere durch NADH und Flavoproteine verursacht, deren Anregungsmaxima bei 365 bzw. 360 und 450 nm liegen (CHANCE *et al.* 1962, BENSON *et al.* 1979). Bei Anregung von Fura-2 im UV-Bereich wird demnach die Fluoreszenz beider Komponenten angeregt. Die Emissionsmaxima von NADH und FAD liegen bei 450 nm und 520 nm (CHANCE *et al.* 1962, BENSON *et al.* 1979). Zumindest das emittierte Fluoreszenzlicht der Flavoproteine konnte den für die Fura-2-Messungen verwendeten Emissionsfilter (Bandpass 515-565) passieren und somit zum Fura-2-Fluoreszenzsignal beitragen.

Aus diesen Gründen wurde in dieser Arbeit Fura Red als Ca^{2+} -empfindlicher Indikatorfarbstoff verwendet, weil dessen Anregungs- und Emissionsspektren im längerwelligen Bereich liegen. Fura Red ist ein *dual excitation dye*, der alternierend mit zwei Wellenlängen bei 420 nm und 488 nm angeregt wird. Der Quotient der Fluoreszenzintensitäten bei beiden Anregungswellenlängen (= *ratio*) zeigt Änderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration an, ohne dass die Farbstoffkonzentration in der Zelle, sowie eine Abnahme des Fluoreszenzsignals durch Farbstoffbleichung die Messung beeinflussen.

Bei Anregung von Fura Red mit blauem Licht wird zwar ebenfalls zumindest die NADH-Fluoreszenz angeregt, allerdings sollte diese nicht zum Fura Red Fluoreszenzsignal beitragen, da das Emissionsmaximum von Fura Red bei 660 nm liegt. Der hier

verwendete Emissionsfilter (Langpass 590) schließt somit die Emissionsmaxima von NADH und Flavoproteinen weitgehend aus.

Fura-2 und Fura Red sind mit K_D -Werten von 224 nM bzw. 140 nM hochaffine Ca^{2+} -Indikatoren (TAKAHASHI *et al.* 1999). Sie sollten sich zur Messung von Ca^{2+} -Signalen eignen, die zwischen dem 0,1-fachen und dem 10-fachen ihrer K_D liegen, also für Fura Red zwischen ca. 14 nM und 1,4 μ M. Hochaffine Ca^{2+} -sensitive Farbstoffe können jedoch auch als Ca^{2+} -Puffer wirken oder schnell durch Ca^{2+} gesättigt sein. Letzteres war hier nicht der Fall, da die Ionomycin-haltige 10 mM Ca^{2+} -Lösung ein deutliches Fluoreszenzsignal von Fura Red sowohl in Acinuszellen als auch in Gangzellen induzierte. Problematisch könnte jedoch die Pufferung eines kleinen Ca^{2+} -Anstiegs sein. Mit beiden Farbstoffen konnten Ca^{2+} -Änderungen in Ausführungszellen der Speicheldrüsen von *P. americana* gemessen werden (Fura-2: K. RIETDORF, Dissertation 2003, HILLE & WALZ 2008). Allerdings gibt es bisher keine Anhaltspunkte über das Ausmaß des Ca^{2+} -Anstiegs in den Acinuszellen. Zwar änderte sich die *ratio* der Fura Red-Fluoreszenz bei experimenteller Erhöhung der intrazellulären $[Ca^{2+}]$ durch Ionomycin deutlich, jedoch wurde kein Dopamin-induzierter Anstieg der Fluoreszenz*ratio* in den Acinuszellen registriert.

Dies muss jedoch nicht bedeuten, dass kein Ca^{2+} -Anstieg erfolgt. WALZ *et al.* (2006) konnten einen Dopamin- und 5-HT-induzierten Ca^{2+} -Anstieg in Rhod-2 beladenen, isolierten Acinuszellen messen. Die K_D von Rhod-2 beträgt 1 μ M und liegt damit deutlich über der von Fura Red. Aufgrund der geringeren Affinität von Rhod-2 wäre es möglich, dass der in den Acinuszellen postulierte Ca^{2+} -Anstieg durch diesen Farbstoff nicht abgepuffert wurde. Allerdings wird Rhod-2 mit nur einer Wellenlänge angeregt. Somit werden auch Änderungen des Zellvolumens registriert, da der Farbstoff in unstimulierten Drüsen stärker verdünnt ist als in schrumpfenden (NAUNTOFTE 1992, FOSKETT *et al.* 1994) stimulierten Drüsen. Schaut man auf die Rohsignale der Messungen mit Fura Red, so wurden dort ebenfalls nach Dopamin-Stimulierung Fluoreszenzanstiege bei beiden Wellenlängen registriert, die jedoch nicht antiparallel verliefen und daher wahrscheinlich keine Ca^{2+} -Änderung darstellen. Abbildung 4.5 zeigt einen Ausschnitt aus den Rohdaten bei Anregung von Fura Red mit 420 nm während Dopamin-Stimulierung der Acini. Die registrierten Änderungen wurden durch die Anfangsintensität (F_0) vor Dopamin-Stimulierung dividiert. Die hier registrierten Fluoreszenzänderungen sind mit den in WALZ *et al.* (2006) veröffentlichten vergleichbar.

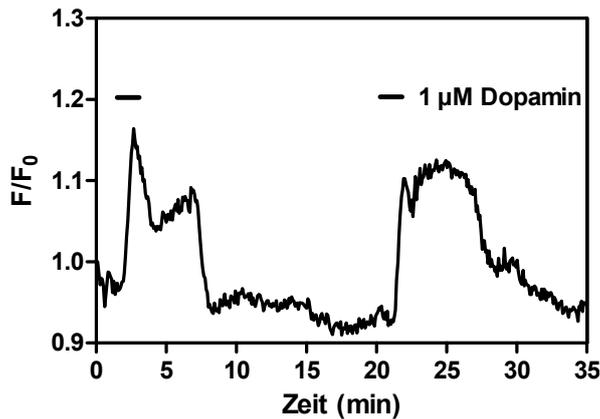


Abb. 4.5 Anstieg des Fluoreszenzsignals durch Dopamin-Stimulierung bei Anregung von Fura Red™ mit Licht der Wellenlänge 420 nm.

Es ist natürlich nicht auszuschließen, dass es sich bei diesen Änderungen um Ca^{2+} -Signale oder Mischsignale (Änderungen der Ca^{2+} -Konzentration und/oder des Zellvolumens) handelt. Auffallend ist hier der initiale transiente Fluoreszenzanstieg, der nach 5-HT-Stimulierung auch in *Calliphora vicina* Speicheldrüsen auftritt und die interne Ca^{2+} -Freisetzung widerspiegelt (ZIMMERMANN 1998). Kinetisch sind diese Änderungen demnach durchaus mit Ca^{2+} -Änderungen anderer InsektenSpeicheldrüsen zu vergleichen. Aufgrund des parallelen Verlaufs der Rohdaten in Abb. 3.24 bleibt jedoch zweifelhaft, ob diese Signale ausschließlich Ca^{2+} -Änderungen zeigen oder ob es Mischsignale sind, zu denen auch Volumenänderungen beitragen. In jedem Fall muss festgehalten werden, dass mikrofluorometrische Ca^{2+} -Messungen in den Speicheldrüsen von *P. americana* aus zwei Gründen außerordentlich problematisch sind:

- 1.) Die starke Autofluoreszenz, die sich auch Dopamin-abhängig ändern kann, erfordert die Nutzung eines im langwelligen Bereich emittierenden Farbstoffes und eines Filtersatzes, der die Emission der (die Autofluoreszenz weitgehend verursachenden) Flavoproteine und NADH ausschließt.
- 2.) Dopamin- bzw. Serotonin-induzierte Änderungen des Zellvolumens können nur durch ratiometrische Messungen aus den Messdaten ausgeschlossen werden, was die Farbstoffauswahl stark eingrenzt.

Ein geringer, sehr schneller oder räumlich lokal begrenzter Ca^{2+} -Anstieg könnte seiner Registrierung mit den hier angewandten Methoden und dem Farbstoff Fura Red aufgrund der begrenzten zeitlichen und räumlichen Auflösung während der Messungen entgehen. Möglicherweise findet die Dopamin-induzierte Ca^{2+} -Erhöhung nur lokal statt, z.B. in der Nähe der basolateralen Membran, welche die postulierten Ca^{2+} -gesteuerten K^+ -Kanäle enthält.

Um Anhaltspunkte über das Ausmaß des Ca^{2+} -Anstieges zu erhalten, könnten die Drüsen mit dem Acetoxymethylester von EGTA beladen werden. Deshalb sollen hier kurz die Eigenschaften der Ca^{2+} -Puffer EGTA und BAPTA betrachtet werden. Beide haben eine

ähnliche Dissoziationskonstante (~ 100 nM) und Diffusionsmobilität. Jedoch unterscheiden sie sich in ihrer Ca^{2+} -Bindungsrate, wobei EGTA Ca^{2+} langsamer bindet als BAPTA (NARAGHI 1997). Das liegt vor allem daran, dass EGTA bei neutralem pH-Wert, wie er in der Zelle vorkommt, protoniert ist. Um Ca^{2+} binden zu können, müssen die Protonen abdissoziieren. Aufgrund dieses Unterschieds wird BAPTA als schneller und EGTA als langsamer Ca^{2+} -Chelator bezeichnet. Es wurde bereits mehrfach gezeigt, dass Ca^{2+} -Signale unterschiedlich durch EGTA bzw. BAPTA moduliert werden (ADLER *et al.* 1991, ROBERTS 1993, PRAKRIYA *et al.* 1996). Aufgrund der schnellen Ca^{2+} -Bindung ist BAPTA in der Lage, auch kleinste, schnelle Ca^{2+} -Signale abzupuffern, wie sie in so genannten Ca^{2+} -Microdomänen beobachtet werden. EGTA kann zwar die Kinetik solcher lokalen Ca^{2+} -Signale verändern, ist jedoch nicht in der Lage, diese vollständig abzupuffern. Daher kann man durch Anwendung beider Chelatoren Anhaltspunkte über a) die räumliche Nähe von Ca^{2+} -Quellen und -Senken und b) über die Stärke des Ca^{2+} -Anstiegs erhalten (NEHER, 1998).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Drüsen mit BAPTA AM beladen, das die Dopamin-induzierte Hyperpolarisation vollständig unterdrückte. Nun wäre es interessant zu untersuchen, welchen Einfluss EGTA auf die Dopamin-induzierte Hyperpolarisation hat. In Acinuszellen der Unterkieferspeicheldrüse der Ratte konnte unter Verwendung von EGTA und BAPTA gezeigt werden, dass die an der Ca^{2+} -induzierten Ca^{2+} -Freisetzung beteiligten Ryanodin-Rezeptoren räumlich sehr eng mit Ca^{2+} -Senken wie Mitochondrien und Ca^{2+} -ATPasen assoziiert sein müssen. In diesen Zellen ist ebenfalls ein Ca^{2+} -Anstieg notwendig, um basolateral K^+ -Kanäle zu öffnen (KOPACH *et al.* 2008).

Trotz der methodischen Probleme bei den Ca^{2+} -Messungen zeigte die vorliegende Arbeit, dass eindeutig ein intrazellulärer Ca^{2+} -Anstieg zu postulieren ist, der für die Öffnung basolateraler K^+ -Kanäle verantwortlich ist.

4.5.2. Überlegungen zur Funktion der basolateralen Ca^{2+} -abhängigen K^+ -Leitfähigkeit

Zwangsläufig stellt sich hier die Frage nach der physiologischen Funktion der basolateralen K^+ -Kanäle. In den Speicheldrüsen der Vertebraten sind mindestens 4 Schlüsseltransporter an der Primärspeichelbildung beteiligt (TURNER 1993). Eine basolaterale Na^+/K^+ -ATPase energetisiert den transepithelialen Ionentransport durch die Aufrechterhaltung eines nach innen gerichteten Na^+ -Gradienten und eines nach außen gerichteten K^+ -Gradienten. Der Na^+ -Gradient treibt verschiedene Na^+ -abhängige Transporter an, unter anderem den basolateralen NKCC. Dieser transportiert Na^+ , K^+ und Cl^- in die Zelle, so dass die intrazelluläre Cl^- -Konzentration über dem elektrochemischen

Gleichgewicht liegt. Stimulus-abhängig erfolgt ein intrazellulärer Ca^{2+} -Anstieg, der zur Öffnung basolateraler K^+ -Kanäle und apikaler Cl^- -Kanäle führt. Aufgrund der Aktivität des NKCC erfolgt ein Cl^- -Efflux über die Apikalmembran in das Lumen der Drüse, während K^+ über die basolaterale Membran in den Extrazellularraum entlassen wird. Dies sorgt für die intrazelluläre Elektroneutralität während des Sekretionsprozesses, da der Cl^- -Efflux einen Überschuss positiver Ladungen in der Zelle hinterlässt, der selbigem entgegenwirkt. Aufgrund der Negativierung des TEP durch den apikalen Cl^- -Ausstrom folgt Na^+ aus dem Interstitium über den parazellulären Weg in das Lumen. Wasser folgt trans- oder parazellulär osmotisch nach. Auf diese Weise wird ein NaCl-haltiger Primärspeichel sezerniert.

In der Speicheldrüse von *P. americana* gibt es jedoch einen gravierenden Unterschied zu diesem Transportmechanismus. Zwar wird der Ionentransport auch hier durch eine Na^+/K^+ -ATPase energetisiert, diese ist jedoch in der apikalen Membran der Acinuszellen lokalisiert (JUST & WALZ 1994b). Das bedeutet, dass Na^+ hier über die apikale Membran direkt in das Lumen transportiert wird. Aufgrund des netto Auswärtstransports positiver Ladungen, hyperpolarisiert die apikale Membran und sollte einen Cl^- -Efflux begünstigen. Dazu kommt, dass die Cl^- -Konzentration in den Acinuszellen über dem elektrochemischen Gleichgewicht liegt (Gupta & Hall 1983). Die Öffnung basolateraler K^+ -Leitfähigkeiten wäre dadurch praktisch überflüssig.

Die Aktivität des NKCC in der basolateralen Membran könnte jedoch ein Recycling von K^+ -Ionen über die basolaterale Membran erfordern, das von den Ca^{2+} -aktivierten K^+ -Kanälen geleistet wird. Wie bereits beschrieben nutzt der NKCC den Na^+ -Gradienten, um pro Transportzyklus zusätzlich 1 K^+ und 2 Cl^- in die Zelle zu transportieren. Dieser Transporter ist sehr wahrscheinlich für den Dopamin-induzierten Anstieg der intrazellulären Konzentrationen von Na^+ , K^+ und Cl^- verantwortlich (RIETDORF *et al.* 2003, HILLE & WALZ 2008). Wird die Aktivität des NKCC Stimulus-abhängig verstärkt, würde K^+ in der Zelle akkumulieren. Zwar könnte es über die postulierten apikalen K^+ -Kanäle entweichen, würde jedoch zum Großteil durch die Na^+/K^+ -ATPase wieder in die Zelle zurücktransportiert werden. Die hohe intrazelluläre K^+ -Konzentration würde dann der elektrochemischen Treibkraft des NKCC entgegenwirken und andererseits die Aktivität der Na^+/K^+ -ATPase drosseln. Daher würde die Öffnung der Ca^{2+} -gesteuerten K^+ -Kanäle ein K^+ -Recycling ermöglichen.

4.5.3. Die Na⁺-Abhängigkeit der Depolarisation

In Na⁺-freiem Ringer war sowohl die Dopamin- als auch die 5-HT-induzierte Depolarisation vollständig unterdrückt. Ein Na⁺-abhängiger Transporter ist der Na⁺-K⁺-2Cl⁻-Symporter (NKCC). Aus anderen Arbeiten war bereits bekannt, dass die Aktivität des NKCC essentiell für die Speichelbildung ist. Wird der NKCC durch Bumetanid blockiert, ist die Speichelsekretion nahezu vollständig unterdrückt (RIETDORF *et al.* 2003). Der NKCC transportiert zwei Cl⁻-Ionen zusammen mit je einem Na⁺- und K⁺-Ion in das Cytoplasma. Somit ist der Ionentransport durch den NKCC elektroneutral und trägt selbst nicht zu Änderungen des Membranpotentials bei. Trotzdem konnte die Aktivität des in der basolateralen Membran der Acinuszellen lokalisierten NKCC in dieser Arbeit erstmals direkt durch intrazelluläre Ableitungen nachgewiesen werden. Blockierung des NKCC durch Bumetanid oder Na⁺-freien Ringer während Dopamin- oder 5-HT-Stimulierung resultierte in einer anhaltenden Hyperpolarisation. Die Depolarisation war durch Bumetanid erstaunlicherweise vollständig unterdrückt. Die Aktivität des NKCC muss also indirekt zu einer Depolarisation der basolateralen Membran führen.

Wie könnte die indirekte NKCC-abhängige Depolarisation zustande kommen? Wenn der NKCC zwei positive und zwei negative Ladungen in die Zelle transportiert, während Dopamin-abhängig basolaterale K⁺-Leitfähigkeiten geöffnet sind, würde das transportierte K⁺ basolateral zum Teil recycelt werden. Somit bestünde mit hoher Wahrscheinlichkeit ein Netto-Import negativer Ladungen durch den NKCC, was eine Depolarisation nicht erklären kann. Es müssen also weitere Transporter oder Kanäle an der Entstehung der Depolarisationsphase beteiligt sein. Basolaterale Na⁺-Leitfähigkeiten können nahezu ausgeschlossen werden, da die Depolarisation bei spezifischer Blockierung des NKCC vollständig unterdrückt war.

Eine weitere Möglichkeit zur Entstehung der Depolarisation wäre ein Cl⁻-Recycling über der basolateralen Membran. Sowohl in der ruhenden als auch in der stimulierten Acinuszelle ist die elektrochemische Triebkraft für Cl⁻ nach außen gerichtet (GUPTA & HALL 1983). Ein Cl⁻-Ausstrom wäre demnach denkbar. Außerdem näherte sich das V_{bl} während der Depolarisation dem berechneten Gleichgewichtspotential für Cl⁻ (E_{Cl}) an. Würden die durch den NKCC transportierten Cl⁻-Ionen das Cytoplasma durch Cl⁻-Leitfähigkeiten wieder verlassen, würde dies einerseits zu einem Nettoeinstrom positiver Ladungen (Na⁺) über den NKCC und somit zu einer Depolarisation führen. Andererseits würde die Triebkraft für den NKCC aufrechterhalten, da der elektrochemische Gradient für Cl⁻ herabgesetzt wäre. Der Cl⁻-Kanal Blocker NPPB hatte jedoch keinen Effekt auf die Depolarisationsphase. Es wäre jedoch möglich, dass diese Cl⁻-Leitfähigkeiten nicht durch NPPB blockierbar sind. Anhand von Messungen der Fluoreszenzlebenszeit Cl⁻-sensitiver

Farbstoffe konnte gezeigt werden, dass kein signifikanter Dopamin-induzierter Anstieg der intrazellulären Cl^- -Konzentration erfolgt (C. HILLE, persönliche Mitteilung). Dies kann ein Hinweis darauf sein, dass tatsächlich ein Cl^- -Recycling über der basolateralen Membran erfolgt. Andererseits bildet Cl^- das Gegenion zu Na^+ im Lumen der Drüse und kann trans- oder parazellulär dorthin gelangen. Sollten apikale Cl^- -Leitfähigkeiten in den Cl^- -Transport involviert sein, würde ebenfalls kein starker Cl^- -Anstieg erwartet werden. Leider kann dieser Aspekt mit den hier angewandten Methoden nicht abschließend geklärt werden.

Bislang ist die Permeabilität des parazellulären Weges im Drüsenepithel nicht untersucht. Es wäre auch möglich, dass elektrogene Vorgänge an der Apikalmembran zu den gemessenen Änderungen des V_{bl} beitragen. Um die genauen Abläufe des Ionentransportes endgültig zu klären, wären Messungen des transepithelialen Potentials (TEP) hilfreich. Diese gestalten sich an diesem Präparat jedoch schwierig, da das Acinuslumen sehr eng ist. Der Ableitort ist damit unsicher. Injizierter Farbstoff würde durch den Speichelfluss schnell abtransportiert werden. Außerdem würde mit hoher Wahrscheinlichkeit auch die Aktivität der Gangzellen zum TEP beitragen. Aufgrund der Aktivität der apikalen Na^+/K^+ -ATPase würde ein positives TEP erwartet werden. Im Verlauf dieser Arbeit gelang es einige Male, die Ableitelektrode in einen Bereich des Acinus zu führen, der ein leicht positives Potential von ca. 5 mV zeigte. Dopamin-Stimulierung führte dort zu einer mehr (Abb. 4.6 B) oder weniger (Abb. 4.6 A) deutlichen Hyperpolarisation, die erst nach Auswaschen des Dopamins auf den Ruhewert zurückging. In Cl^- -freiem Ringer und bei Blockierung des NKCC durch Bumetanid war die Hyperpolarisation nur transient. Dies passt zu einem transzellulären Cl^- -Transport. Aufgrund der methodischen Probleme bei diesen Messungen musste jedoch auf eine tiefer gehende Analyse dieser Signale verzichtet werden.

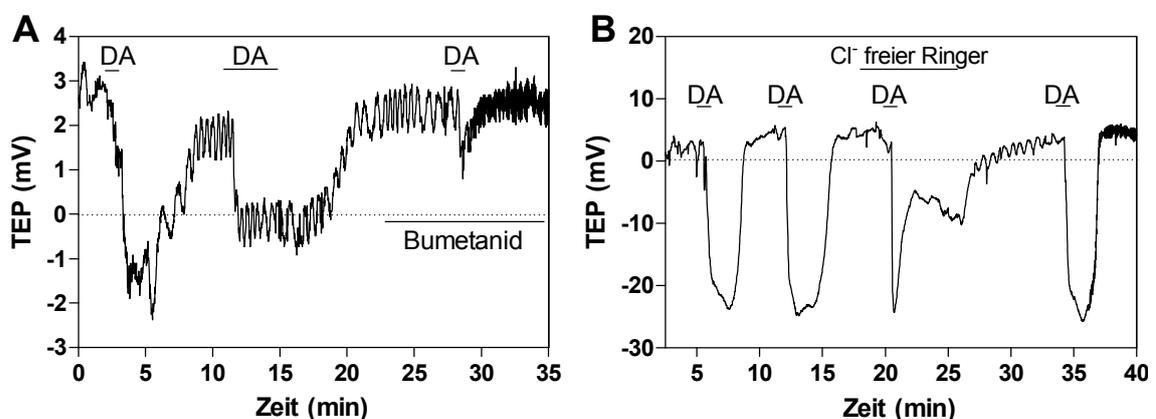


Abb. 4.6. Messungen des TEP (?) in den Acini. Erläuterungen im Text.

Das in Abbildung 1.5 gezeigte Schema zu den Transportprozessen in den Acinuszellen bleibt somit aktuell. Die Dopamin-induzierte Aktivität des NKCC und die Aktivierung einer basolateralen Ca^{2+} -gesteuerten K^+ -Leitfähigkeit wurden in der vorliegenden Arbeit erstmals direkt durch intrazelluläre Ableitungen des V_{bl} belegt.

Eine Ca^{2+} -Abhängigkeit der Depolarisationsphase der Dopamin-induzierten Acinuszellantworten konnte nicht gezeigt werden. Zwar nahm die Stärke der Depolarisation in Ca^{2+} -freiem Ringer sukzessiv ab, war jedoch deutlich länger induzierbar als die Hyperpolarisation. Wurde die intrazelluläre Ca^{2+} -Erhöhung durch BAPTA abgepuffert, war die Depolarisationsphase sogar signifikant verstärkt. Daher kann angenommen werden, dass die an der Depolarisation beteiligten Transporter anders reguliert werden.

Aus der Arbeit von RIETDORF *et al.* (2005) ist bekannt, dass die Proteinsekretion einen cAMP-Anstieg erfordert. In *N. cinerea* Speicheldrüsen induziert Dopamin einen cAMP-Anstieg, wobei unklar bleibt, in welchem Zelltyp dieser cAMP-Anstieg erfolgt (GREWE & KEBABIAN 1982). Das basolaterale Membranpotential der acinösen Zellen in *N. cinerea* konnte dagegen nur durch einen Ca^{2+} -Anstieg, niemals aber durch einen cAMP-Anstieg beeinflusst werden (MITCHELL & MARTIN 1980, GRAY *et al.* 1984). HOUSE (1980) konnte keine cAMP-induzierte Flüssigkeitssekretion beobachten, während GRAY *et al.* (1984) eine solche nachweisen konnten, die aber in Ca^{2+} -freier Ringerlösung nur transient war. RIETDORF (2003) zeigte an isolierten Speicheldrüsen von *P. americana*, dass Badapplikation von 10 mM cAMP keine oder nur eine sehr geringe Flüssigkeitssekretion auslösen konnte, obwohl die Hemmung der Adenylylcyclase durch Badapplikation von MDL 12,330 A die Sekretionsrate verringerte. In ersten Messungen des Membranpotentials von *P. americana* Acinuszellen mit Badapplikation von 100 μM 8-CPT-cAMP hatte das zellpermeable cAMP-Analogon weder einen Effekt auf das Ruhe- V_{bl} , noch auf die Dopamin-induzierten Zellantworten ($n = 2$, nicht gezeigt). Diese unterstützen damit die Ergebnisse der anderen Arbeiten, in denen angenommen wurde, dass cAMP nur modulierend auf die Flüssigkeitssekretion wirkt.

Ein weiterer verbreiteter Botenstoff ist cGMP. RIETDORF *et al.* (2005) zeigten jedoch, dass cGMP keinen signifikanten Effekt auf die Proteinsekretion der Acini hatte. Auch die Dopamin-induzierte Flüssigkeitssekretion wurde nicht durch cGMP beeinflusst. Dies spricht gegen die Dopamin- oder 5-HT-abhängige Aktivierung einer Guanylylcyclase und des cGMP-Weges.

4.6. Ausblick

Die vorliegende Arbeit trug zur Kenntnis der komplexen Funktionsweise der Speicheldrüsen der Schabe *P. americana* bei und erweiterte das lückenhafte Wissen über die neuronale Kontrolle exokriner Drüsen bei Insekten. So konnten einerseits exzitatorische Neuromodulatoren wie GABA und Octopamin und andererseits inhibitorische Neuromodulatoren wie Tyramin (und GABA) identifiziert werden. Das komplizierte Zusammenspiel aller die Drüse innervierenden Nerven und deren Neurotransmitter und Neuromodulatoren in der Speichelsekretion sollte unbedingt weiter untersucht werden.

Ein besseres Verständnis des Zusammenwirkens der einzelnen Neuronenpopulationen im Sekretionsprozess erfordert zwingend die Lokalisierung der Somata der octopaminergen und tyraminergen Neurone. Durch retrograde Biotinfärbungen und anschließende immunocytochemische Untersuchungen könnte sowohl deren Ursprung als auch - wenn unbekannt - der Transmittergehalt bestimmt werden.

In weiteren elektrophysiologischen Studien wäre dann zu klären, unter welchen Bedingungen die einzelnen Nerven, die zur Innervierung der Drüse beitragen, Impulse zur Drüse senden. Dazu sollten Ableitungen der betreffenden Nerven am lebenden Tier erfolgen. Unter diesen Bedingungen könnte die Wirkung unterschiedlichen Nahrungsangebotes und anderer Faktoren auf die neuronale Aktivität untersucht werden. Weiterhin würde die umfassende Charakterisierung der Amin-Rezeptoren in der Speicheldrüse von *P. americana* die physiologischen Untersuchungen unterstützen und ergänzen. So sind etwa die exakte Lokalisation der GABA- und Octopamin-Rezeptoren und deren Kopplung an intrazelluläre Signalwege zu untersuchen und eine Korrelation mit den physiologisch erhobenen Daten zu prüfen. Zum besseren Verständnis der Tyramin-Wirkung im Drüsenkomplex wäre die Charakterisierung weiterer Rezeptoren wichtig.

Interessant wäre auch die Ausstattung der beteiligten Nerven mit Peptiden, die man in dieser Speicheldrüse bis jetzt nicht untersucht hat. In *L. migratoria* wurde beispielsweise ein Peptid (Lom-SG-SASP) identifiziert, das die Speichelsekretion potenziert (VEELAERT *et al.* 1995). Peptide spielen eine wichtige Rolle in allen bisher untersuchten Organen und im Nervensystem der Insekten. Um die Speichelsekretion unter physiologischen Bedingungen vollständig verstehen zu können, sind Kenntnisse über beteiligte Peptide und deren Herkunft unerlässlich.

Diese Arbeit lieferte auch Ergebnisse, die das bislang angenommene Modell zum Ionentransport in den Acinuszellen von *Periplaneta* unterstützten. Zur Untersuchung der intrazellulären Signalwege in den Acinuszellen und zur weiteren Charakterisierung der an der Sekretion beteiligten Ionentransport-Mechanismen wäre die Etablierung eines

experimentellen Ansatzes zur Messung des transepithelialen Potentials und patch clamp-Messungen an isolierten Acinuszellen notwendig.

5. Literaturverzeichnis

ADLER, E.M., AUGUSTINE, G.J., DUFFY, S.N., CHARLTON, M.P. (1991). Alien intracellular calcium chelators attenuate neurotransmitter release at the squid giant synapse. *J Neurosci.* **11**: 1496-1507.

ALI, D.W., ORCHARD I., LANGE A.B. (1993). The aminergic control of locust (*Locusta migratoria*) salivary glands: evidence for serotonergic and dopaminergic innervation. *J Insect Physiol.* **39**: 623-632.

ALI, D.W. (1997). The aminergic and peptidergic innervation of insect salivary glands. *J Exp Biol.* **200**: 1941-1949.

AMBUDKAR, I.S. (2000). Regulation of calcium in salivary gland secretion. *Crit Rev Oral Biol Med.* **11**: 4-25.

BAI, D., SATTELLE, D. (1995). A GABA_B receptor on an identified insect motor neurone. *J Exp Biol.* **198**: 889-894.

BAINES, R.A., TYRER, N.M. (1989). The innervation of locust salivary glands II. Physiology of excitation and modulation. *J Comp Physiol A.* **165**: 407-413.

BAUMANN, O., DAMES, P., KÜHNEL, D., WALZ, B. (2002). Distribution of serotonergic and dopaminergic nerve fibers in the salivary gland complex of the cockroach *Periplaneta americana*. *BMC Physiol.* **2**: 1-15.

BAUMANN, O., KÜHNEL, D., DAMES, P., WALZ, B. (2004). Dopaminergic and serotonergic innervation of cockroach salivary glands: distribution and morphology of synapses and release sites. *J Exp Biol.* **207**: 2565-2575.

- BENSON, R.C., MEYER, R.A., ZARUBA, M.E., MCKHANN, G.M. (1979). Cellular autofluorescence - is it due to flavins? *J Histochem Cytochem.* **27**: 44-48.
- BETTLER, B., KAUPMANN, K., MOSBACHER, J., GASSMANN, M. (2004). Molecular structure and physiological functions of GABA_B receptors. *Physiol Rev.* **84**: 835-867.
- BISCHOF, L.J., ENAN E.E. (2004). Cloning, expression and functional analysis of an octopamine receptor from *Periplaneta americana*. *Insect Biochem Mol Biol.* **34**: 511-521.
- BLENAU, W., BALFANZ, S., BAUMANN, A. (2000). Amtyr1: characterization of a gene from honeybee (*Apis mellifera*) brain encoding a functional tyramine receptor. *J Neurochem.* **74**: 900-908.
- 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.
- BLUMENTHAL, E.M. (2003). Regulation of chloride permeability by endogenously produced tyramine in the *Drosophila* Malpighian tubule. *Am J Physiol Cell Physiol.* **284**: C718-C728.
- BOWERY, N.G., BETTLER, B., FROESTL, W., GALLAGHER, J.P., MARSHALL, F., RAITERI, M., BONNER, T.I., ENNA, S.J. (2002). International Union of Pharmacology. XXXIII. Mammalian γ -aminobutyric acid B receptors: structure and function. *Pharmacol Rev.* **54**: 247-264.
- BOWSER-RILEY, F., HOUSE, C.R. (1976). The actions of some putative neurotransmitters on the cockroach salivary gland. *J Exp Biol.* **64**: 665-676.
- BRADFORD, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal Biochem.* **72**: 15-23.
- BRÄUNIG, P. (1987). The satellite nervous system - an extensive neurohemal network in the locust head. *J Comp Physiol A.* **160**: 69-77.

- BRÄUNIG, P., STEVENSON, P.A., EVANS, P.D. (1994) A locust octopamine-immunoreactive dorsal unpaired median neurone forming terminal networks on sympathetic nerves. *J exp Biol.* **192**: 225–238.
- BRÄUNIG, P. (2008) Neuronal connections between central and enteric nervous system in the locust, *Locusta migratoria*. *Cell Tissue Res.* **333**: 159-168.
- BUCKINGHAM, S.D., BIGGIN, P.C., SATTELLE, B.M., BROWN, L.A., SATTELLE, D.A. (2005). Insect GABA receptors: Splicing, editing, and targeting by antiparasitics and insecticides, *Mol Pharmacol.* **68**: 942–951.
- BUCKINGHAM, S. D., SATTELLE, D.B. (2005). GABA receptors of insects. *Gilbert, L.I., Iakrou K., Gill, S.S. editors. Comprehensive molecular insect science V.* 107–142. Elsevier Press, Oxford, United Kingdom.
- CAZZAMALI, G., KLAERKE, D.A., GRIMMELIKHUIJZEN, C.J.P. (2005). A new family of insect tyramine receptors. *Biochem Biophys Res Commun.* **338**: 1189-1196.
- CHANCE, B., COHEN, B., JOBSIS, F., SCHOENER, B. (1962). Intracellular oxidation-reduction states in vivo. *Science.* **137**: 499-508.
- CHAVIS, P., MOLLARD, P., BOCKAERT, J., MANZONI, O. (1998). Visualization of cyclic AMP–regulated presynaptic activity at cerebellar granule cells. *Neuron.* **20**: 773–781.
- CHEBIB, M., JOHNSTON, G.A.R. (1999) The ‘ABC’ of GABA receptors: A brief review. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* **26**: 937–940.
- DACKS, A.M., CHRISTENSEN, T.A., AGRICOLA, H.J., WOLLWEBER, L., HILDEBRAND, J.G. (2005). Octopamine-immunoreactive neurons in the brain and subesophageal ganglion of the hawkmoth *Manduca sexta*. *J Comp Neurol.* **488**: 255–268.
- DAVENPORT, A.P., WRIGHT, D.J. (1986). Octopamine distribution in the larvae and adults of two species of moth, *Spodoptera littoralis* and *Manduca sexta*. *J Insect Physiol.* **32**: 987-993.

- DAVEY, K.G., TREHERNE, J.E. (1963). Studies on crop function in the cockroach (*Periplaneta americana* L.) II. The nervous control of crop-emptying. *J Exp Biol.* **40**: 775-780.
- DAVIS, N.T. (1985). Serotonin-immunoreactive visceral nerves and neurohemal system in the cockroach *Periplaneta americana* (L.). *Cell Tissue Res.* **240**: 593-600.
- DAVIS, N.T. (1987). Neurosecretory neurons and their projections to the serotonin neurohemal system of the cockroach *Periplaneta americana* (L.), and identification of mandibular and maxillary motor neurons associated with this system. *J Comp Neurol.* **259**: 604-621.
- DEITMER, J.W., SCHILD, D. (2000). Ca^{2+} und pH: Ionenmessungen in Zellen und Geweben. *Spektrum Akademischer Verlag Gustav Fischer 1.Auflage, Berlin.*
- ELIA, A.J., ALI, D.W., ORCHARD, I. (1994). Immunochemical staining of tyrosine hydroxylase (TH)-like material in the salivary glands and ventral nerve cord of the cockroach, *Periplaneta americana* (L.). *J Insect Physiol.* **40**: 671-683.
- ENAN, E.E. (2005). Molecular response of *Drosophila melanogaster* tyramine receptor cascade to plant essential oils. *Insect Biochem Mol Biol.* **35**: 309-321.
- ENNA, S.J. (2001). A GABA(B) mystery: the search for pharmacologically distinct GABA(B) receptors. *Mol Interv.* **1**: 208-218.
- ERSPAMER, V., BORETTI, G. (1951). Identification and characterization, by paper chromatography, of enteramine, octopamine, tyramine, histamine and allied substances in extracts of posterior salivary glands of octopoda and in other tissue extracts of vertebrates and invertebrates. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* **88**: 296-332.
- EVANS, G.J.O., MORGAN, A. (2003). Regulation of the exocytotic machinery by cAMP-dependent protein kinase: implications for presynaptic plasticity. *Biochem Soc Trans.* **31**.
- EVANS, P.D., O'SHEA, M. (1977). An octopaminergic neurone modulates neuromuscular transmission in the locust. *Nature.* **270**: 257-9.

- EVANS, P.D., SIEGLER, M.V. (1982). Octopamine mediated relaxation of maintained and catch tension in locust skeletal muscle. *J Physiol.* **324**: 93-112.
- FAROOQUI, T. (2007). Octopamine-Mediated Neuromodulation of Insect Senses
Neurochem Res. **32**: 1511-1529.
- FIORETTI, B., CASTIGLI, E., CALZUOLA, I., HARPER, A.A., FRANCIOLINI, F., CATACUZZENO, L. (2004). NPPB block of the intermediate-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channel. *Eur J Pharmacol.* **497**: 1-6.
- FOSKETT, J.K., WONG, M.M., SUE-A-QUAN, G., ROBERTSON, M.A. (1994). Isosmotic modulation of cell volume and intracellular ion activities during stimulation of single exocrine cells. *J Exp Zool.* **268**: 104-110.
- GIFFORD, A.N., NICHOLSON, R.A., PITMAN, R.M. (1991). The dopamine and 5-hydroxy-tryptamine content of locust and cockroach salivary neurones. *J Exp Biol.* **161**: 405-414.
- GINSBORG, B.L., HOUSE, C.R., SILINSKY, E.M. (1974). Conductance changes associated with the secretory potential in the cockroach salivary gland. *J Physiol.* **236**: 723-731.
- GINSBORG, B.L., HOUSE, C.R. (1976). The responses to nerve stimulation of the salivary gland of *Nauphoeta cinerea* Olivier. *J Physiol.* **262**: 477-487.
- GINSBORG, B.L., HOUSE, C.R., SILINSKY, E.M. (1976). On the receptors which mediate the hyperpolarization of salivary gland cells of *Nauphoeta cinerea* Olivier. *J Physiol.* **262**: 489-500.
- 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.

- GRAY, D.C., HOUSE, C.R. (1982). The influence of calcium on the control of fluid secretion in the cockroach salivary gland. *Q 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. *Q J Exp Physiol.* **69**: 171-186.
- GREWE, C.W., KEBABIAN, J.W. (1982). Dopamine stimulates production of cyclic AMP by the salivary glands of the cockroach, *Nauphoeta cinerea*. *Cell Mol Neurobiol.* **2**: 65-69.
- GUPTA, B.L., HALL, T.A. (1983). Ionic distribution in dopamine-stimulated NaCl fluid-secreting cockroach salivary glands. *Am J Physiol.* **244**: R176-R186.
- HASHIMOTO, T., KURIYAMA, K. (1997). In vivo evidence that GABA_B receptors are negatively coupled to adenylate cyclase in rat striatum. *J Neurochem.* **69**: 365–370.
- HILL, D.R., BOWERY, N.G., HUDSON, A.L. (1984). Inhibition of GABA_B receptor binding by guanyl nucleotides. *J Neurochem.* **42**: 652–657.
- HILLE, C., WALZ, B. (2008). Characterisation of neurotransmitter-induced electrolyte transport in cockroach salivary glands by intracellular Ca²⁺, Na⁺ and pH measurements in duct cells. *J Exp Biol.* **211**: 568-76.
- HIRONO, M., YOSHIOKA, T., KONISHI, S. (2001). GABA(B) receptor activation enhances mGluR-mediated responses at cerebellar excitatory synapses. *Nat Neurosci.* **4**: 1207-1216.
- HOUSE, C.R., GINSBORG, B.L., SILINSKY, E.M. (1973). Dopamine receptors in cockroach salivary gland cells. *Nat New Biol.* **245**: 63.
- HOUSE, C.R. (1975) Intracellular recording of secretory potentials in a "mixed" salivary gland. *Experientia.* **31**: 904-906.
- HOUSE, C.R., SMITH, R.K. (1978). On the receptors involved in the nervous control of salivary secretion by *Nauphoeta cinerea* Olivier. *J Physiol.* **279**: 457-471.

- HOUSE, C.R., GINSBORG, B.L. (1985). Salivary Gland. In: Kerkut, G.A. & Gilbert, L.I. (Ed.): *Comprehensive Insect Physiology and Pharmacology*. Pergamon Press, Oxford: 195-224.
- 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). Immunocytochemical localization of Na⁺/K⁺-ATPase and 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.
- KANEKO, M., TAKAHASHI, T. (2004). Presynaptic mechanism underlying cAMP dependent synaptic potentiation. *J Neurosci.* **24**: 5202-5208.
- KEATING, C., ORCHARD, I. (2001). Dopamine induces hyperpolarization of locust salivary gland acinar cells via D1-like receptors. *J Insect Physiol.* **47**:667-673.
- KEATING, C., ORCHARD, I. (2004). The effects of dopamine agonists and antagonists on the secretory responses in the salivary glands of the locust (*Locusta migratoria*). *J Insect Physiol.* **50**: 17-23.
- KESSEL, R.G., BEAMS, H.W. (1963). Electron microscope observations on the salivary gland of the cockroach, *Periplaneta americana*. *Z Zellforsch.* **59**: 857-877.
- KLAGGES, B.R., HEIMBECK, G., GODENSCHWEGE, T.A., HOFBAUER, A., PFLUGFELDER, G.O., REIFEGERSTE, R., REISCH, D., SCHAUPP, M., BUCHNER, S., BUCHNER, E. (1996). Invertebrate synapsins: a single gene codes for several isoforms in *Drosophila*. *J Neurosci.* **16**: 3154-3165.
- KOPACH, O., KRUGLIKOV, I., PIVNEVA, T., VOITENKO, N., FEDIRKO, N. (2008). Functional coupling between ryanodine receptors, mitochondria and Ca(2+) ATPases in rat submandibular acinar cells. *Cell Calcium.* **43**: 469-481.

- KUTSUKAKE, M., KOMATSU, A., YAMAMOTO, D., ISHIWA-CHIGUSA, S. (2000). A tyramine receptor gene mutation causes a defective olfactory behavior in *Drosophila melanogaster*. *Gene*. **245**: 31-42.
- LANG, I., WALZ, B. (1999a). Dopamine stimulates salivary duct cells in the cockroach, *Periplaneta americana*. *J Exp Biol*. **202**: 729-738.
- LANG, I., WALZ, B. (1999b). Dye-coupling between cells of the salivary glands in the cockroach *Periplaneta americana*. *Cell Tissue Res*. **298**: 357-360.
- LANG, I., WALZ, B. (2001). Dopamine-induced epithelial K⁺ and Na⁺ movements in the salivary ducts of *Periplaneta americana*. *J Insect Physiol*. **47**: 465-474.
- MACDERMOTT, A.B., ROLE, L.W., SIEGELBAUM, S.A. (1999). Presynaptic ionotropic receptors and the control of transmitter release. *Annu Rev Neurosci*. **22**: 443-485.
- MALAMUD, J.G., MISZIN, A.P., JOSEPHSON, R.K. (1988). The effects of octopamine on contraction kinetics and power output of the locust flight muscle. *J Comp Physiol*. **165**: 827-835.
- 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.
- MAXWELL, D.J. (1981). The presence of gap junctions in the septate desmosomes of the salivary apparatus of the cockroach, *Nauphoeta cinerea*. *J Exp Biol*. **94**: 341-344.
- MELVIN, J.E. (1999). Chloride channels and salivary gland function. *Crit Rev Oral Biol Med*. **10**: 199-209.
- MENTEL, T., DUCH, C., STYPA, H., WEGENER, G., MÜLLER, U., PFLÜGER, H.J. (2003). Central modulatory neurons control fuel selection in flight muscle of migratory locust. *J Neurosci*. **23**: 1109-1113.
- MITCHELL, M.R., MARTIN, A.R. (1980). An electrophysiological study of the effects of ionophore A23187 on *Nauphoeta* salivary glands. *Q J Exp Physiol*. **65**: 309-320.

- MÖBIUS, P., PENZLIN, H. (1993). Stress-induced release of octopamine in the American cockroach *Periplaneta americana* L. *Acta Biol Hung.* **44**: 45-50.
- NARAGHI, M. (1997). T-jump study of calcium binding kinetics of calcium chelators. *Cell Calcium.* **22**: 255-268.
- NAUNTOFTE, B. (1992). Regulation of electrolyte and fluid secretion in salivary acinar cells. *Am J Physiol.* **263**: G823-G837.
- NEHER, E. (1998). Vesicle pools and Ca²⁺ microdomains: New tools for understanding their roles in neurotransmitter release. *Neuron.* **20**: 389-399.
- NEHER, E., SAKABA, T. (2008). Multiple roles of calcium ions in the regulation of neurotransmitter release. *Neuron.* **59**: 861-72.
- OHTA, H., UTSUMI, T., OZOE, Y. (2003). B96Bom encodes a *Bombyx mori* tyramine receptor negatively coupled to adenylate cyclase. *Insect Mol Biol.* **12**: 217-223.
- OLIANAS, M.C., ONALI, P. (1999). GABA_B receptor-mediated stimulation of adenylyl cyclase activity in membranes of rat olfactory bulb. *Br J Pharmacol.* **126**: 657-664.
- OLSEN, R.W. (2006). Picrotoxin-like channel blockers of GABA_A receptors. *PNAS.* **103**: 6081-6082.
- OSCHMAN, J.L., BERRIDGE, M.J. (1970). Structural and functional aspects of salivary fluid secretion in *Calliphora*. *Tissue Cell.* **2**: 281-310.
- PARRAMÓN, M., GONZÁLEZ, M.P., HERRERO, M.T., OSET-GASQUE, M.J. (1995). GABA_B receptors increase intracellular calcium concentrations in chromaffin cells through two different pathways: their role in catecholamine secretion. *J Neurosci Res.* **41**: 65-72.
- PETERSEN, O.H., MARUYAMA, Y. (1984). Calcium-activated potassium channels and their role in secretion. *Nature.* **307**: 693-696.
- PETERSEN, O.H., FINDLAY, I., SUZUKI, K., DUNNE, M.J. (1986). Messenger-mediated control of potassium channels in secretory cells. *J exp Biol.* **124**: 33-52.

- POELS, J., SUNER, M.M., NEEDHAM, M., TORFS, H., DE RIJCK, J., DE LOOF, A., DUNBAR, S.J., VANDEN BROECK, J. (2001). Functional expression of a locust tyramine receptor in murine erythroleukaemia cells. *Insect Mol Biol.* **10**: 541-548.
- PRAKRIYA, M., SOLARO, C.R., LINGLE, C.J. (1996). $[Ca^{2+}]_i$ elevations detected by BK channels during Ca^{2+} influx and muscarine-mediated release of Ca^{2+} from intracellular stores in rat chromaffin cells. *J Neurosci.* **16**: 4344-4359.
- REALE, V., HANNAN, F., MIDGLEY, J.M., EVANS, P.D. (1997). The expression of a cloned *Drosophila* octopamine/tyramine receptor in *Xenopus* oocytes. *Brain Res.* **769**: 309-320.
- REX, E., KOMUNIECKI, R.W. (2002). Characterization of a tyramine receptor from *Caenorhabditis elegans*. *J Neurochem.* **82**: 1352-1359.
- 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 bumetanide. *J Insect Physiol.* **49**: 205-215.
- RIETDORF, K., BLENAU, W., WALZ, B. (2005). Protein secretion in cockroach salivary glands requires both, an increase in Ca^{2+} and cAMP concentrations. *J Insect Physiol.* **51**: 1083-1091.
- ROBB, S., CHEEK, T.R., HANNAN, F.L., HALL, L.M., MIDGLEY, J.M., EVANS, P.D. (1994). Agonist-specific coupling of a cloned *Drosophila* octopamine/tyramine receptor to multiple second messenger systems. *EMBO J.* **13**: 1325-1330.
- ROBERTS, W.M. (1993). Spatial calcium buffering in saccular hair cells. *Nature.* **363**: 74-76.
- ROEDER, T. (1999). Octopamine in invertebrates. *Prog Neurobiol.* **59**: 533-561.
- ROEDER, T., SEIFERT, M., KÄHLER, C., GEWECKE, M. (2003). Tyramine and octopamine: antagonistic modulators of behavior and metabolism. *Arch Insect Biochem Physiol.* **54**: 1-13.

- ROEDER, T. (2005). Tyramine and octopamine: ruling behavior and metabolism. *Annu Rev Entomol.* **50**: 447-77.
- ROMANENKO, V.G., NAKAMOTO, T., SRIVASTAVA, A., BEGENISICH, T., MELVIN, J.E. (2007). Regulation of membrane potential and fluid secretion by Ca²⁺-activated K⁺ channels in mouse submandibular glands. *J Physiol.* **581**: 801-17.
- ROTTE, C., WALZ, B., BAUMANN, O. (2008). Morphological and functional characterization of the thoracic portion of blowfly salivary glands. *Arthropod Struct Dev.* **37**: 372-382.
- ROTTE, C., WITTE, J., BLENAU, W., BAUMANN, O., WALZ, B. (2009a). Source, topography and excitatory effects of GABAergic innervation in cockroach salivary glands. *J Exp Biol.* **212**: 126-136.
- ROTTE, C., KRACH, C., BALFANZ, S., BAUMANN, A., WALZ, B., BLENAU, W. (2009b). Molecular characterization and localization of the first tyramine receptor of the American cockroach (*Periplaneta americana*). *Neuroscience*. (Article in Press).
- SATTELLE, D.B., LUMMIS, S.C., WONG, J.F., RAUH, J.J. (1991). Pharmacology of insect GABA receptors. *Neurochem Res.* **16**: 363-374.
- SAUDOU, F., AMLAIKY, N., PLASSAT, J.L., BORRELLI, E., HEN, R. (1990). Cloning and characterization of a *Drosophila* tyramine receptor. *EMBO J.* **9**: 3611-3617.
- SCHACHTNER, J., BRÄUNIG, P. (1993). The activity pattern of identified neurosecretory cells during feeding behaviour in the locust. *J Exp Biol.* **185**: 287-303.
- SCHACHTNER, J., BRÄUNIG, P. (1995). Activity pattern of suboesophageal ganglion cells innervating the salivary glands of the locust *Locusta migratoria*. *J Comp Physiol A.* **176**: 491-501.
- SHEN, W., SLAUGHTER, M.M. (1999). Metabotropic GABA receptors facilitate L-type and inhibit N-type calcium channels in single salamander retinal neurons. *J Physiol.* **516**: 711-718.
- SKOU, J.C., ESMANN, M. (1992). The Na,K-ATPase. *J Bioenerg Biomembr.* **24**: 249-261.

- SMITH, R.K., HOUSE, C.R. (1977). Fluid secretion by isolated cockroach salivary glands. *Experientia*. **33**: 1182-1184.
- SMITH, R.K., HOUSE, C.R. (1979). Ion and water transport by isolated cockroach salivary glands. *J Membr Biol*. **51**: 325-346.
- STAUFER, B., SCHACHTNER, J. BRÄUNIG, P. (1994) Complex innervation of insect visceral organs: New aspects of locust salivary gland innervation. *Elsner N., Breer, H. (eds) Sensory transduction. Proc. 22nd Göttingen Neurobiol Conference. Thieme, Stuttgart, p 598.*
- STEIN, V., NICOLL, R.A. (2003). GABA generates excitement. *Neuron*. **37**: 375-378.
- SUTHERLAND, D.J., CHILLSEYZN, J.M. (1968). Function and operation of cockroach salivary reservoir. *J Insect Physiol*. **14**: 21-31.
- TAKAHASHI, A., CAMACHO, P., LECHLEITER, J.D., HERMAN, B. (1999). Measurement of intracellular calcium. *Physiol Rev*. **79**: 1089-1125.
- TROPPMANN, B., WALZ, B., BLENAU, W. (2007). Pharmacology of serotonin-induced salivary secretion in *Periplaneta americana*. *J Insect Physiol*. **53**: 774-781.
- TURNER, R.J. (1993). Mechanisms of Fluid Secretion by Salivary Glands. *Ann N Y Acad Sci*. **694**: 24-35.
- TYZIO, R., COSART, R., KHALILOV, I., MINLEBAEV, M., HÜBNER, C.A., REPRESA, A., BEN-ARI, Y., KHAZIPOV, R. (2006). Maternal oxytocin triggers a transient inhibitory switch in GABA signaling in the fetal brain during delivery. *Science*. **314**: 1788-1792.
- VEELAERT, D., SCHOOF, L., PROOST, P., VAN DAMME, J., DEVREESE, B., VAN BEEUMEN, J., DE LOOF, A. (1995). Isolation and identification of Lom-SG-SASP, a salivation stimulating peptide from the salivary glands of *Locusta migratoria*. *Regul Pept*. **57**: 221-226.
- VIERK, R., PFLÜGER, H.J., DUCH, C. (2009). Differential effects of octopamine and tyramine on the central pattern generator for *Manduca* flight. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol*. **195**: 265-277.

- WALDROP, B., CHRISTENSEN, T.A., HILDEBRAND, J.G. (1987). GABA-mediated synaptic inhibition of projection neurons in the antennal lobes of the sphinx moth, *Manduca sexta*. *J Comp Physiol A*. **161**: 23-32.
- WALZ, B., BAUMANN, O., KRACH, C., BAUMANN, A., BLENAU, W. (2006). The aminergic control of cockroach salivary glands. *Arch Insect Biochem Physiol*. **62**: 141-152.
- WASZCZAK, B.L., HRUSKA, R.E. WALTERS, J.R. (1980). GABAergic actions of THIP in vivo and vitro: a comparison with muscimol and GABA. *Eur J Pharmacol*. **65**: 21-29.
- WATANABE, H., MIZUNAMI, M. (2006). Classical conditioning of activities of salivary neurones in the cockroach. *J Exp Biol*. **209**: 766-779.
- WATANABE, H., MIZUNAMI, M. (2007). Pavlov's cockroach: Classical conditioning of salivation in an insect. *PLoS ONE*. **2**: e529.
- WATKINS, B.L., BURROWS, M. (1989). GABA-like immunoreactivity in the suboesophageal ganglion of the locust *Schistocerca gregaria*. *Cell Tissue Res*. **258**: 53-63.
- WHITEHEAD, A.T. (1971). The innervation of the salivary gland in the American cockroach: light and electron microscopic observations. *J Morphol*. **135**: 483-506.
- WILLEY, R.B. (1961). The morphology of the stomodeal nervous system in *Periplaneta americana* (L.) and other *Blattaria*. *J Morphol*. **108**: 219-262.
- WILSON, R.I., LAURENT, G. (2005). Role of GABAergic inhibition in shaping odor-evoked spatiotemporal patterns in the *Drosophila* antennal lobe. *J Neurosci*. **25**: 9069-9079.
- WOODWARD, R.M., POLENZANI, L., MILEDI, R. (1993). Characterization of bicuculline/baclofen-insensitive (rho-like) gamma-aminobutyric acid receptors expressed in *Xenopus* oocytes. II. Pharmacology of gamma-aminobutyric acidA and gamma-aminobutyric acidB receptor agonists and antagonists. *Mol Pharmacol*. **43**: 609-625.
- ZHANG, J., TIAN, N., SLAUGHTER, M.M. (1998). Neuronal Discriminator Formed by Metabotropic g-Aminobutyric Acid Receptors *J Neurophysiol*. **80**: 3365-3368.

ZIMMERMANN, B. (1998). Calcium store depletion activates two distinct calcium entry pathways in secretory cells of the blowfly salivary gland. *Cell Calcium*. **23**: 53-63.

I. Abbildungsverzeichnis

- 1.1 Biosynthese der Phenolamine Tyramin und Octopamin.
- 1.2 Morphologie der Speicheldrüse von *P. americana*
- 1.3 Schematische Darstellung der strukturellen Organisation eines Acinus mit Ausführgang
- 1.4 Schematische Darstellung der Innervation des Drüsenkomplexes
- 1.5 Vereinfachtes Modell zum Ionen-transport in den Acini und Gängen der Speicheldrüse von *Periplaneta americana*.

- 2.1 Experimenteller Aufbau der elektrophysiologischen Messungen
- 2.2 Experimentelle Anordnung für Messungen der Speichelsekretion
- 2.3 Anregungs- und Emissionsspektrum von Fura Red
- 2.4 Schematische Darstellung der Versuchsanordnung für mikrofluorometrische Ca^{2+} -Messungen

- 3.1 Einfluss von Dopamin-Badapplikation auf das basolaterale Membranpotential von Acinuszellen
- 3.2 Einfluss von 5-HT-Badapplikation auf das basolaterale Membranpotential von Acinuszellen
- 3.3 Dopamin- und 5-HT-induzierte V_{bl} -Änderungen der Acinuszellen in Ab- bzw. Anwesenheit von GABA
- 3.4 Wirkung von Tyramin bzw. Octopamin auf das basolaterale Membranpotential der Acinuszellen
- 3.5 Durch SDN-Stimulierung induzierte Änderungen des basolateralen Membranpotentials der Acinuszellen
- 3.6 GABA-Applikation während der elektrischen Stimulierung des Speicheldrüsenervs
- 3.7 Wirkungen GABA_B-Rezeptor-spezifischer Agonisten und Antagonisten

- 3.8 Wirkungen GABA_A- bzw. GABA_C-Rezeptor-spezifischer Agonisten und Antagonisten
- 3.9 Einfluss von Tyramin und Octopamin auf die durch SDN-Stimulierung induzierten V_{bl}-Änderungen der Acinuszellen
- 3.10 Einfluss von GABA auf die Flüssigkeits- und Proteinsekretionsrate
- 3.11 Spezifität der Tyramin- und Octopamin-Markierung an Totalpräparaten
- 3.12 Verteilung Tyramin- und Octopamin-positiver Nervenfasern über den Acini
- 3.13 Verteilung Tyramin- und Octopamin-immunreaktiver Fasern im SDN
- 3.14 Verteilung von Tyramin- und Octopamin-Immunreaktivität in Nervenfasern, die verschiedene Lobuli miteinander verbinden
- 3.15 Verteilung der Fasertypen über den Acini
- 3.16 Innervation der Speicheldrüsengänge
- 3.17 Tyraminerge und octopaminerger Innervation des Reservoirs und des Reservoirmuskels
- 3.18 Verteilung des Tyramin-Rezeptors PeaTYR1 in Gesamtpräparaten
- 3.19 Assoziation des PeaTYR1 mit Synapsin-Foci
- 3.20 Durchschnittliche Dopamin-induzierte V_{bl}-Änderungen
- 3.21 Abhängigkeit der ΔV_{bl} während der Hyperpolarisation von der extrazellulären K⁺-Konzentration
- 3.22 Abhängigkeit der Dopamin-induzierten V_{bl}-Änderungen von der Verfügbarkeit extrazellulärer bzw. intrazellulärer Ca²⁺-Ionen
- 3.23 Fluoreszenzbilder einer mit 40 μ M Fura Red beladenen Drüse
- 3.24 Dopamin-induzierte intrazelluläre Ca²⁺-Änderungen
- 3.25 Abhängigkeit der Depolarisation von der Verfügbarkeit extrazellulären Na⁺ und von der Aktivität des NKCC
- 3.26 Abhängigkeit der Flüssigkeitssekretion von der Verfügbarkeit extrazellulären Na⁺ und der Aktivität des NKCC

- 4.1 Tyramin-Immunreaktivität im PeaTYR1-positiven Nerv
- 4.2 Vergleich der tyraminerger und octopaminerger Innervation des Speicheldrüsenkomplexes
- 4.3 Die peripheren Projektionen des DUM1b-Neurons in *L. migratoria*
- 4.4 Zusammenfassung der Wirkungen der Neurotransmitter und Neuromodulatoren in den Speicheldrüsen von *Periplaneta americana*
- 4.5 Anstieg des Fluoreszenzsignals durch Dopamin-Stimulierung bei Anregung von Fura Red mit Licht der Wellenlänge 420 nm
- 4.6 Messungen des TEP in den Acini

II. Tabellenverzeichnis

- 2.1 Zusammensetzung der Ringerlösungen (mM)
 - 2.2 Substanzen
 - 2.3 Fixierungen und Immuncytochemie
 - 2.4 Primäre Antikörper
 - 2.5 Sekundäre Antikörper und Phalloidine
-
- 3.1 Ionale Zusammensetzung des Cytoplasmas der Acinuszellen vor und während der Stimulierung mit 1 μM Dopamin und die daraus berechneten Gleichgewichtspotentiale für Na^+ , K^+ und Cl^- .

III. Abkürzungsverzeichnis

5-HT	5-Hydroxytryptamin, Serotonin
8-cpt-cAMP	8-(4-Chlorophenylthio)-adenosine-3',5'- cyclic monophosphate
AM	Acetoxymethylester
ANOVA	Analysis of Variance
BAPTA	1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid
BSA	<i>bovine serum albumine</i> (Rinderserum-Albumin)
CGP52432	3-[[[(3,4-Dichlorophenyl)methyl]amino]propyl]diethoxymethyl) phosphinic acid
CGP54626	[S-(R*,R*)]-[3-[[1-(3,4-Dichlorophenyl)ethyl]amino]-2-hydroxypropyl](cyclohexylmethyl) phosphinic acid
C-Zelle	Zentral(<i>central</i>)zelle bzw. Zymogene Zelle
DA	Dopamin
DUM-Neuron	<i>dorsal unpaired median</i> Neuron
EC ₅₀	Konzentration mit halbmaximalem Effekt
EGTA	Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid
E _{ion}	Gleichgewichtspotential eines Ions
F	Fluoreszenz
GABA	<i>gamma</i> -Aminobuttersäure
GABA _{A/B/C} R	GABA Rezeptor
HEK	<i>human embryo kidney</i>
IF	Immunfluoreszenz

K _D	Dissoziationskonstante
LM	Lösungsmittel
MW	Mittelwert
NGS	<i>normal goat serum</i> , Ziegenserum
NKCC	Na ⁺ -K ⁺ -2Cl ⁻ -Symporter
NPPB	5-Nitro-2-(3-phenylpropylamino)benzoic acid
OA	Octopamin
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PeaTYR1-CPL3	Antikörper gegen die 3. cytoplasmatische Domäne des <i>Periplaneta americana</i> Tyramin-Rezeptors 1
PP	Phosphatpuffer
P-Zelle	Periphere Zelle bzw. Parietalzelle
R	<i>ratio</i> , Quotient
RT	Raumtemperatur
SDN	Speicheldrüsenerv
SF	Standardfehler („standard error“)
SKF97541	3-Aminopropyl(methyl)phosphinic acid
SN1, 2	Speichelneuron 1 und 2
SOG	Suboesophagealganglion
TA	Tyramin
TDC	Tyrosindecaboxylase
THIP	4,5,6,7-Tetrahydroisoxazolo[5,4-c]pyridin-3-ol hydrochloride
TPMPA	(1,2,5,6-Tetrahydropyridin-4-yl)methylphosphinic acid
TβH	Tyramin-β-Hydroxylase
V _{bl}	basolaterales Membranpotential
viz.	namentlich

Danksagung

Ich danke Herrn *Prof. Dr. Bernd Walz* für die Überlassung dieses interessanten Themas sowie die gute Betreuung meiner Doktorarbeit. Er zeigte mir immer wieder neue Denkweisen auf und förderte somit maßgeblich mein selbständiges wissenschaftliches Arbeiten.

Prof. Dr. Hans Joachim Pflüger, Prof. Dr. Joachim Schachtner und Prof. Dr. Ansgar Büschges danke ich für die Bereitschaft zur Übernahme der Begutachtung dieser Dissertation.

Ein großes Dankeschön geht an die gesamte AG Zoophysiologie für das tolle Arbeitsklima und die Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit:

Insbesondere danke ich *apl. Prof. Dr. Otto Baumann* und *PD Dr. Wolfgang Blenau* für viele anregende Tipps, für Hilfen bei der Mikroskopie und bei der Anfertigung der Publikationen.

Angela Hubig und *Bärbel Wuntke* danke ich für gut organisierte Labore sowie die Einführung in die verschiedensten Techniken des Laboralltags. Natürlich bedanke ich mich auch bei allen Doktoranden und Diplomanden, die während meiner Zeit in der AG Zoophysiologie arbeiteten. Ohne Euch hätte ich nur halb so viel Spaß gehabt.

Dank auch an unser „Jungszimmer“ (*Markus Thamm, Lennart Fechner, Kristoffer Heindorff*) für Kaffee, Kuchen und lustige Runden mit klebrigem Basketball.

Bei meinen Bürokolleginnen *Bettina Schewe* und *Britta Troppmann* bedanke ich mich für die schöne Zeit. Ihr hattet immer ein offenes Ohr für mich. Die drei Jahre waren viel zu schnell vorbei. Ich werde euch vermissen!

Allen Mitgliedern des *Graduiertenkollegs 837 „Functional Insect Science“* danke ich für die lustigen Wochenenden in Gülpe. In diesem Zusammenhang sei der *Deutschen Forschungsgemeinschaft* für das Stipendium gedankt.

Bei meinen *Eltern*, meinem Bruder *Guido* und meinen *Großeltern* bedanke ich mich für die stete Unterstützung und Motivation während der Anfertigung dieser Arbeit und ab dem ersten Tag meines Biologie-Studiums. Ihr habt immer hinter mir gestanden und mir gezeigt, dass ich mich auf euch verlassen kann.

Bei *Wencke, Nancy* und *Doreen* bedanke ich mich für ihre (oft nicht ganz freiwillige) Anteilnahme an einer ihnen doch recht fremden Welt der Physiologie und dafür, dass sie meine guten wie schlechten Launen ertragen haben. Ein „Schnegge, du schaffst das!“ tat immer gut.

Am Ende möchte ich mich bei meinem Freund *Thomas Bradler* bedanken, der fast die gesamte Zeit der Promotion mit mir zusammen erlebt hat. Er hat mich immer in meinen Entscheidungen unterstützt und mir stets das Gefühl vermittelt, das Richtige zu tun. Damit hat er mir viel Mut und Zuversicht gegeben. Ich freue mich darauf, die Früchte dieser Arbeit mit dir zusammen zu ernten!

Curriculum vitae

Persönliche Daten

NAME Cathleen Rotte
GEBURTSDATUM 19. April 1980
GEBURTSORT Potsdam

Studium

seit 05/2006 Promotionsstudium im Fach Zoophysiologie,
Universität Potsdam

Stipendiatin und studentische Sprecherin des DFG-
geförderten Graduiertenkollegs 837 "Functional Insect
Science"
Anfertigung einer Dissertation zum Thema: Die neuronale
Kontrolle der Speicheldrüsen von *Periplaneta americana*.
Betreuer: Prof. Dr. Bernd Walz

10/2000 - 02/2006 Biologie-Studium, Universität Potsdam

Anfertigung einer Diplomarbeit zum Thema: Morphologische
und funktionelle Charakterisierung des thorakalen Anteils der
Speicheldrüsen von *Calliphora vicina*.
Betreuer: Apl. Prof. Dr. Otto Baumann, AG Zoophysiologie
Abschluss: Diplom-Biologin

Berufsausbildung

09/1999 - 04/2000 Berufsausbildung zur Steuerfachangestellten,
Freund & Partner GmbH, Steuerberatungsgesellschaft,
Niederlassung Potsdam
Die Berufsausbildung wurde meinerseits wegen falscher
Berufswahl abgebrochen.

Schulbildung

09/1992 - 06/1999 Gymnasium Michendorf,
Abschluss: Abitur

09/1986 - 08/1992 Otto Nagel Gesamtschule in Nuthetal

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 15.07.2009

Cathleen Rotte