

Aus dem Medizinischen Zentrum für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. J. A. Werner
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg
in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH
Standort Marburg

Strukturelle und funktionelle Veränderung der Glandula submandibularis der Wistar-Ratte nach intraglandulärer Applikation von Botulinumtoxin

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Franziska P. M. Sommer
aus Ludwigshafen am Rhein

Marburg 2009

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg
am 11.1.2010.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan:

Prof. Dr. med. M. Rothmund

Referent:

Prof. Dr. med. A. Teymoortash

Korreferent:

Prof. Dr. Y. Cetin

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|--|---------------|
| 1 EINLEITUNG | - 1 - |
| 1.1 Einleitung und Fragestellung | - 1 - |
| 1.2 Literaturübersicht | - 2 - |
| 1.2.1 Aufbau und Funktion der Gl. submandibularis der Ratte | - 2 - |
| 1.2.1.1 Makroskopische Anatomie | - 2 - |
| 1.2.1.2 Histologische Morphologie und Ultrastruktur..... | - 4 - |
| 1.2.1.3 Zusammensetzung und Funktion des Speichels | - 6 - |
| 1.2.1.4 Physiologie der Speichelproduktion..... | - 7 - |
| 1.2.1.5 Vergleichende Morphologie und Physiologie der Speicheldrüsen..... | - 8 - |
| 1.2.2 Proteinexozytose in den Azinuszellen der Speicheldrüsen | - 9 - |
| 1.2.3 Botulinumtoxine | - 13 - |
| 1.2.3.1 Allgemeines | - 13 - |
| 1.2.3.2 Stoffwechselweg und Wirkmechanismus der Botulinumtoxine | - 15 - |
| 1.2.3.3 Klinische Bedeutung der Botulinumtoxine | - 18 - |
| 2 MATERIAL UND METHODEN | - 19 - |
| 2.1. Material | - 19 - |
| 2.1.1 Versuchstiere | - 19 - |
| 2.1.2 Medikamente | - 19 - |
| 2.1.3 Eingesetzte Antikörper | - 20 - |
| 2.2 Tierversuche und Gewebeprobengewinnung | - 21 - |
| 2.3 Histologische Untersuchungen | - 23 - |
| 2.3.1 Gewebeaufbereitung | - 23 - |
| 2.3.2 Toluidinblau-Pyronin-Färbung | - 25 - |
| 2.3.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung | - 26 - |
| 2.3.4 Morphometrische Messungen | - 26 - |

| | |
|---|---------------|
| 2.4 Immunhistochemische Untersuchungen | - 27 - |
| 2.5 Western Blot Analyse | - 28 - |
| 2.5.1 Proteinextraktion..... | - 28 - |
| 2.5.2 Proteinkonzentrationsbestimmung | - 29 - |
| 2.5.3 Herstellung der Gele, SDS-PAGE..... | - 30 - |
| 2.5.4 Protein Blotting..... | - 31 - |
| 2.5.5 Detektion mit amylasespezifischen Antikörpern..... | - 32 - |
| 2.5.6 Darstellen der Proteine | - 32 - |
| 2.5.7 Ladekontrolle mit Anti-β-Actin Antikörper | - 33 - |
| 2.6 Elektronenmikroskopische Untersuchungen..... | - 33 - |
| 2.7 Statistische Methoden | - 34 - |
| 3. ERGEBNISSE..... | - 36 - |
| 3.1 DrüsenGewichtsanalysen | - 36 - |
| 3.2 Morphometrische Messungen | - 37 - |
| 3.3 Histologische Untersuchungen | - 39 - |
| 3.4 Immunhistochemische Untersuchungen | - 41 - |
| 3.5 Western Blot Analyse | - 42 - |
| 3.6 Elektronenmikroskopische Untersuchungen..... | - 44 - |
| 4. DISKUSSION | - 50 - |
| 5. ZUSAMMENFASSUNG..... | - 56 - |
| 6. LITERATURVERZEICHNIS | - 58 - |
| 7. ANHANG | - 68 - |

| | |
|---|---------------|
| Abkürzungsverzeichnis | - 68 - |
| Laborgeräte | - 69 - |
| Liste der verwendeten Gebrauchslösungen und Puffer | - 72 - |
| Lebenslauf | - 75 - |
| Akademische Lehrer | - 76 - |
| Danksagungen..... | - 77 - |
| Ehrenwörtliche Erklärung..... | - 79 - |
| Englische Zusammenfassung..... | - 80 - |

1 Einleitung

1.1 Einleitung und Fragestellung

Bei verschiedenen mit Hypersalivation einhergehenden Krankheitsbildern, wie Amyotrophe Lateralsklerose (ALS), Morbus Parkinson und Zerebralparese, besteht eine ausgeprägte funktionelle und psychische Belastung der Patienten aufgrund des übermäßigen Speichelflusses. Die Betroffenen leiden insbesondere unter erschwerter Nahrungsaufnahme und Artikulation, Aspirationsproblemen, Dermatitisen und entzündlichen Lungen- und Bronchialerkrankungen.

Die intraglanduläre Applikation von Botulinumtoxin (BoNT), einem von dem Bakterium *Clostridium botulinum* produzierten hochmolekularen Protein, hat sich in den letzten Jahren als effektive Therapie der Hypersalivation erwiesen. Aufmerksam wurde man auf diese Wirkung des Toxins durch die bei Vergiftungen mit BoNT (Botulismus) beobachtete Xerostomie. Zunächst wurde die Blockierung der Speichelsekretion durch BoNT in tierexperimentellen Untersuchungen nachgewiesen [84]. Seit einigen Jahren wird diese Substanz nun erfolgreich und zunehmend routinemäßig in der Behandlung der Hypersalivation am Menschen eingesetzt. Die Wirksamkeit des Toxins konnte in vielen klinischen Untersuchungen bestätigt werden [24,26,49,56,60]. BoNT führt durch die Spaltung von SNARE-Proteinen des Exozytoseapparates an der neuroglandulären Synapse zur Blockade der exozytotischen Ausschüttung von Acetylcholin und damit zu einer pharmakologischen Denervierung der Speicheldrüsen (Parasympathektomie). Dies bewirkt eine Reduktion des Speichelflusses. Die Wirkung der Toxine auf den Exozytoseapparat nichtneuronaler, exokriner Zellen ist noch nicht hinreichend geklärt. Auch die genaue Wirkung der Botulinumtoxine auf die Morphologie der Speicheldrüsen ist noch nicht in allen Details bekannt.

Botulinumtoxine werden immunologisch in die Subtypen A-G unterteilt, die selektiv jeweils ein Protein des Exozytoseapparates neuronaler Zellen spalten. Seit 1979 wird BoNT Typ A (BoNT/A) zur Behandlung am Menschen angewandt [74]. Die Entwicklung von Behandlungsresistenzen gegen BoNT/A durch Induktion von Antikörpern hat in den letzten

Jahren den Anstoß gegeben, alternative clostridiale Neurotoxine für die Behandlung am Menschen zu testen. Derzeit sind zur Behandlung am Menschen BoNT Typ A und B zugelassen.

In der bisher einzigen Arbeit zur Wirkung von BoNT auf die Morphologie der Speicheldrüsen konnten nach intraglandulärer Injektion von BoNT Typ A im Tierversuch keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf Zellzahl und Zellflächengröße festgestellt werden [25]. Die Wirkung von BoNT Typ B wurde nicht getestet.

Exakte Untersuchungen zu den funktionellen, morphologischen und ultrastrukturellen Veränderungen der Speicheldrüsen nach BoNT-Behandlung fehlen folglich weitestgehend. So war das Ziel der vorliegenden Arbeit, mit Hilfe von Untersuchungen an Wistar-Ratten, erstmals mit unterschiedlichen etablierten Methoden wie Western Blot, Immunhistochemie, Histologie und Elektronenmikroskopie, ein besseres Verständnis der Veränderungen in Speicheldrüsen nach Applikation von BoNT Typ A und Typ B zu erhalten.

1.2 Literaturübersicht

1.2.1 Aufbau und Funktion der Gl. submandibularis der Ratte

1.2.1.1 Makroskopische Anatomie

Speicheldrüsen sind exokrine Drüsen, die um die Mundhöhle gelegen sind und in große und kleine Speicheldrüsen eingeteilt werden. Die kleinen Drüsen (Gll. salivariae minores) liegen überwiegend direkt in der Submukosa der Mundhöhle, der Zunge und den Nasennebenhöhlen. Sie werden in Gll. buccales, labiales, molares, lingualis und palatinae unterteilt [7]. Ihr Sekret ist überwiegend mukös. Die großen Speicheldrüsen (Gll. salivariae majores) liegen in einem gewissen Abstand zur Mundhöhle, mit der sie über extraglanduläre Ausführungsgänge kommunizieren. Sie werden in Gl. parotidea, Gl. submandibularis und Gl. sublingualis unterteilt.

In dieser Arbeit wurde sich auf die Untersuchung der Gll. submandibulares beschränkt, da das Gewebe der Gll. parotis intraoperativ schlecht von Binde- und Fettgewebe sowie von Lymphknoten abzugrenzen ist und deshalb nur schwer vollständig lokalisiert und

entnommen werden kann. Zudem weist die Gl. submandibularis der Ratte eine deutliche Ähnlichkeit mit der menschlichen Gl. submandibularis auf. Auch in der Literatur sind die überwiegenden Arbeiten zu Speicheldrüsen der Ratte an der Gl. submandibularis durchgeführt worden [83,69].

Die Gll. submandibulares der Wistar-Ratte liegen in der ventralen Zervikalregion auf der Höhe des Hyoides und reichen bis zum Manubrium sterni. Der anteriore Pol der Drüse wird von großen Lymphknoten bedeckt und liegt in engem Kontakt zu den kleineren Gll. sublinguales. Die Hauptausführungsgänge der Drüsen verlaufen gemeinsam entlang des M. digastricus zu ihrer Mündung auf der Plica sublingualis, direkt hinter den unteren Vorderzähnen (siehe auch Abbildung 5, intraoperativer Situs). Die Speicheldrüsen werden mit Blut aus Ästen der Arteria carotis externa versorgt. Sie sind in der Lage, ihre Durchblutung - und damit auch die Speichelproduktion - selbst durch endogene Kinine zu kontrollieren [62]. Die nervale Innervation für die Speichelbildung erfolgt über das vegetative Nervensystem. Die Kopfspeicheldrüsen werden sowohl durch sympathische als auch durch parasympathische Anteile innerviert, sogenannte duale Innervation [36]. Parasympathische Nervenendigungen haben Kontakt zu den Drüsenepithelzellen und stimulieren den Speichelfluss von dünnflüssigem, voluminösem Speichel mit niedrigem Proteingehalt u.a. durch Aktivierung der Exozytose und Weitstellung der Blutgefäße [37]. Dagegen induziert die sympathische Stimulation der Speicheldrüsen die Sekretion von zähflüssigem, proteinreichem, volumenmäßig reduzierten Speichel durch Exozytose von proteingefüllten Granula in den Azinuszellen und vermehrte Na^+ / H_2O Rückresorption [52]. Es kommt zu einer erhöhten Amylasefreisetzung. Die Flüssigkeitssekretion wird durch sympathische Stimulation nur leicht erhöht [31]. Außerdem stimulieren sympathische und parasympathische Fasern gemeinsam die Kontraktion von Myoepithelzellen zum Auspressen des Speichels und zur Regulation des Flusswiderstandes. Die Regulierung der Speichelsekretion unterliegt außer nervalen auch hormonellen Einflüssen durch z.B. Aldosteron und Angiotensin 2. Auch Reflexbögen spielen eine wichtige Rolle. So kann alleine der Anblick oder Geruch von Speisen die Speichelsekretion anregen [62].

1.2.1.2 Histologische Morphologie und Ultrastruktur

Die Speicheldrüsen sind von Bindegewebskapseln umgeben, welche reich an kollagenen Fasern sind und aus denen Bindegewebssepten in das Drüsenparenchym ziehen und es in Lappen und Läppchen unterteilen. Die Drüsenläppchen enthalten mehrere Gangverzweigungen an deren Enden sich beerenförmige, sekretorische Drüsenendstücke angliedern, die sogenannten Azinuszellen. Diese Primärspeichel sezernierenden Zellen werden je nach Zellform und Sekretionscharakteristika in serös und mukös unterteilt.

Die Gl. submandibularis ist eine gemischt seromuköse Drüse. Die zahlreichen Azini werden aus pyramidenförmigen, feingranulierten Zellen gebildet. Sie entleeren den Primärspeichel in die angeschlossenen Schaltstücke (intercalated ducts). Diese werden von einem abgeplatteten bis isoprismatischen Epithel gebildet. Die Azini und Schaltstücke sind von Myoepithelzellen umgeben. Daran schließen sich sowohl intralobulär als auch interlobulär gelegenen Streifenstücke (striated ducts) an, die aus einem hohen Zylinderepithel mit dichten Zellverbindungen und tiefen basalen Einfaltungen gebildet werden. In den Einfaltungen der Plasmamembran liegen viele Mitochondrien. An die Streifenstücke schließen sich Ausführungsgänge (excretory ducts) mit einschichtigem bis mehrreihigem Epithel und schließlich der Hauptausführungsgang (main excretory duct) an. Dieser besitzt ein zweischichtiges, kubisch bis hochprismatisches Epithel mit Bürstenzellen und entleert den Speichel dann direkt in die Mundhöhle [90]. Der schematische Aufbau einer sekretorischen Einheit ist in Abbildung 1 dargestellt. Zwischen den Schaltstücken und Streifenstücken finden sich bei der Ratte zudem sekretorische Tubuli, die im humanen Gewebe nicht vorkommen, („granular convoluted tubules“). Dabei handelt es sich um ein, durch zahlreiche seröse sekretorische Granula auffallendes, tubuläres, stark verzweigtes Zellsystem. Diese „granular convoluted tubules“ können mit den serösen Endkappen, den von Ebnerschen Halbmonden, beim Menschen verglichen werden. Sie sind bei männlichen Ratten zahlreicher ausgebildet als bei weiblichen Tieren [69]. Ein solcher sexueller Dimorphismus ist beim Menschen nicht vorhanden. Am Hilus der Drüsen treten Gefäße und Nerven ein, die sich im Drüseninneren allmählich verzweigen. Ein vaskulärer und nervaler Plexus umgibt die sekretorischen und duktalem Komponenten jedes Lobulus.

Ultrastrukturell kann das Speicheldrüsenparenchym in fünf verschiedene Zonen eingeteilt werden. Zuerst finden sich die Azini mit sekretorischen und myoepithelialen Zellen. Die Azini zeichnen sich durch große basal gelegene Kerne, reichlich perinukleär gelegenes raues endoplasmatisches Retikulum, viele kleine im Zytoplasma verteilte Golgi-Apparate (vorwiegend in Form von Mikrovesikeln), sowie große, apikal angeordnete, exkretorische Zymogengranula von mäßiger Elektronendichte aus. Diese Granula weisen eine unterschiedlich dichte Matrix auf. Apikal begrenzen die mit Mikrovilli besetzten Plasmamembranen das Azinulumen. Benachbarte Zellen stehen mit tight junctions in Verbindung. Auf die Azini folgen die Schaltstücke, welche kubische Zellen mit mehr oder minder zentrierten Kernen besitzen. Die luminalen Membranabschnitte zeigen kleine Mikrovilli und die benachbarten Zellen interdigitieren miteinander. Vereinzelt kleine, apikal gelegene Granula sowie einige Myoepithelzellen sind ebenfalls vorhanden. Die daran angeschlossenen Schaltstücke verbinden die Azini mit dem Ausführungsgangsystem der Drüse. In der Gl. submandibularis der Ratte findet man wie oben beschrieben zusätzlich die „granular convoluted tubules“. Die Zellen in diesem Abschnitt sind zylinderförmig und werden in 3 Typen unterteilt: 1. dunkle, schmale Zellen, reich an freien Ribosomen, ohne Ergastoplasma und Granula; 2. helle, granuliert Zellen mit wechselnder Menge an Granula und 3. dunkle Zellen voller Granula. Die Kerne und die übrigen Zellorganellen sind basal gelegen. Ein weiterer Abschnitt besteht aus den Streifenstücken mit hohen, zylinderförmigen Zellen und tiefen Einfaltungen der Basalmembran, relativ wenig Ergastoplasma und wenigen Granula mit elektronendichtem Inhalt. Die charakteristischen Mitochondrien befinden sich in den Falten der Basalmembran gestapelt. Zuletzt schließen sich die Ausführungsgänge, mit ebenfalls unterschiedlichen Zellen an: 1. helle, zylinderförmige, hohe Zellen; 2. dunkle, hohe Zellen mit vielen Vesikeln und 3. kleine basale Zellen. Die Zellen in diesem Abschnitt haben wenige Organellen, kaum Granula und zeigen eine mäßig ausgeprägte basale Einfaltung [83].

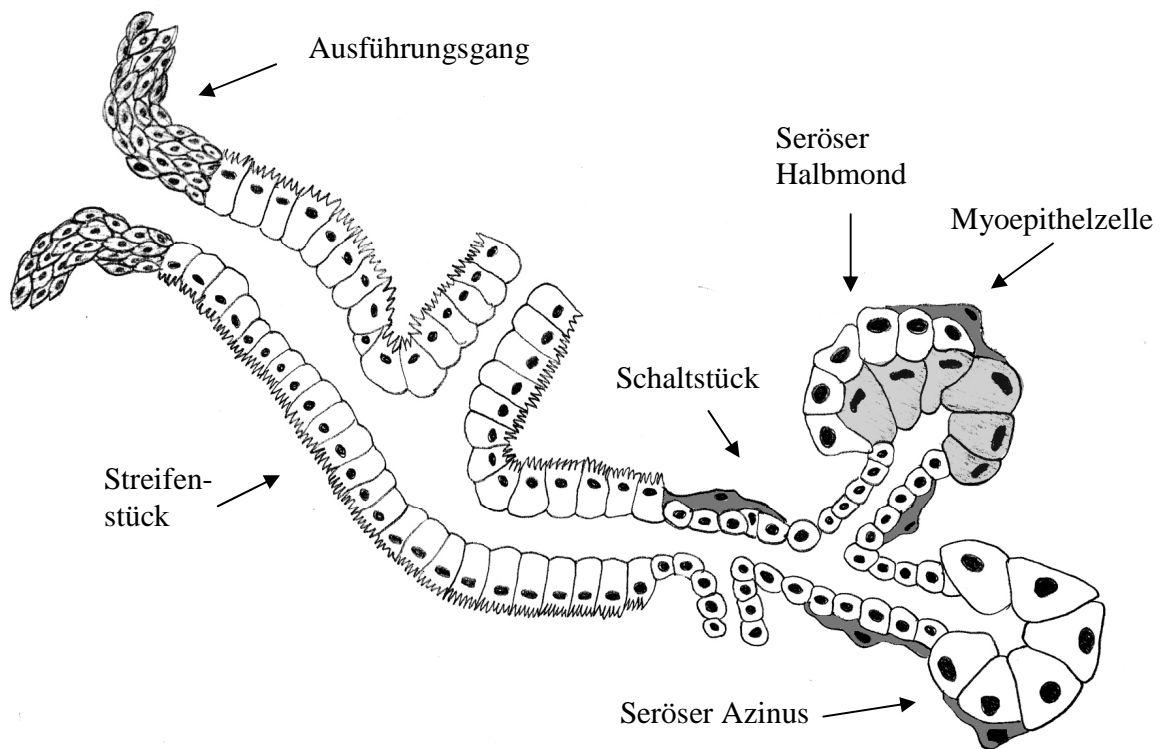


Abb. 1: Schematische Zeichnung einer sekretorischen Einheit der Gl. submandibularis. Eine sekretorische Einheit besteht aus Azinus mit Myoepithelzellen, Schaltstück, Streifenstück und Ausführungsgang.

1.2.1.3 Zusammensetzung und Funktion des Speichels

Beim täglich produzierten Speichel wird Ruhespeichel (unstimuliert) von stimuliertem Speichel unterschieden. Die Gl. submandibularis produziert weit mehr als die Hälfte des Ruhespeichels, während 50% des bei maximaler Stimulation produzierten Speichels der Gl. parotis entstammt. Die Gl. sublingualis und die kleinen Speicheldrüsen produzieren einen Speichelanteil von etwa 10%. Die Fließrate kann von 1 ml/min auf bis zu 10 ml/min gesteigert werden [7]. Während der Parotis- und Submandibularisspeichel klar und dünnflüssig ist, wird der Sublingualisspeichel als zäh und fadenziehend beschrieben.

Speichel ist hypoosmotisch, besteht zu über 99% aus Wasser und enthält nur weniger als 1% Trockenmasse. Die Osmolarität variiert mit dem Speichelfluss. Die Trockenmasse setzt sich aus speichelspezifischen Enzymen, Sialomuzinen, Plasmaproteinen, Leukozytenproteinen, Epithelzellen, Elektrolyten und Bakterien zusammen. Die

wichtigsten Elektrolyte sind Natrium, Kalium, Chlorid und Bikarbonat. Die wichtigste Proteinkomponente ist das stärke-spaltende Enzym α -Amylase (α -1,4-Glykanohydrolase). Es dient dem partiellen Abbau von hochmolekularer Nahrungsstärke zu niedermolekularen Oligosacchariden, was hauptsächlich zur Entfernung von Speiseresten an den Zähnen wichtig ist. Das Enzym wird schon im Magen zerstört [52]. Unter anderem durch die Enzyme Lysozym, Statherin und größere Mengen Immunglobulinen (besonders IgA) besitzt der Speichel antibakterielle Wirkung. Die antimikrobiellen Substanzen im Speichel werden teils von den Drüsenepithelien und teils von interstitiellen Plasmazellen gebildet [63,14]. Der hochvisköse Flüssigkeitsfilm, den der Speichel in der Mundhöhle bildet, erleichtert die Schluckfunktion, macht die Nahrung gleitfähiger und erleichtert die Stimm- und Sprachbildung. Des Weiteren stellt der Speichel ein spezielles Lösungsmittel für eine Vielzahl von Funktionsproteinen und Geschmacksstoffen dar und dient dem Schutz und der Reinigung von Mundschleimhaut und Zähnen. Er reguliert auch durch Mundtrockenheit, über das Durstgefühl, die Flüssigkeitsbilanz im Körper [18, 78].

1.2.1.4 Physiologie der Speichelproduktion

In den Azini wird plasmaähnlicher, isotoner Primärspeichel gebildet, der auf dem Weg durch das Gangsystem zu hypotonem Sekundärspeichel modifiziert wird. Die regulierte Exozytose von Verdauungsenzymen sowie Elektrolyt- und Wassersekretion findet in den Azini statt. Es werden Anionen (Cl^- , HCO_3^-) aktiv sezerniert, während Na^+ , H_2O und K^+ passiv folgen. Die Aktivität apikaler Cl^- und basolateraler K^+ Kanäle ist bestimmend für die Menge der Primärspeichelbildung. Stimulation der Sekretion erfolgt über eine Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration, wodurch Proteinkinasen aktiviert werden, welche dann zu einer gesteigerten Kanalaktivität und Flüssigkeitssekretion führen. Zudem wird in den Azinuszellen, an den Ribosomen des rauen endoplasmatischen Retikulums, der Hauptteil der Speichelproteine synthetisiert. Vom dicht gepackten, basal gelegenen endoplasmatischem Retikulum werden die Proteine, in Transportvesikel verpackt, zum Golgi-Apparat transportiert, wo sie modifiziert und sortiert werden. Anschließend wandern sie in sekretorischen Vesikeln zur apikalen Plasmamembran. Hierbei spielt das Zytoskelett eine wichtige Rolle. Bei hormonellem oder nervalem Stimulus erfolgt die über cAMP und Ca^{2+} vermittelte Exozytose ins Azinulumen (siehe Kapitel 1.2.2 Proteinexozytose). Im

unstimulierten Zustand werden die Verdauungsenzyme mit niedriger Rate konstitutiv sezerniert.

Während des Transports des Speichels durch das Ausführungsgangsystem werden Na^+ aktiv und Cl^- passiv rückresorbiert, sowie K^+ und HCO_3^- aktiv sezerniert. Zu diesem Zweck sind die Gangzellen mit speziellen Transportproteinen ausgestattet (Na^+/H^+ Austauscher, $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ Austauscher, Na^+/K^+ ATPase und viele mehr). Bei mittlerem Speichelfluss überwiegt die Resorption. Da das Wasser auf Grund der schlecht wasserdurchlässigen Ausführungsgänge nicht folgen kann, sinkt die Osmolarität des Speichels und er wird hypoton. Einige Gangzellen sezernieren Proteine wie EGF, Kallikrein, Ribonuklease, Ig A und Lysozym. Im unstimulierten Zustand entsteht so ein NaCl armer und K^+ reicher, hypotoner Speichel. Bei Stimulation der Drüse erhöht sich die Sekretionsrate auf das 5-10fache und die Elektrolytzusammensetzung nähert sich der des Plasmas an. Die HCO_3^- Konzentration liegt immer über der der Plasmakonzentration und der pH Wert liegt zwischen 5,5 und 6,1 im Ruhezustand und bei bis zu 7,8 bei Stimulation [52].

1.2.1.5 Vergleichende Morphologie und Physiologie der Speicheldrüsen

Die Speicheldrüsen aller Säugetiere haben einen ähnlichen Aufbau. Es handelt sich um tubuloazinäre Drüsen mit Azini und Schaltstücken als Produktionsorte eines Primärspeichels und einem kompliziert aufgebauten, tubulärem System. Dieses fügt dem Speichel Proteine hinzu, ist an dem Elektrolytaustausch beteiligt und leitet den so entstandenen Sekundärspeichel schließlich in die Mundhöhle. Die Sekretion wird bei allen Säugetieren von nervalen und/oder hormonellen Reizen sowie in geringerem Umfang von Diät, Alter und genetischen Faktoren beeinflusst [89]. Die wesentlichen morphologischen Unterschiede zwischen den Speicheldrüsen des Menschen und der Ratte sind, die bei der Ratte in der Gl. submandibularis vorkommenden „granular convoluted tubules“, bzw. das Fehlen der Ebnerschen Halbmonde. Die Parotis unterliegt dem gleichen histologischen Aufbau bei Mensch und Ratte, die Speichelsekretion wird bei beiden Spezies vorwiegend nerval stimuliert und die organische Zusammensetzung des Speichels ist ebenfalls vergleichbar. Grundlegende histologische oder physiologische Unterschiede sind demnach nicht vorhanden.

1.2.2 Proteinexozytose in den Azinuszellen der Speicheldrüsen

Proteintransport und Sekretion sind die Hauptaktivitäten der Azinuszellen der Speicheldrüsen [16]. Die azinäre Proteinsekretion findet durch konstitutive und regulierte Exozytose statt [5]. Über die konstitutive Exozytose sezernieren die Speicheldrüsen kontinuierlich kleinere Mengen an Speichelproteinen ohne äußere Stimulation. 80-90% der Proteine werden allerdings über die regulierte Exozytose sezerniert [15]. Sie wird von extrazellulären Stimuli kontrolliert und sichert die korrekte Zusammensetzung der Speichelbestandteile [38]. Es ist bekannt, dass mindestens zwei intrazelluläre Signalstoffe, cAMP und Ca^{2+} , die Amylasesekretion der Speicheldrüsenzellen der Ratte regulieren [13, 67]. Die genaue Rolle, die die beiden Sekretionsmechanismen bei der Amylasesekretion spielen ist nicht in allen Einzelheiten geklärt. Der dominante Mediator von Exozytose in vielen anderen exokrinen Systemen ist Ca^{2+} , die Amylasesekretion der Speicheldrüsen wird jedoch hauptsächlich durch intrazellulären cAMP-Anstieg ausgelöst [68]. Die Stimulation von β -adrenergen Rezeptoren induziert die Aktivität von Adenylatzyklasen, gefolgt von intrazellulärem cAMP-Anstieg [13]. Daraufhin wird über weitere intrazelluläre Signaltransduktion die Exozytose von Amylase ohne zytosolischen Ca^{2+} -Anstieg ausgelöst [82,4]. Cholinerge und α -adrenerge Rezeptorstimulation erhöht im Gegensatz dazu die Ca^{2+} -Konzentration in der Zelle [8] und bewirkt die Produktion von Primärspeichelflüssigkeit durch Wasser- und Ionentransport. Der Ca^{2+} -Anstieg in der Zelle induziert auch die Amylasesekretion, wobei die dadurch freigesetzte Amylasemenge wesentlich geringer als die durch cAMP freigesetzte Menge ist [68].

Die exokrinen Zellen speichern große Mengen an sekretorischen Proteinen in großen, elektronendichten Sekretionsgranula. Diese entstehen aus dem Golgi-Netzwerk. Die zuvor im endoplasmatischen Retikulum synthetisierten Proteine werden dort modifiziert, sortiert und zusammen mit Lipiden in Vakuolen verpackt, die sich als Vesikel vom Trans-Golgi-Netzwerk abschnüren. In den so entstandenen unreifen Granula sind auch einige nicht sekretorische Proteine enthalten, die während der Reifung der Vesikel zusammen mit überschüssiger Membran mit Hilfe des Proteins Clathrin abgekapselt werden [11]. Die Speichelproteine werden währenddessen weiter konzentriert. Die reifen Vesikel werden zum Reservepool nahe der Plasmamembran transportiert und dort gespeichert. Von dort aus werden sie bei extrazellulärem Stimulus mobilisiert und „docken“ mittels spezifischer

Proteine und Proteinkomplexe an die Plasmamembran. Nun schließt sich die eigentliche Exozytose an.

Exozytose beschreibt den Prozess, in dem die Membran eines intrazellulären Vesikels mit der Plasmamembran fusioniert, wodurch eine Öffnung vom intravesikulären Raum zum Extrazellulärraum entsteht und der Vesikelinhalt frei wird [55]. Sie findet in zwei Schritten statt: ein hauptsächlich durch cAMP stimuliertes, ATP-abhängiges „Priming“ der sekretorischen Vesikel, gefolgt von schneller, Ca^{2+} -getriggelter Membranfusion [88,55]. Membranfusion bedeutet, dass zwei verschiedene Lipidmembranen zu einer einzigen verschmelzen. Dazu müssen die Membranen zuerst in engen Kontakt gebracht werden, wobei starke elektrostatische Kräfte überwunden werden müssen [48,46]. Die Fusionsreaktion besteht aus dem dichten Membrankontakt, der Membranverschmelzung und dem Öffnen einer Fusionspore [48] und wird von verschiedenen Proteinen katalysiert. Die proximalen Blätter der Lipiddoppelschichtmembranen haben den ersten Kontakt und verschmelzen vor den distalen Blättern. So entsteht ein Übergangsstadium der Hemifusion. Zwei Modelle von proteingesteuerter Membranfusion werden diskutiert. Im ersten Modell dienen Proteine als Maschinen, welche die Membranen eng zueinander ziehen. Die darauf folgende Fusion erfolgt spontan, wenn die Membranen sich ausreichend angenähert haben. Eine reine Lipidpore bildet sich zwischen den Membranen, die zur kompletten Fusion führt (siehe Abbildung 2A). Das zweite Modell geht von einer proteinumgebenen Pore aus, analog zu Connexin umgebenen Gap-junctions, die die Membranen verbinden. Die Proteinpore kann sich öffnen und schließen, aber auch durch Lipideinlagerung expandieren und zur kompletten Fusion der Membranen führen (siehe Abbildung 2B). Beide Modelle gehen von dem Zwischenschritt der Hemifusion aus [46] und sind in Abbildung 2 dargestellt.

In den letzten zwei Jahrzehnten wurde eine große Anzahl von Proteinen entdeckt, die für diese Vorgänge der Exozytose wichtig sind. Eines der ersten war eine ATPase, die ungewöhnlich sensitiv für die Inaktivierung durch N-ethylmaleimide (NEM) ist, und NSF (NEM-sensitive factor) genannt wurde. Später wurden Adapterproteine von NSF gefunden und SNAPs (soluble NSF attachment proteins) genannt. Rothmann et al. [70] isolierten die SNAP Rezeptoren, die SNAREs. Es wurde gezeigt, dass Vesikelexozytose durch

Inaktivierung dieser Proteine mittels Neurotoxine blockiert wird, und somit die SNAREs essentiell für die Vesikelexozytose sein müssen [41].

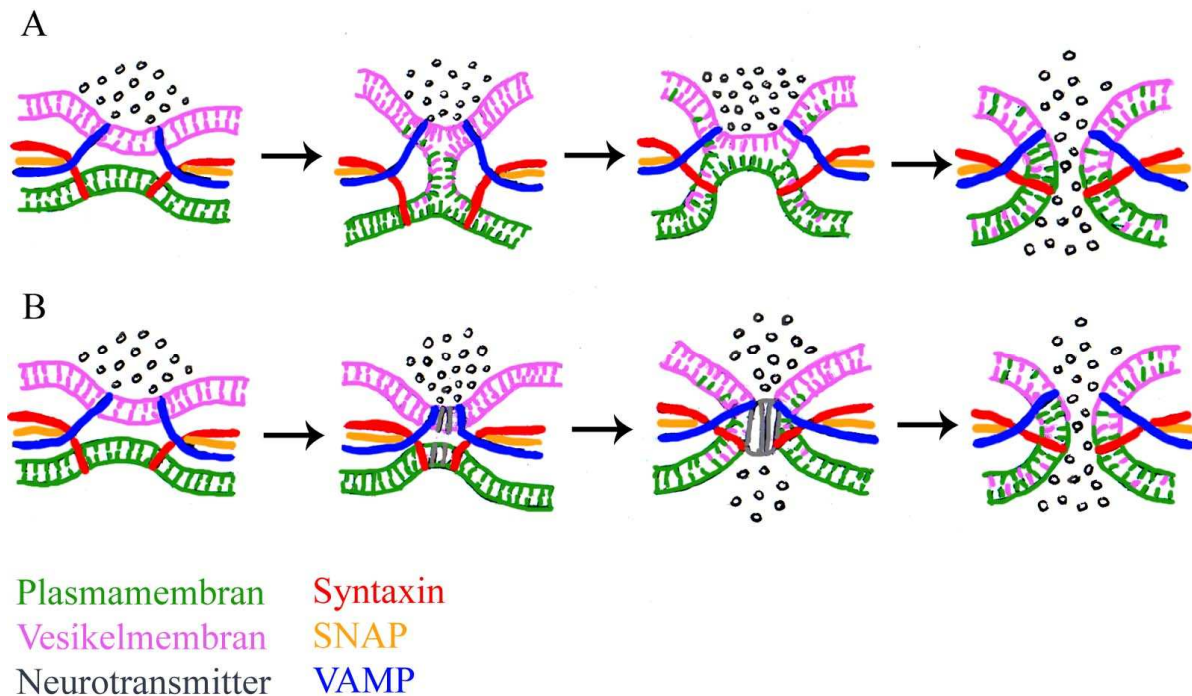


Abb. 2: 2 Modelle der Membranfusion nach [46]. (A) Das „proximity“ Modell geht von einer reinen Lipidpore aus, während (B) das Proteinporenmodell von einer Pore aus Transmembransegmenten von Proteinen ausgeht.

Diese Proteinfamilie von kleinen, membrangebundenen Proteinen bildet das Herz der exozytotischen Fusionsmaschinerie. Sie formen multimolekulare Komplexe, die für die vesikuläre Fusion nötig sind [6]. Eukaryotische Zellen produzieren verschiedene Sets von SNARE Proteinen, die die verschiedenen intrazellulären Membranfusionen steuern. Bei jeder Fusion ist mindestens ein SNARE in der Vesikulären- /Donormembran, und eines in der Ziel- /Akzeptormembran verankert [64]. Die best charakterisierten SNAREs katalysieren die Transmitterexozytose in Neuronen. Sie bestehen aus den (Ziel-) Plasmamembranproteinen Syntaxin und SNAP 25 (t-SNAREs) und dem Vesikelmembranprotein VAMP (v-SNARE). Syntaxin und VAMP sind durch ihre Carboxyenden in der Membran verankert, während SNAP 25 mit palmitoylmodifizierten Cysteinresten an die Membran geheftet ist. Die SNAREs variieren in Form und Größe,

tragen aber gemeinsam eine aus 60-70 Aminosäuren bestehende homologe Sequenz, das so genannte SNARE-Motiv [12]. Die SNARE-Motive der verschiedenen SNAREs interagieren miteinander, indem sie ein stabiles, parallel angeordnetes 4-Helix-Bündel formen, den SNARE-core-complex [77, 49]. In Neuronen besteht der Komplex aus zwei Helices von SNAP 25 und jeweils einer Helix von VAMP und Syntaxin [46]. Diese Komplexbildung ist in Abbildung 3 dargestellt. Die SNARE-Motive verdrillen sich dabei vom membranfernen Aminoende ausgehend bis zum membranständigen Carboxyende. Dieser Prozess wird auch „zippering“ genannt und zieht die beiden Membranen, in denen die SNAREs verankert sind, dicht zusammen [40]. Dies initiiert vermutlich die Hemifusion und die anschließende Fusion der Membranen. Es wird vermutet, dass das „zippering“ der 4 Helices den ganzen Weg weiter durch die Transmembrandomänen der SNAREs geht und Fusion dann auftritt, wenn die Transmembrandomänen von v-SNARE und t-SNARE in die gleiche Membran wandern [46]. Nach der Fusion müssen die stabilen Komplexe zur Wiederverwendung getrennt werden. Dafür wird viel chemische Energie benötigt. NSF hydrolysiert ATP und faltet zusammen mit α -SNAP als Kofaktor den Komplex auseinander [57].

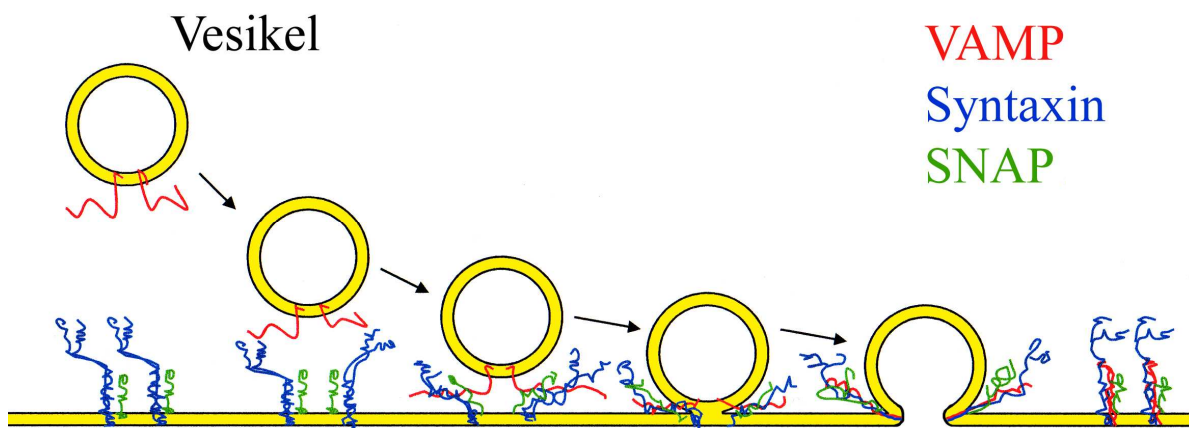


Abb. 3: Modell zur SNARE-Komplex vermittelten Fusion von intrazellulären Vesikeln mit der Plasmamembran. Bei der hier beispielhaft dargestellten Transmitterexozytose in Neuronen besteht der SNARE-Komplex aus den t-SNAREs Syntaxin und SNAP 25 und dem v-SNARE VAMP.

VAMP 2 wurde auch in den Speicheldrüsenzellen der Ratte an sekretorischen Granula nachgewiesen. Seine Spaltung durch BoNT/B inhibiert die Amylasesekretion [34].

SNAP 25 und Syntaxin 1 konnten dort nicht nachgewiesen werden. In Parotiszellen wurden allerdings Syntaxin 2, 3 und 4, SNAP 23 und viele weitere Proteine an der Plasmamembran gefunden [80,42,43]. Die genaue Rolle dieser Proteine bei der Granulaexozytose ist noch nicht bekannt. Sie könnten spezifische t-SNAREs an der apikalen Plasmamembran von Azinuszellen repräsentieren [43,33,34].

VAMP 1 wurde in den Azinuszellen ebenfalls nicht nachgewiesen. Es existiert aber, genau wie SNAP 25 und Syntaxin, in den Nervenendigungen, die die Azinuszellen innervieren und moduliert somit auch die exokrine Aktivität der Drüse [35].

Viele weitere regulatorische Proteine und Kofaktoren wurden gefunden, die bei der Exozytose mitwirken. Manche können für verschiedene Membranfusionsreaktionen gebraucht werden und einige sind spezifisch nur für eine bestimmte Reaktion geeignet [48]. GTP gebundene Proteine, aus der Rab-Familie zum Beispiel, vermitteln das initiale „docking“ der Vesikel an die Membran, indem sie spezifische Komplexe bilden, die die Membranen verbinden. Nach abgeschlossener Fusion spaltet das Protein GAP (GTPase aktivierendes Protein) GTP und das entstandene GDP gebundene Rab-Protein wird von der Membran entfernt. Während der Fusion spielen außer den SNARE Proteinen auch SM Proteine (Sec1/ Munc18 like proteins) eine Rolle, die an Syntaxin-like SNAREs binden und eine regulierende Bedeutung haben sollen [48]. Ein weiteres Protein, Synaptotagmin, soll als Ca^{2+} -Sensor fungieren, der die SNARE katalysierten Exozytoseschritte reguliert [3,17,53,85].

Obwohl viele Proteine identifiziert sind, die Schlüsselrollen in der Exozytose spielen, ist die tatsächliche Funktion der meisten Proteine zu einem großen Teil unbekannt.

1.2.3 Botulinumtoxine

1.2.3.1 Allgemeines

Botulinumneurotoxine (BoNT) sind hochmolekulare bakterielle Proteine, die immunologisch in die Subtypen A-G unterteilt werden. Alle 7 Toxine sind hochspezifische, zinkhaltige Endoproteasen, die selektiv jeweils ein Protein des Exozytoseapparates

neuronaler Zellen spalten. Die Wirkung der Toxine auf den Exozytoseapparat nichtneuronaler, exokriner Zellen ist noch nicht hinreichend geklärt. Die BoNTs sind die giftigsten bakteriellen, der Menschheit bekannten Toxine, wobei BoNT Typ A die stärkste pathogene Wirkung hat. Die LD 50 in Mäusen liegt bei $10 \cdot 10^{-12}$ g unter parenteraler Applikation [10]. Der Mensch ist sensibel gegenüber Typ A, B, E, und F aber resistent gegenüber Typ C und D [19, 87]. Die neurotoxischen BoNTs werden zusammen mit den Tetanustoxinen (TeNTx) als clostridiale Toxine (CTNs) bezeichnet.

1896 gelang es van Ermengem [29] den Erreger *Clostridium botulinum* zu isolieren. *Clostridium botulinum*, *baratii* und *butyricum* sind obligat anaerobe, sporenbildende Bakterien, die die verschiedenen BoNTs abscheiden. Sie geben die Toxine als einkettige Proteine an Hämagglutinin gebunden ab, welches sie vor den Poteasen des Gastrointestinaltraktes schützt. Die Toxine gelangen über kontaminierte Nahrung (Gemüse, Fleisch, Fisch) in den Gastrointestinaltrakt und werden trotz ihres hohen Molekulargewichts (ca. 150 kD) durch die Darmschleimhaut aufgenommen. Nach lymphogener und hämatogener Verbreitung erreichen die Toxine unter anderem die neuromuskulären Endplatten, binden an die präsynaptische Membran der peripheren α & γ -Motorneurone und werden in die synaptischen Terminalen aufgenommen. Dort führen sie durch Spaltung von SNARE Proteinen zur Blockade der exozytotischen Ausschüttung von Acetylcholin. Dadurch wird die postsynaptische Erregung der Muskelfasern verhindert und die Muskeln paralysiert (chemische Denervierung) [21]. Mit einer Latenz von 12-48h treten zunächst Übelkeit, Erbrechen, Schwindel, Akkomodationsstörungen, Ptose, Artikulations- und Schluckstörungen auf. In den folgenden Stunden breitet sich die Paralyse schmerzlos über die gesamte Skelettmuskulatur aus, unter Einbeziehung der Atemmuskulatur. Das Bewusstsein und das sensible Nervensystem bleiben dabei ungestört [79]. Die verschiedenen Toxinsubtypen lösen unterschiedliche Ausprägungen der Symptome aus. Zusätzlich zu dem typischen Lebensmittelbotulismus, der erstmals 1817 von J. Kerner als Wurstvergiftung (Botulismus) beschrieben wurde, sind noch der durch Clostridienkolonien im Intestinaltrakt von Kindern bis 24 Monate verursachte Säuglingsbotulismus und der Wundbotulismus bekannt [59].

1.2.3.2 Stoffwechselweg und Wirkmechanismus der Botulinumtoxine

Alle BoNTs bis auf Typ E werden als einkettige Proteine (single chain toxin, s-Toxin) von den Clostridien sezerniert und durch Lyse in die Umgebung abgegeben. Das s-Toxin enthält mehrere intramolekulare Disulfidbrücken und ist kaum toxisch [1]. Nach der Sekretion wird es durch verschiedene unspezifische Proteasen zwischen zwei Cysteinresten hydrolysiert. Das resultierende Molekül besteht aus 2 Ketten, die nur noch durch eine Disulfidbrücke und van-der-Waals-Kräfte zusammengehalten werden. Der entstehende carboxyterminale Teil (100kD) wird als schwere Kette (heavy chain, h-chain) und der aminoternale Teil (50kD) als leichte Kette (light chain, l-chain) bezeichnet. Dieses zweikettige Molekül stellt die biologisch aktive und stabile Form der BoNTs dar. Der Vorgang ist in Abbildung 4 dargestellt. Die schwere Kette ist für die Bindung, Aufnahme und intrazelluläre Verarbeitung der Toxine verantwortlich, während die leichte Kette als zinkabhängige Endoprotease die toxische Wirkung beinhaltet [58]. Das Toxin bindet pH- und temperaturabhängig an einen Toxinakzeptor aus Polygangliosiden an der Zellmembran [51]. Durch laterale Diffusion wird es daraufhin an Proteinrezeptoren gebunden, die eine höhere Affinität für die Toxine besitzen. Bei diesen Proteinrezeptoren handelt es sich bei BoNT/A wahrscheinlich um SV2 [22], einem Membranprotein auf synaptischen Vesikeln. Der Proteinrezeptor von BoNT/B ist wahrscheinlich Synaptotagmin (VAMP). Diese beiden Vesikelmembranproteine erscheinen an der Zelloberfläche wenn synaptische Vesikel im Rahmen der Exozytose mit der Zellmembran verschmelzen und können dann die Toxine binden. Durch Endozytose werden diese dann in die Zelle aufgenommen.

Es wurde nachgewiesen, dass für die Bindung der BoNTs der c-terminale Teil der schweren Kette (Hc-Fragment) verantwortlich ist [50]. Nach der Endozytose säuert sich das Endozytosevesikelmilieu an, was zur Translokation der leichten Kette durch die Vesikelmembran ins Zytoplasma führt. Die leichte Kette von BoNT/A spaltet im Zytoplasma SNAP 25, die von BoNT/B hydrolysiert Synaptobrevin (VAMP). Die jeweiligen Substrate der unterschiedlichen Toxine sind in Tabelle 1 dargestellt.

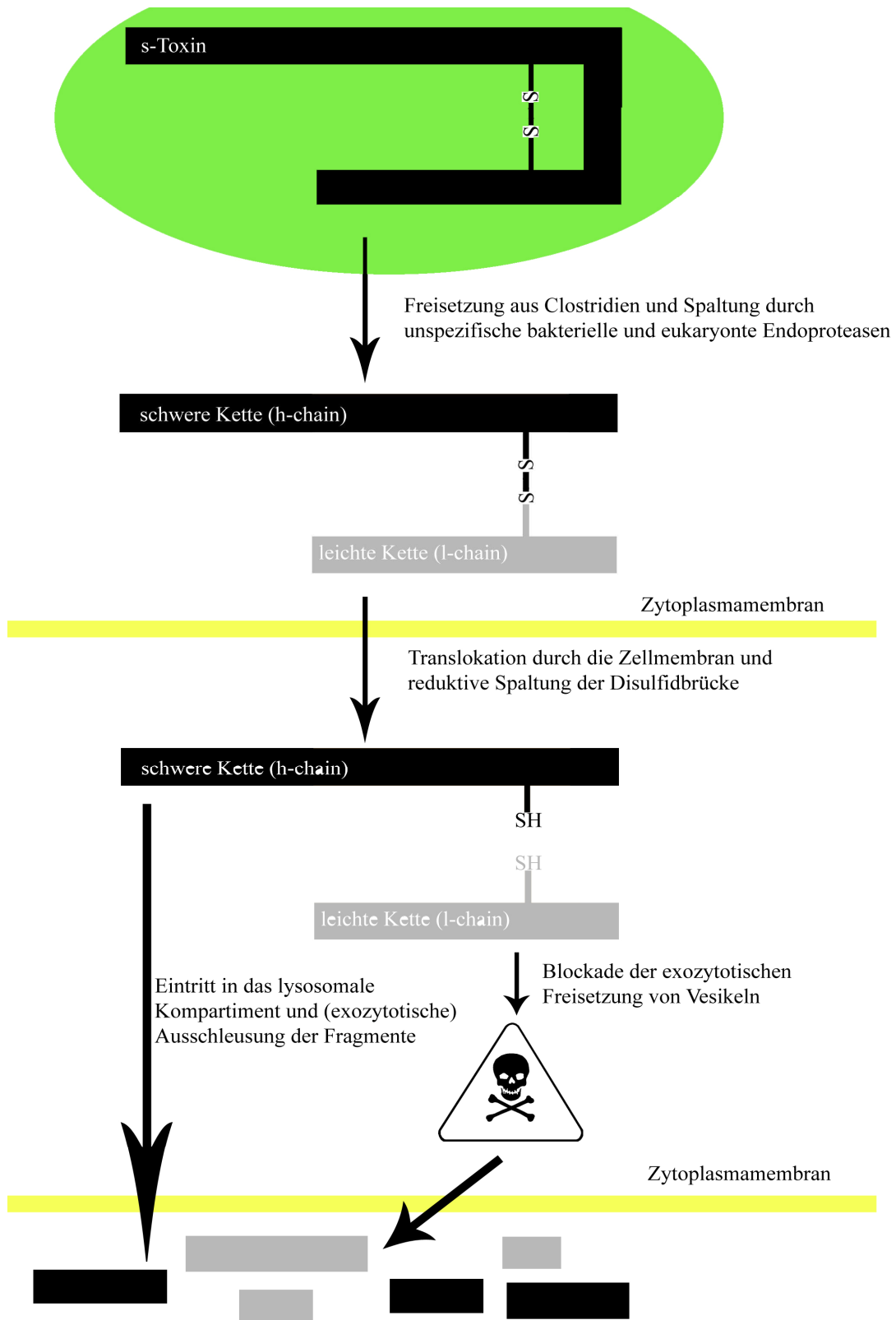


Abb. 4: Legende siehe folgende Seite

Legende zu Abb. 4: Stoffwechselweg der Botulinumtoxine nach [9]. Nach Sekretion des s-Toxins erfolgt die Hydrolyse in das Dichain-Toxin im Extrazellulärraum. Darauf folgt die Translokation durch die Zellmembran und die reduktive Spaltung der Disulfidbrücke. So kann die leichte Kette ihre Wirkung auf die Exozytoseproteine entfalten. Fragmente beider Ketten werden wahrscheinlich durch Exozytose aus den Zellen ausgeschleust.

| TOXIN | SUBSTRAT |
|--------|----------------------|
| BoNT/A | SNAP-25 |
| BoNT/B | Synaptobrevin (VAMP) |
| BoNT/C | Syntaxin |
| BoNT/D | Synaptobrevin (VAMP) |
| BoNT/E | SNAP-25 |
| BoNT/G | Synaptobrevin (VAMP) |

Tab. 1: Die einzelnen Komponenten des Exozytoseapparates als Substrate der leichten Ketten der CTNs [9].

Alle Substrate sind SNARE Proteine und bilden, wie in 1.2.2 beschrieben, stabile Komplexe, die zur exozytotischen Fusion von Vesikeln mit der Plasmamembran benötigt werden [47]. Die leichten Ketten aller CTNs blockieren die Exozytose von Vesikeln innerhalb von 60-120 min. Die isolierten schweren Ketten sind dagegen nicht toxisch [76].

Die leichten Ketten enthalten alle ein histidinreiches Motiv, welches zusammen mit einem weiter entfernten Glutamarest von funktioneller Bedeutung ist. Die Untersuchungen zur Sekundärstruktur der leichten Ketten ergaben, dass dieser Glutamarest über eine Schleife in die Nähe des histidinreichen Motivs zurückgeführt wird. So entstehen zusammen mit drei Histidinen die Eckpunkte eines Tetraeders, in dessen Zentrum ein Zinkion gebunden ist. Der histidinreiche Teil der leichten Kette bildet somit das aktive Zentrum dieser Endoproteasen [71].

1.2.3.3 Klinische Bedeutung der Botulinumtoxine

Seit 1979 wird BoNT zur Behandlung am Menschen angewandt [74]. Zunächst wurde es im Bereich der Schielerkrankungen und Motilitätsstörungen des Auges eingesetzt, seit 1985 auch zur Blepharospasmustherapie [75]. In den letzten Jahren kam eine Vielzahl von Indikationen im Bereich der Neurologie, Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Inneren Medizin, Chirurgie und in der plastisch-ästhetischen Medizin hinzu. Dazu gehören zum Beispiel der Torticollis spasticus, Hypersalivation, Fehlregulationen nach Fazialisparese, spasmodische Dystonie, Störungen des autonomen Nervensystems (z.B. gustatorisches Schwitzen), Dysphagie, Dysphonie, Spitzfuß, Schreibkrampf, Achalasie, Analfissuren und viele mehr. Besonders durch den Einsatz in der plastisch-ästhetischen Medizin, vor allem in der Antifaltentherapie, ist das BoNT berühmt geworden.

Der wichtigste Grund für das Nichtansprechen der Therapie ist die Bildung polyklonaler Antikörper gegen die Toxine [39]. So hat die Entwicklung von Behandlungsresistenzen gegen BoNT/A durch Induktion von Antikörpern den Anstoß gegeben, alternative clostridiale Neurotoxine für die Behandlung am Menschen zu testen. Außer den unterschiedlichen Zielerythrocytoseproteinen ist auch die enzymatische Wirkdauer der einzelnen Toxine variabel. Die längste enzymatische Aktivität haben Typ A mit mehr als 31 Tagen und C mit mehr als 25 Tagen, die kürzeste Typ E mit 0,8 Tagen [9]. Auch scheint die Resyntheserate der Zielproteine unterschiedlich zu sein. Synaptobrevin wird schneller nachsynthetisiert als SNAP 25 und Syntaxin [30].

2 Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1 Versuchstiere

Für die vorliegenden Untersuchungen an der Gl. submandibularis wurden 18 männliche, zwischen 250-300g schwere Wistar-Ratten untersucht (Züchter Harlan und Charles River Laboratories). Der Antrag auf Durchführung von Tierversuchen wurde vom Regierungspräsidium Gießen genehmigt (V54-19C20/15(1)MR-Nr.38/2005). Die Spezies Wistar-Ratte wurde gewählt, da aufgrund zahlreicher Untersuchungen zur Speicheldrüse der Wistar-Ratte detaillierte Erkenntnisse zur Morphologie ihrer Drüsen vorliegen [90,83,69]. Sie sind den Speicheldrüsen des Menschen sehr ähnlich. Des Weiteren wurde die Mehrheit der Untersuchungen zu Botulinumtoxinen an dieser Spezies durchgeführt.

Die Tiere wurden alle unter gleichen Bedingungen, bei 18-24°C und 50-70% Luftfeuchtigkeit in 30x20x15cm großen Einzelkäfigen gehalten und mit Leitungswasser und Zuchtfutter ad libitum ernährt. Das Zuchtfutter enthielt: 22,5% Rohprotein, 5,0% Rohfett, 4,5% Rohfaser, 6,5% Rohasche, 0,9% Calcium, 0,7% Phosphor, 1500 IE Vitamin A, 600 IE Vitamin D3, 75 mg Vitamin E und 5 mg Kupfer pro kg Futter. Der Tag/Nacht-Zyklus ergab sich während der Sommerzeit aus der Tageslichtstundenzahl, die im Winter durch zusätzliche elektrische Beleuchtung auf ca. 12 h ergänzt wurde. Sämtliche Eingriffe und Untersuchungen an den Tieren wurden zwischen 13 und 17 Uhr Nachmittag durchgeführt. Die Pflege, Betreuung und medizinische Versorgung der Tiere wurde durch den Tierpflegemeister und den Fachtierarzt der Tierschutzkunde der Philipps-Universität Marburg sichergestellt.

2.1.2 Medikamente

Für die vorliegenden Untersuchungen wurden Botulinum Neurotoxin Typ A (BoNT/A) in Injektionslösung (Allergan Pharmaceuticals, Westport, Irland) und Botulinum Neurotoxin Typ B (BoNT/B) in Injektionslösung (Solstice Neurosciences, San Francisco, USA) verwendet.

Zur Narkose der Tiere wurde eine intramuskuläre Mischinjektion von 100 mg/kg KG Ketamin (Ketavet®, Alvetra & Werfft AG, Neumünster) und 5 mg/kg KG Xylanzin (Rompun®, Bayer HealthCare, Leverkusen) verwendet. Getötet wurden die Ratten, zur Drüsenentnahme, durch die intrakardiale Injektion von 0,3 ml/kg KG T61® (Intervet International GmbH, Unterschleißheim).

2.1.3 Eingesetzte Antikörper

Die verwendeten Antikörper für die immunhistochemischen Färbungen und die Western Blot Analysen werden in den folgenden Tabellen 2 und 3 zusammengefasst.

| | Bezeichnung | Spezies | Verdünnung | Herkunft |
|----------------------------|--|----------------|-------------------|---|
| Erst-antikörper | Anti-Amylase (C-20)sc-12821 lotH2405 | Ziege | 1:100 | Santa Cruz Biotechnology, (CA, USA) |
| Zweit-Antikörper | Anti-Ziege Immunglobulin | Kaninchen | 1:100 | Santa Cruz Biotechnology, (CA, USA) |
| Kontroll-Antikörper | Normalserum IgG sc-2028 lotG1504 | Ziege | 1:50 | Santa Cruz Biotechnology, (CA, USA) |

Tab. 2: Für die immunhistochemische Untersuchung verwendete Antikörper.

Der in beiden Versuchen verwendete Erstantikörper Anti-Amylase (C20):sc-12821 des Herstellers Santa Cruz Biotechnology, CA, USA, ist ein säulen-aufgereinigter, polyklonaler Antikörper gegen eine Proteinsequenz des C-Terminus von Amylase des Menschen. Dieser Antikörper der Spezies Ziege wird vom Hersteller zur Detektion von Amylase der Maus, Ratte und des Menschen empfohlen [91,72].

| | Bezeichnung | Spezies | Verdünnung | Herkunft |
|---------------------------------|--|----------------|-------------------|---|
| Erst-antikörper | Anti-Amylase (C-20)sc-12821 lotH2405 | Ziege | 1:300 | Santa Cruz Biotechnology, (CA, USA) |
| Zweit-Antikörper | Anti-Ziege HRP (Horseradish Peroxidase) markierter Antikörper | Esel | 1:2000 | Santa Cruz Biotechnology, (CA, USA) |
| Kontroll-erstantikörper | Anti- β -Actin Klon AC-74 Produktnr. A5316 | Maus | 1:4000 | Sigma Aldrich, (Saint Louis, MO, USA) |
| Kontroll-zweitantikörper | Anti-Maus HRP (Horseradish Peroxidase) markierter Antikörper | Ziege | 1:2000 | Santa Cruz Biotechnology, (CA, USA) |

Tab. 3: Für die Western Blot Analyse verwendete Antikörper.

2.2 Tierversuche und Gewebeprobengewinnung

Alle Tiere wurden vor den geplanten Eingriffen gewogen und anschließend mit i.m. Mischinjektion, wie in 2.1.2 beschrieben, in tiefe Narkose versetzt. Nach kleinflächiger Rasur wurde mittels 15er Skalpells (Feather, Socorex, Schweiz) ein 3 cm langer, horizontaler, zervikaler Schnitt auf Höhe der Gl. submandibularis gesetzt und die Gll. submandibulares und Gll. parotis, wie in Abbildung 5 dargestellt, freigelegt.

Anschließend wurde unter Sicht mit 1 ml Insulinspritzen (Omnifix 40 Duo, Braun, Melsungen) auf der Kontrollseite (links) 0,1 ml physiologische Kochsalzlösung (Isotone Natriumchloridlösung 0,9%, Braun, Melsungen) und auf der rechten Seite 0,1 ml von der jeweiligen BoNT-Lösung direkt in die Drüse gespritzt. Daraufhin wurde der Hautschnitt durch Einzelknopfnähte mit monofilem, nicht resorbierbarem chirurgischen Nahtmaterial (3/0 Prolene®, gebogene PS-2 Nadel, Ethicon, Norderstedt) verschlossen. Die Tiere sind

nach 20-minütiger Narkose aufgewacht und haben sich alle schnell von der Operation erholt. Wundinfektionen oder andere Komplikationen traten nicht auf. Ein Tier verstarb jedoch während der i.m Injektion zur Ketaminhydrochloridnarkose an kardiovaskulärem Schock.

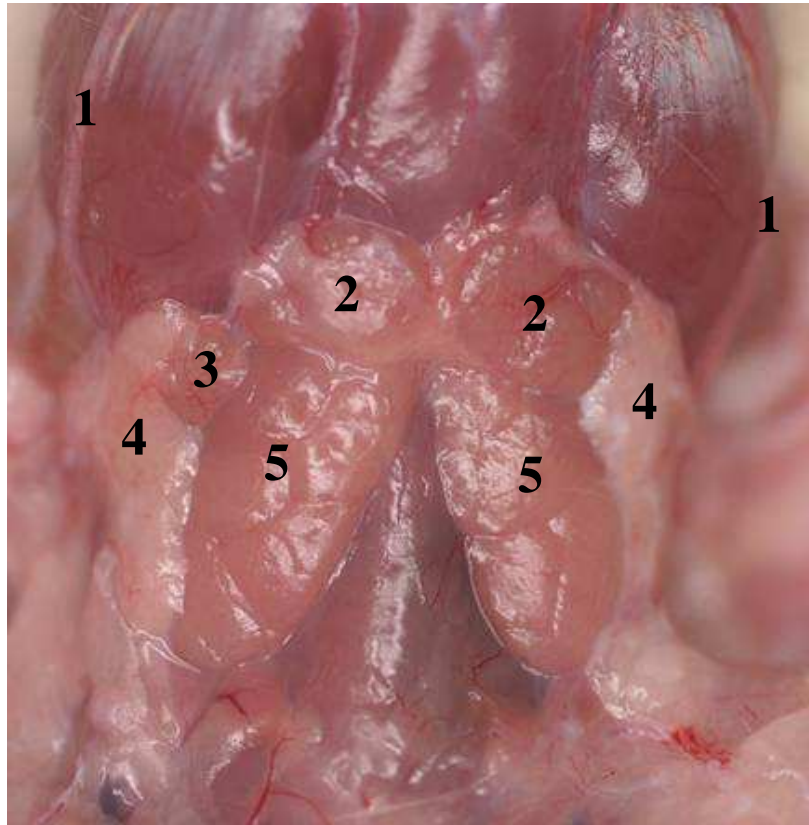


Abb. 5: Intraoperativer Situs bei Speicheldrüsenentnahme. 1: Ausführungsgänge der Gl. parotis, 2: Gl. sublingualis, 3: Lymphknoten, 4: Gl. parotis, 5: Gl. submandibularis

Es wurden je drei Tiere mit 5 U BoNT/A, 250 U BoNT/ B, beziehungsweise einem Gemisch aus 5 U BoNT/A und 250 U BoNT/B, jeweils als 0,1ml Injektion in die rechte Gl. submandibularis, behandelt. Die Dosierung der Toxine wurde aufgrund der Vorversuche für BoNT/A auf 5 U festgelegt, und für BoNT/B auf 250 U. An 8 von den 18 Tieren wurden Vorversuche zur Medikamentendosisbestimmung, Wirkdauer und Applikationstechnik durchgeführt. Dabei wurde die Wirkung von 5 U und 10 U BoNT/A, die Wirkung von 125 U und 250 U BoNT/B und die Wirkdauer von 2 und 3 Wochen auf den Amylasegehalt der Gl. submandibularis getestet. Die deutlichste Wirkung der Toxine

auf den Amylasegehalt der Drüsen zeigte sich mittels Western Blot bei BoNT/A mit 5 U und bei BoNT/B bei 250 U.

Genau 14 Tage nach der Injektion wurden die Tiere erneut in tiefe Narkose versetzt, um die Drüsen zu entnehmen. Der genannte Wirkzeitraum wurde aufgrund der relativ kurzen Wirkdauer von BoNT/B (ungefähr 10 Tage) und aufgrund der Vorversuche gewählt [9]. Die Drüsen wurden direkt nach der Entnahme gewogen (Laborwaage, Sartorius, Göttingen). Dabei diente jeweils die linke, mit Kochsalzlösung behandelte Drüse als Kontrolle. Die Werte der rechten Drüsen wurden von den Werten der linken Drüsen abgezogen, um später die Differenzen der verschiedenen Tiere miteinander zu vergleichen. Direkt nach Entnahme und Gewichtsmessung der Gll. submandibulares wurden diese mit einem Skalpell in zwei Hälften geteilt. Die eine Hälfte wurde sofort für immunhistologische Untersuchungen in Formaldehydlösung (37wt% stabilisiert mit 10-15% Methanol, Acros Organics, NJ, USA) fixiert, während die andere Hälfte bei -86°C eingefroren wurde, um später für die Western Blot Analyse lysiert zu werden. Von sechs Tieren wurden zusätzlich Proben für die lichtmikroskopische und elektronenmikroskopische Begutachtung der Zellmorphologie und Proben für morphometrische Messungen entnommen.

Anschließend wurden die Tiere, wie in 2.1.2 beschrieben, durch 0,3 ml/kg KG T61® (Intervet, Unterschleißheim) intrakardialer Injektion getötet. Die Tierkadaver wurden ordnungsgemäß entsorgt.

2.3 Histologische Untersuchungen

2.3.1 Gewebeaufbereitung

Für die lichtmikroskopische Begutachtung der Zellmorphologie und zur morphometrischen Messung der Zellflächen der Drüsen wurden Semidünnschnitte (0,5 µm), sowie 4-5µm dicke Gewebeschnitte angefertigt. Zudem wurden weitere Schnitte zur immunhistochemischen Färbung des Drüsengewebes (siehe Kapitel 2.4) hergestellt. Das Gewebe wurde dafür wie folgt aufbereitet.

Zur Herstellung der Semidünnschnitte wurden die Gewebeproben von sechs Ratten direkt nach der Entnahme der Drüsen in kleine Stücke geschnitten und in Fixierlösung (2,5% Glutaraldehyd (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg), 2,5% Paraformaldehyd, 0,05% Pikrinsäure (Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz) in Cacodilatpuffer 0,1M (pH 7,3 aus Cacodylsäure-Natrium, Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz)) gegeben [44]. Dann wurden sie in kleinere Stücke zerhackt und weitere 24 Stunden bei Raumtemperatur fixiert. Nach der Fixation wurden die Gewebestücke 3 mal 5 Minuten in 0,1 M Cacodilatpuffer gewaschen und anschließend eine Stunde mit reduzierter Osmiumtetroxid-Lösung (3% Kaliumferrocyanat und 2% wässrige OsO₄ zu gleichen Teilen, Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg) behandelt. Nach vorsichtigem, dreimaligem Waschen mit Cacodilatpuffer wurden die Gewebestücke in aufsteigender Ethanolreihe (50%, 70%, 90% und 96% je 5 min) dehydriert, dann 2 mal 10 Minuten mit Propylenoxid (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg) versetzt, 4 Stunden mit einem 1:1 Gemisch von Propylenoxid und Epon C (siehe Anhang) durchmischt und über Nacht mit Epon C infiltriert. Die Proben wurden anschließend in nummerierte Gelantinekapseln eingebettet, mit Epon C bedeckt und für 24 Stunden bei 60°C polymerisiert.

Mit dem Ultramikrotom (Ultracut Mikrotom, Leica Microsystems, Nußloch) wurden mit Glasmessern von den fertigen Eponharzblöcken 0,5 µm dicke Semidünnschnitte angefertigt, mit einem Tropfen aqua dest. auf einen Glas-Mattrand-Objekträger überführt und bei 60°C getrocknet und gestreckt. Diese Präparate wurden wie in Kapitel 2.3.2 beschrieben weiter bearbeitet. Zudem wurden von den fertigen Eponharzblöcken auch Schnitte für elektronenmikroskopische Untersuchungen angefertigt (siehe Kaptiel 2.6).

Zur Herstellung von Schnitten der Gll. submandibulares für morphometrische Messungen wurden direkt nach Entnahme des Drüsengewebes Gewebeproben von sechs Ratten für 48 Stunden in Bouin Hollande Lösung (Gebrauchsfertig mit Eisessig: 100 Teile Bouin Hollande Stammlösung plus 10 Teile Formaldehydlösung, 37%ig, säurefrei (Acros Organics, NJ, USA) plus 1 Teil Eisessig) fixiert. Die Fixation erfolgte unter Bewegung auf dem Rüttler. Anschließend wurde das Gewebe in 70%igem Isopropanol (Merck, Darmstadt) gewaschen, bis die gelbe Farbe ganz ausgewaschen war. Um eine gleichmäßige Einbettung aller Gewebeproben zu erreichen, wurden die Proben gleichzeitig in den Tissue

Tek Entwässerungsautomaten (Vogel, Gießen) gegeben und nach 16 Stunden in Paraffinblöcke (Paraplast Plus Tissue Embedding Medium, Merck, Darmstadt) eingebettet. Von diesen Paraffinblöcken wurden mit dem Mikrotom (Leica, Wetzlar) etwa 4-5µm dicke Schnitte angefertigt, auf Objektträger (Menzel, Braunschweig) überführt und mindestens eine Stunde bei 60°C getrocknet. Zum vollständigen Herauslösen des Paraffins verblieben die Präparate für 30 Minuten in RotiHistol (Roth, Karlsruhe). Daraufhin musste das Gewebe in der absteigenden Alkoholreihe ausreichend rehydriert werden. Diese Präparate wurden wie in Kapitel 2.3.3 beschrieben weiter bearbeitet.

Weitere Gewebeschnitte für immunhistochemische Untersuchungen wurden angefertigt. Dafür wurden, direkt nach der Entnahme des Drüsengewebes, Gewebeproben für 48 Stunden in Formaldehydlösung 37wt% (Acros Organics, NJ, USA) gegeben und anschließend bei 45°C je 2 Stunden in 70, 90 und 97%igen Alkohol und RotiHistol (Roth, Karlsruhe) entwässert. Über Nacht blieb das Gewebe dann bei 60°C in flüssigem Paraffin (Paraplast Plus Tissue Embedding Medium, Merck, Darmstadt), um danach in Paraffinblöcke eingebettet zu werden. Aus diesen Paraffinblöcken wurden mit dem Mikrotom (Leica, Wetzlar) etwa 3-5µm dicke Schnitte angefertigt, auf Objektträger (Menzel, Braunschweig) überführt und mindestens eine Stunde lang bei 60°C getrocknet. Diese Präparate wurden wie in Kapitel 2.4 beschrieben gefärbt und ausgewertet.

2.3.2 Toluidinblau-Pyronin-Färbung

Zur morphologischen Beurteilung des Gewebes unter dem Lichtmikroskop wurden die wie in Kapitel 2.3.1 beschrieben angefertigten Semidünnschnitte mit Toluidinblau-Pyronin in Boraxlösung gefärbt [45]. Dafür wurde eine 1%ige Toluidinblau-Stammlösung (Merck, Darmstadt) in 1% wässriger Boraxlösung und 1% wässriger Pyroninlösung (Sigma, Egham, UK) im Verhältnis 4:1 gemischt und für 60 Sekunden bei 80-100°C auf die Objektträger gegeben. Schließlich wurden die Präparate eingedeckt und am Lichtmikroskop (Olympus AX70TRF, Olympus, Hamburg) unter 40facher Vergrößerung ausgewertet (siehe 3.3 und Abbildung 10).

2.3.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die wie in Kapitel 2.3.1 beschrieben hergestellten 4-5µm dicke Gewebeschnitte der Gll. submandibulares wurden mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt, um sie unter 60facher Vergrößerung unter dem Hellfeldmikroskop (Olympus AX70TRF, Olympus, Hamburg) morphometrisch zu untersuchen. Dafür wurden die Schnitte 10 Minuten in Hämalun (Meyers Hämalun Lösung, Merck, Darmstadt) gefärbt, danach mit Leitungswasser gebläut und 3 Minuten in Eosinlösung (Eosin G 0,1% Certistain, Merck, Darmstadt), mit einem Tropfen Essigsäure (100%, Merck, Darmstadt), gegeben. Nachdem sie mit aqua dest. abgespült worden waren, wurden sie je 10 Minuten in 70, 90 und 100%igem Alkohol und 30 Minuten in RotiHistol (Roth, Karlsruhe) fixiert, um dann eingedeckt zu werden.

2.3.4 Morphometrische Messungen

Die Hämatoxylin-Eosin gefärbten Schnitte wurden unter einem Hellfeldmikroskop (Olympus AX70, Hamburg) auf Zell- und Azinusgröße des Speicheldrüsengewebes untersucht. Dafür wurden am angeschlossenen PC unter 60facher lichtmikroskopischer Vergrößerung mit dem MCID-Image-Analyse System (Imaging Research Incooperation, St. Cathrines, Ontario, Canada) die Azinusflächen von 25 Azini pro Präparat gemessen und die Mittelwerte gebildet, um einen möglichst genauen Wert für jede Drüse zu erhalten. Abbildung 6 zeigt beispielhaft die Markierung eines Azinus, dessen Fläche gemessen wurde. Dabei wurden nur Azini gemessen, deren Lumen angeschnitten und komplett von Azinuszellen rundherum umgeben war. Übergänge von zwei Azini ineinander wurden bei der Messung nicht berücksichtigt. Damit wurde sichergestellt, dass ausschließlich komplette, einzelne Azini, die in symmetrischer Richtung (quer durch den Azinus) angeschnitten wurden, in die Quantifizierung mit eingegangen sind. Um die durchschnittliche Zellfläche einer einzelnen Azinuszelle zu ermitteln, wurde die Gesamtfläche aller Azinuszellen um einen Azinus herum gemessen und durch die Anzahl aller Azinuszellen dividiert. Bei einer Azinusfläche von $x\mu\text{m}^2$ und einer Zellzahl von y wurde die mittlere Zellfläche mit $x/y\mu\text{m}^2$ berechnet. Zur Ermittlung der Zellzahl wurden die Zellkerne, die aufgrund der Schnittdicke in jeder Zelle angeschnitten waren, herangezogen.

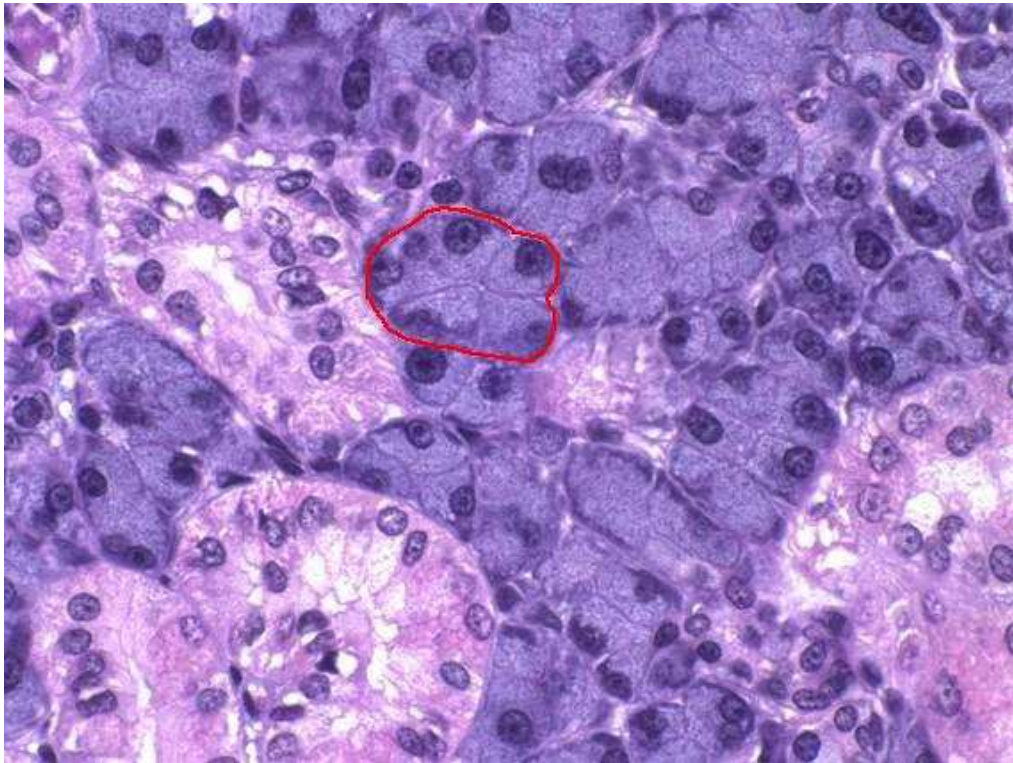


Abb. 6: Gewebeprobe der Gl. submandibularis einer Wistar-Ratte mit Markierung eines Azinus zur morphometrischen Messung, HE-Färbung bei 60facher Vergrößerung.

2.4 Immunhistochemische Untersuchungen

Die wie in Kapitel 2.3.1 beschrieben angefertigte Schnitte der Gll. submandibulares wurden analog den immunhistochemischen Untersuchungen der Arbeit von Tokoro et al. [80] gefärbt. Dafür wurden die Präparate für 30 Minuten in RotiHistol gegeben und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert. Zur Demaskierung der Antigene wurden die Schnitte in der Mikrowelle (Space cube 50, Philips, Eindhoven, Niederlande) 3 mal 5 Minuten in aufgeheiztem Citratpuffer (10mM tri-Na-citrat-Dihydrat-Puffer (Roth, Karlsruhe), 2,9410 g/L pH 6,0 mit HCl (2N, Merck, Darmstadt) eingestellt) vorbehandelt und im Anschluss mit TBS (53 g NaCl, 12 g Tris, ad 1000 ml aqua dest, pH 7,4 eingestellt und zum Gebrauch 1:10 verdünnt) gewaschen. Es folgte die Blockierung der endogenen Peroxidase in einer Methanol-Wasserstoffperoxid-Lösung (200 ml Methanol (Merck, Darmstadt) mit 6 ml 30%iger Wasserstoffperoxidlösung (Merck, Darmstadt) kurz vor Gebrauch vermengt) für 10 Minuten. Um die unspezifische Reaktion des Antikörpers mit Kollagen zu minimieren, wurde Normalserum (Rabbit Normal Serum,

DakoCytomation, Glostrup, Dänemark) der gleichen Spezies des Sekundärantikörpers auf das Gewebe gegeben. Nach 20 Minuten wurde das Normalserum entfernt und durch den Primärantikörper (siehe 2.1.3), 1:100 verdünnt, in DAKODiluent (Antibody Diluent with background reducing components, DakoCytomation, Glostrup, Dänemark) ersetzt und anschließend über Nacht in der feuchten Kammer bei 4°C inkubiert. Zur Kontrolle wurde auf ein Präparat statt dem ersten Antikörper Normal IgG der gleichen Spezies (siehe 2.1.3), 1:50 in DAKODiluent verdünnt, gegeben. Bevor der biotinylierte Sekundärantikörper (siehe 2.1.3) 1:100 verdünnt in DAKODiluent auf das Gewebe gegeben wurde, fand ein Waschgang in PBS (0,15M, 1L enthält: NaCl 8 g, KCl 0,2 g, NaHPO⁴⁻-2H₂O 1,16 g, KH²⁺PO⁴⁻ 0,2 g, auf pH 7,4 eingestellt) statt. Der Sekundärantikörper wurde für 30 Minuten auf den Präparaten in der feuchten Kammer belassen. Nach erneutem Waschen in PBS wurde der ABC-Komplex (Komplex aus Avidin und einem biotinmarkierten Enzym, StreptABCComplex/HRP, DakoCytomation, Glostrup, Dänemark) auf das Präparat getropft und ebenfalls für 30 Minuten in der feuchten Kammer inkubiert. Um die Farbreaktion in Gang zu setzen, wurde das Substrat DAB (Liquid DAB plus Substrate Chromogen System, DakoCytomation, Glostrup, Dänemark) für 5 Minuten auf den gewaschenen Objektträger gegeben. Mit Hämalaun (Mayers Hämalaun Lösung, Merck, Darmstadt) wurde das Präparat kurz gegengefärbt und dann in einer aufsteigenden Alkoholreihe fixiert.

Zur semiquantitativen Auswertung wurde die Färbeintensität in keine (-), schwache (+), mittlere (++) und starke (+++) Färbung eingeteilt und unter dem Lichtmikroskop (DM-RD Leica, Wetzlar) beurteilt (siehe 3.4 und Abbildung 11).

2.5 Western Blot Analyse

2.5.1 Proteinextraktion

Das Drüsengewebe wurde aus dem Ultra Tiefkühlschrank -86°C entnommen und mit dem Skalpell zerkleinert. In der Mörserschale wurde das zerkleinerte Gewebe mehrmals mit flüssigem Stickstoff (Haldenwanger, Berlin) übergossen und zu feinem Pulver gemörsert. Das Pulver wurde in Eppendorf tubes (Eppendorf, Hamburg) überführt und mit 300 µl frisch angesetztem Lysispuffer vermengt (1 ml Stammlösung bestehend aus: 137 mM NaCl (Merck, Darmstadt), 1% Nonidet P40, 20 mM Tris/HCl pH 7,5 (Roth, Karlsruhe), 2mM

EDTA (Ethylendiamintetraacetat, Roth, Karlsruhe), 10% Glycerol (Roth, Karlsruhe), 100 μ l Protease und 50 μ l Phosphatase). Nach 20 minütiger Inkubation im Kühlraum auf dem Drehständer wurde das Lysat weitere 20 Minuten bei 4°C zentrifugiert und der Überstand (Proteine) in 1 ml-Tubes überführt. Die Proteine in Lysispuffer wurden in Eppendorftubes (Eppendorf, Hamburg) bei -86°C gelagert, die Pellets verworfen.

2.5.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Das Prinzip der Proteinkonzentrationsbestimmung basiert auf einer photometrisch messbaren Absorptionsänderung von Coomassie Blau G 250, durch Bindung des sauren Farbstoffs an Proteine. Die Messungen wurden nach Protokoll der Firma BioRad Laboratories (München) durchgeführt. Nach Eichung des Photometers (Bio-Photometer, Eppendorf, Hamburg) mittels Leerwert und Standard wurden die jeweiligen Extinktionen bei 595 nm gemessen und die Proteinkonzentrationen der Proben ermittelt. Das Pipettierschema hierfür ist in Tabelle 4 dargestellt.

| | BioRad Protein Assay Reagenz 1:5 (BioRad, München) | BSA (Bovine Serum Albumin, Pierce, Rockford, USA) | Lysis- puffer | Proben- extraktion |
|----------------------|--|---|---------------------------|---------------------------|
| Leerwert | <i>1ml</i> | -- | <i>3μl</i> | -- |
| Standard 1:2 | <i>1ml</i> | <i>1μl</i> | -- | -- |
| Standard 1:4 | <i>1ml</i> | <i>2μl</i> | -- | -- |
| Standard 1:6 | <i>1ml</i> | <i>3μl</i> | -- | -- |
| Standard 1:8 | <i>1ml</i> | <i>4μl</i> | -- | -- |
| Standard 1:10 | <i>1ml</i> | <i>5μl</i> | -- | -- |
| Probe | <i>1ml</i> | -- | -- | <i>3μl</i> |

Tab. 4: Pipettierschema Proteinkonzentrationsbestimmung

2.5.3 Herstellung der Gele, SDS-PAGE

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese ist eine häufig genutzte Methode zur Trennung von Proteingemischen und zur Bestimmung von Molekulargewichten [54]. Natriumdodecylsulfat (SDS, Roth, Karlsruhe), ein anionisches Detergenz, das stark an Proteine bindet und sie denaturiert, führt zu einer ständig negativen Ladung der Proteine. Somit wandern die Protein-SDS-Komplexe während der Elektrophorese zur Anode. Durch die molekularsiebartige Eigenschaft des Gels werden die Proteine dabei ihrem Molekulargewicht nach separiert. Anhand eines mitgeführten Standards wird das Molekulargewicht der Proteine anschließend bestimmt. Zur Darstellung des Proteins Amylase wurden 12%ige Trenngele und 6%ige Sammelgele verwendet. Die Gele wurden nach dem in Tabelle 5 dargestellten Pipettierschema hergestellt. N,N,N,N'-Tetramethylethylenediamin (TEMED, Roth, Karlsruhe) und Ammoniumpersulfat 10%ig (Pharmacia Biotech, Piscataway, NY, USA) wurden zusammen als Katalysator der Gelpolymerisation verwendet.

| Detergenz/ Lösung | 12% Trenngel | 6% Sammelgel |
|----------------------------|--------------|--------------|
| Acrylamid-Bis (30:0,8) | 8,2 ml | 6,7 ml |
| H ₂ O | 6,4 ml | 7,9 ml |
| 1,5 M Tris Puffer (pH 8,8) | 5 ml | - |
| 1M Tris Puffer (pH 6,8) | - | 5 ml |
| 10% SDS | 0,2 ml | 0,2 ml |
| 10% Ammoniumpersulfat | 0,2 ml | 0,2 ml |
| TEMED | 20 µl | 20 µl |

Tab. 5: Pipettierschema zur Herstellung der Gele

Nach Fertigstellung der Gele, wurden die verschiedenen Proteinproben in Lysispuffer mit SDS-4x-Probenpuffer (aus SDS 20% (Roth, Karlsruhe) 2 ml, Glycerin (Riedel-De-Haen, Seelze) 4 ml, B-Merkaptoethanol 2 ml, Tris 2M pH 6,8 (Roth, Karlsruhe) 1,25 ml, Bromphenolblau 0,1% 0,4 ml) vermenget und 10 Minuten bei 95°C im Heizblock

denaturiert. Anschließend wurden sie zusammen mit dem Standard für Western Blot „Precision Plus Protein Standards All Blue“ Katalog Nr. 161-0373 der Firma BioRad Laboratories (München), in die Geltaschen des mit Elektrophoresepuffer (10x Elektrophoresepuffer auf 2 L a.d.: Tris Base (Roth, Karlsruhe) 60,4 g, Glycin (Riedel-De-Haen, Seelze) 376,0 g, SDS (Roth, Karlsruhe)) umgebenen Polyacrylamidgels pipettiert. In Tabelle 6 ist mithilfe von Zahlenbeispielen das Pipettierschema der Proteinproben in die Geltaschen dargestellt. Die photometrisch bestimmte Proteinkonzentration der Drüsenlysate wurde auf festgelegte 40 µg Protein pro Geltasche umgerechnet. Dann wurde das Pipettiervolumen pro Geltasche mit Lysispuffer (siehe 2.5.1) auf 12 µl pro Geltasche aufgefüllt und jeweils noch 4 µl SDS-4x-Puffer (siehe oben) hinzugefügt.

Die elektrische Auftrennung der Proteine erfolgte zunächst über 20 Minuten bei 70-80 V, dann über ca. 1,5 Stunden bei 100 V.

| Probe | Proteinkonzentration der Lysate | Umgerechnet auf 40 µg Protein | Lysispuffer auf 12 µl | 4 x Puffer |
|-------|------------------------------------|----------------------------------|--------------------------|------------|
| 1 | 9,34 µg/µl | 4,28 µl | 7,72 µl | 4 µl |
| 2 | 7,55 µg/µl | 5,30 µl | 6,70 µl | 4 µl |

Tab. 6: Pipettierschema Proteinlysate (Zahlenbeispiele)

2.5.4 Protein Blotting

Nach Auftrennung der Proteine, wurden diese vom Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulosemembran (Transfer Membran Protran, Schleicher & Schuell GmbH, Dassel) transferiert. Der Western Blot wurde in einem Mini Trans-Blot Cell Assembly von BioRad durchgeführt. Dafür wurden zwei Schaumstofflagen, zwei Zellulosepapiere und die Membran in 4°C kaltem Blotpuffer eingeweicht und anschließend ein "Gel-Sandwich", wie in Abbildung 7 dargestellt, hergestellt.

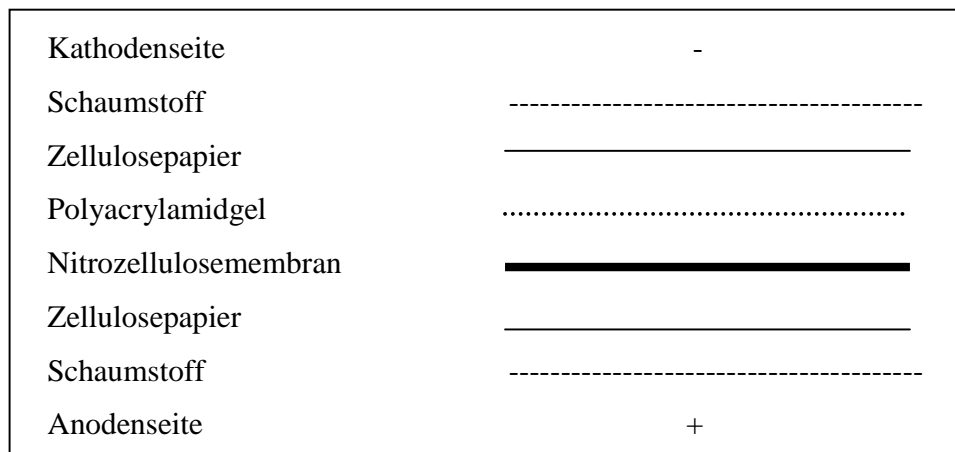


Abb. 7: Schematische Darstellung der Herstellung eines „Gel-Sandwiches“ bei der Western Blot Analyse.

Damit die beim Transfer entstehende Wärme nicht die Nitrozellulosemembran und das Gel zerstören konnte, wurde das System mit einem Eisakku und einem Rührstein gekühlt. Nach Zugabe des Blot-Puffers (pH 8,3; 4°C; auf 1L a.d.: Tris (Hydroxymethylaminomethane 99%, Acros Organics, NJ, USA) 30,3 g, Glycin 144,0 g, Tris Base 60,4 g) erfolgte der Transfer bei 100 V bzw. 350 mA über 60 Minuten.

2.5.5 Detektion mit amylasespezifischen Antikörpern

Nach dem Blotten wurde die Nitrozellulosemembran bei Raumtemperatur zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für 30 Minuten in 3%iger Milch (Magermilchpulver in PBS (pH 7,4; 47,74 g auf 5 L PBS-Dulbecco, Biochrom AG, Berlin)) geblockt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Erstantikörper (siehe 2.1.3) 1:300 mit 3%iger Milch verdünnt, bei 4°C über 24 Stunden auf dem Schüttler. Nach der Inkubation wurde überschüssiger Erstantikörper durch 3 mal 10 minütiges Waschen mit 3%iger Milch in PBS entfernt und der Zweitantikörper (siehe 2.1.3) 1:2000, mit 3%iger Milch verdünnt, für 60 Minuten in Raumtemperatur auf die Membran gegeben.

2.5.6 Darstellen der Proteine

Nachdem überschüssiger Zweitantikörper durch 3 mal 10 minütiges Waschen mit 3%iger Milch in PBS entfernt worden war, wurden 2 ml ECL 1:1 (Western Blotting Substrate,

Pierce, Rockford, USA) für 60 Sekunden auf die Membran gegeben. Dann wurde umgehend im Dunkelraum ein blaulichtsensitiver, autoradiographischer Film (Kodak Biomax MR Film, Kodak, Rochester, USA) zusammen mit der Membran in eine Filmkassette gelegt und 1 bis 45 Minuten (je nach Proteinmenge) belichtet. ECL ist eine lichtemittierende, nicht radioaktive Methode zur Detektion von fixierten, spezifischen Antigenen mittels einer Horseradish Peroxidase (HRP), die an den Zweitantikörper gekoppelt ist. Durch die Oxidation von Luminol (zyklisches Diacylhydrazid) in alkalischem Milieu wird durch Änderung des Energieniveaus Licht freigesetzt. Die Lichtemissionen werden durch kurzzeitige Exposition gegenüber einem blaulichtsensitiven, autoradiographischen Film detektiert. Nach abgelaufener Belichtungszeit wurde der Film entwickelt.

2.5.7 Ladekontrolle mit Anti- β -Actin Antikörper

Um sicherzustellen, dass in jede Geltasche die gleiche Menge an Proteinlysate geladen worden war, wurden die Membranen nach Entwicklung der Filme erneut über 3 mal 10 Minuten mit 3%iger Milch in PBS gewaschen und über Nacht mit dem Kontrollantikörper Anti- β -Actin 1:4000 in 3%iger Milch in PBS verdünnt inkubiert. Anschließend wurde der Kontrollantikörper nach erneutem Waschen 1:2000 in 3%iger Milch in PBS für 1 Stunde auf die Membranen gegeben. Die Darstellung der Proteine erfolgte wie in 2.5.6 beschrieben mit ECL. Anhand der Gleichmäßigkeit der Actinbanden wurde die korrekte Ladung der Proteinproben bei allen Western Blot Untersuchungen kontrolliert (siehe Abbildung 12 B).

2.6 Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen und Auswertungen wurden mit freundlicher Unterstützung von Frau G. Hoffbauer und Herrn Prof. Dr. Aumüller im Institut für Anatomie, Philipps-Universität Marburg, durchgeführt.

Von dem in Eponharz eingebetteten Drüsengewebe (siehe 2.3.1) wurden Ultradünnschnitte (70 nm) für die elektronenmikroskopische Beurteilung des Drüsengewebes angefertigt. Dafür wurden von geeigneten Stellen der Harzblöcke mit dem Diamantmesser am

Ultramikrotom (Ultracut Mikrotom, Leica Microsystems, Nußloch) Ultradünnschnitte (70 nm) hergestellt und auf Nickel-Netzchen mit einem Durchmesser von 3 mm gesammelt. Dann folgte die Kontrastierung mit Bleicitratlösung (0,125 g Bleicitrat in 40 ml aqua dest. geben, 5 Minuten geschüttelt, 5 ml 1M NaOH dazugegeben und weitere 50 ml aqua dest., geschüttelt bis alles völlig gelöst war, pH 12,0) und Uranylacetat [86]. Dafür wurde ein Uranylacetatlösung-Tropfen (2 g Uranylacetat in 100 ml warmen aqua bidest. gelöst (gesättigte Lösung), pH 5 eingestellt und vor Gebrauch zentrifugiert) auf Parafilm gesetzt und die Netzchen mit der Schnittseite für 10 Minuten auf die Tropfenoberfläche gelegt. Danach wurden sie durch mehrmaliges Eintauchen in aqua dest. gespült und daraufhin wieder von allen Wasserresten befreit. Anschließend wurde 1 Tropfen Bleicitrat auf die Netzchen pipettiert und für 3 Minuten inkubiert. Nach erneutem Spülen mit aqua dest. wurden die Netzchen staubfrei und trocken aufbewahrt. Diese Ultradünnschnitte wurden dann am Zeiss EM 10C Elektronenmikroskop (Zeiss, Jena) ausgewertet.

2.7 Statistische Methoden

Die Ergebnisse der Gewichtsmessungen der Drüsen (siehe 2.2) und die Ergebnisse der morphometrischen Messungen zur Zellflächengröße (siehe 2.3.4) wurden mit dem Programm SPSS 14.0 (Microsoft, Redmond, USA) statistisch ausgewertet. Dabei wurden unterschiedliche statistische Tests angewandt.

Bei den Gewichtsmessungen wurde zunächst mithilfe des Wilcoxon-Rangsummen-Tests die Signifikanz der Gewichtsunterschiede aller mit BoNT behandelten Drüsen, im Vergleich zu den mit Kochsalz behandelten Kontrollen, überprüft. Dabei wurde das Signifikanzniveau auf 5% festgelegt. Anschließend wurden, um die unterschiedliche Wirkung der verschiedenen Botulinumtoxine zu ermitteln, die Proben in drei Gruppen eingeteilt. In Gruppe 1 wurden alle mit BoNT/A behandelten Drüsen zusammengefasst, Gruppe 2 umfasst die mit BoNT/B behandelten Drüsen und Gruppe 3 die mit einem Gemisch aus BoNT/A und BoNT/B behandelten Drüsen. Anschließend wurde der Kruskal-Wallis-Test (H-Test) durchgeführt, wobei es sich um einen parameterfreien statistischen Test handelt, mit dem im Rahmen einer Varianzanalyse verglichen wird, ob sich verschiedene unabhängige Stichproben (Gruppen) hinsichtlich einer ordinalskalierten Variable unterscheiden. Mit diesem Test wurden die Differenzen der Drüsengewichte, also

das Gewicht der jeweilige Kontrolldrüse minus das Gewicht der mit dem jeweiligen Botulinumtoxin behandelten Drüse, miteinander verglichen. Das Signifikanzniveau wurde auch dabei auf 5% festgelegt. Zur genaueren Betrachtung erfolgte der Mann-Whitney-Test (U-Test) als Homogenitätstest, bei dem die einzelnen Gruppen getrennt miteinander verglichen wurden. Dabei wurde Gruppe 1 mit den Gruppen 2 & 3, Gruppe 2 mit den Gruppen 1 & 3 und Gruppe 3 mit den Gruppen 1 & 2 verglichen.

Von sechs Tieren wurden HE-Schnitte der Gll. submandibulares angefertigt, um unter 60facher Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop die Azinusflächengröße zu vermessen. Dafür wurden, um einen möglichst genauen Wert für jede Drüse zu erhalten, je 25 Messungen pro Drüse durchgeführt und dann die Mittelwerte gebildet. Die Zellflächen wurden aus den gemessenen Azinusflächen errechnet. Zur statistischen Auswertung wurde mithilfe des Wilcoxon-Rangsummen-Tests die Signifikanz der Zellflächenabnahme, der mit Medikament behandelten Drüsen im Vergleich zu den mit Kochsalz behandelten jeweiligen Kontrollen, überprüft. Das Signifikanzniveau wurde auf 5% festgelegt. Um auch die unterschiedliche Wirkung der verschiedenen Botulinumtoxine auf die Zellflächengröße zu ermitteln, wurde noch der Kruskal-Wallis-Test (H-Test) durchgeführt, wobei das Signifikanzniveau wieder auf 5% festgelegt wurde. Hierfür wurden die Proben wieder in die drei Gruppen (siehe oben) eingeteilt und die Zellflächendifferenzen, also die mittlere Zellfläche der mit Kochsalz behandelte Drüse minus der mittleren Zellfläche der mit dem jeweiligen Botulinumtoxin behandelte Drüse, miteinander verglichen.

3. Ergebnisse

3.1 Drüsengewichtsanalysen

Alle mit BoNT behandelten Drüsen waren bei Entnahme leichter als die jeweiligen Kontrolldrüsen. Im Mittel waren die behandelten Drüsen insgesamt 29,89 mg (9,16%) leichter. Nach den einzelnen Botulinumtoxinen sortiert, waren die mit BoNT/A (Gruppe 1) behandelten Drüsen im Mittel 17 mg (4,68%), die mit BoNT/B (Gruppe 2) behandelten 53,5 mg (17,05%) und die mit BoNT/A und BoNT/B kombiniert (Gruppe 3) behandelten Drüsen 38,5 mg (12,45%) leichter als ihre jeweiligen Kontrolldrüsen. Die einzelnen Werte sind in Tabelle 7 dargestellt.

| Ratte | Intraglanduläre Injektion rechte Drüse | Linke Drüse (mg) | Rechte Drüse (mg) | Differenz Drüsengewicht (%) |
|--------------|---|-------------------------|--------------------------|------------------------------------|
| 1 | BoNT/A | 348 | 316 | 32 (9,2) |
| 2 | BoNT/A | 371 | 347 | 24 (6,5) |
| 3 | BoNT/A | 358 | 352 | 6 (1,7) |
| 4 | BoNT/A | 375 | 359 | 16 (4,3) |
| 5 | BoNT/A | 421 | 414 | 7 (1,7) |
| 6 | BoNT/B | 329 | 282 | 47 (14,3) |
| 7 | BoNT/B | 303 | 243 | 60 (19,8) |
| 8 | BoNT/A+B | 331 | 300 | 31 (9,4) |
| 9 | BoNT/A+B | 297 | 251 | 46 (15,5) |

Tab. 7: Gewichte der Glandulae submandibularis und ihre Differenzen in Abhängigkeit von der jeweiligen BoNT-Injektion.

Die Ergebniswerte wurden mit unterschiedlichen statistischen Tests ausgewertet. Im Wilcoxon Test zeigte sich ein signifikant ($P=0,004$) niedrigeres Gewicht aller mit BoNT behandelten Drüsen als der mit Kochsalzlösung behandelten jeweiligen Kontrolldrüsen. Mit dem Kruskal-Wallis-Test konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen drei Gruppen festgestellt werden. Zur genaueren Betrachtung wurde der Mann-Whitney-Test angeschlossen, bei dem die einzelnen Gruppen getrennt miteinander verglichen werden. Hierbei konnte beim Vergleich der Gruppe 1 mit den Gruppen 2 & 3, ein

signifikanter ($P=0,032$) Unterschied zwischen der Wirkung von BoNT/A (Gruppe 1) und der alleinigen oder mit BoNT/A kombinierten Wirkung von BoNT/B (Gruppen 2 und 3) festgestellt werden. Dieser signifikante Unterschied in der gewichtsreduzierenden Wirkung der Botulinumtoxine wird in Abbildung 8 verdeutlicht.

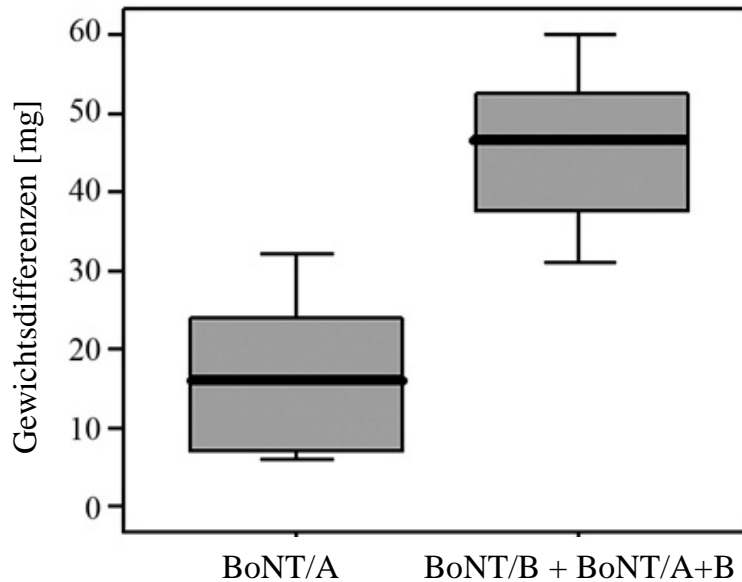


Abb. 8: Das Box-Plots Diagramm zeigt die Differenzen der Drüsengewichte im Vergleich. In der linken Spalte sind alle nur mit BoNT/A behandelten, in der rechten Spalte alle mit BoNT/B und BoNT/A+B behandelten Tiere dargestellt.

3.2 Morphometrische Messungen

Die mit BoNT/A behandelten Drüsen zeigten im Mittel $234,75 \mu\text{m}^2$, die mit BoNT/B behandelten $339,10 \mu\text{m}^2$ und die mit BoNT/A und BoNT/B in Kombination behandelten $184,25 \mu\text{m}^2$ kleinere mittlere Zellflächen als die jeweiligen Kontrolldrüsen. Die mit Botulinumtoxin behandelten Drüsen weisen also alle eine kleinere mittlere Zellfläche auf, als die mit Kochsalz behandelten Drüsen. Dies wird in Tabelle 8 und Abbildung 9 veranschaulicht.

| <i>Ratte/Drüse</i> | <i>Injektion</i> | <i>Mittelwert Azinusfläche (μm^2)</i> | <i>Mittlere Zellzahl</i> | <i>Mittlere Zellfläche (μm^2)</i> |
|--------------------|------------------|---|------------------------------|---|
| 1 links | NaCl | 7995±2066,9 | 4,6±0,8 | 1731,5±327,4 |
| 1 rechts | BoNT/A | 7134±2071,3 | 5,0±1,1 | 1419,9±233,4 |
| 2 links | NaCl | 6947±1779,1 | 5,2±1,2 | 1331,8±144,2 |
| 2 rechts | BoNT/A | 6828±1602,5 | 5,8±1,2 | 1173,9±102,1 |
| 3 links | NaCl | 8057±1496,8 | 4,6±0,8 | 1751,4±222,4 |
| 3 rechts | BoNT/B | 6767±1152,2 | 4,9±0,7 | 1376,9±136,7 |
| 4 links | NaCl | 7446±1743,5 | 4,9±1,1 | 1511,7±143,3 |
| 4 rechts | BoNT/B | 5506±1331,9 | 4,6±0,9 | 1208,0±147,4 |
| 5 links | NaCl | 6803±2015,5 | 4,6±1,0 | 1478,5±211,3 |
| 5 rechts | BoNT/A+B | 6923±1867,4 | 5,7±1,3 | 1204,0±112,1 |
| 6 links | NaCl | 7318±1618,6 | 5,8±1,3 | 1267,1±133,7 |
| 6 rechts | BoNT/A+B | 5761±1230,2 | 5,0±1,2 | 1173,1±92,4 |

Tab. 8: Mittelwerte der Azinusflächen, der Zellzahlen pro Azinus und der daraus berechneten Zellflächen. Die Mittelwerte der Azinusflächen wurden aus 25 Messungen pro Drüse gebildet (n=12).

Das Ergebnis der statistischen Auswertung sagt aus, dass ein signifikanter ($P=0,031$) Unterschied in der Zellfläche zwischen den mit Botulinumtoxin behandelten Drüsen und den jeweiligen Kontrolldrüse besteht. Im Vergleich der drei Gruppen (BoNT/A, BoNT/B, BoNT/A+B) konnte aufgrund der zu geringen Fallzahl pro Gruppe (n=2) keine statistische Aussage getroffen werden.

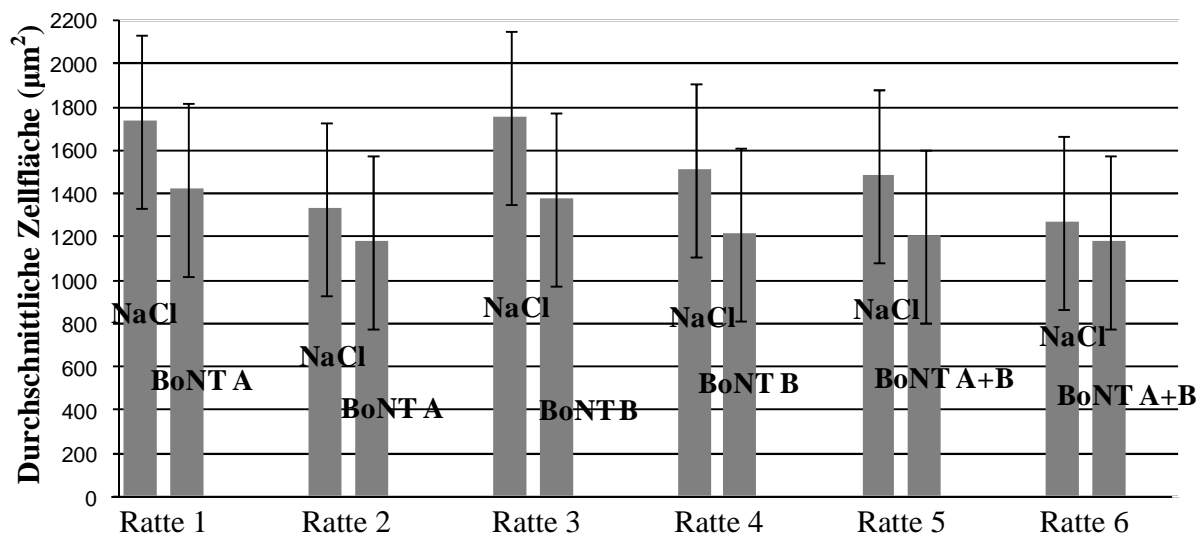


Abb. 9: Darstellung der mittleren Zellflächen der GII. submandibulares von sechs Tieren in einem Box-Plots Diagramm. Jeweils zwei Tiere wurden mit BoNT/A, BoNT/B und BoNT/A+B behandelt.

3.3 Histologische Untersuchungen

Bei der Auswertung der mit Toluidinblau-Pyronin gefärbten Semidünnschnitte zeigten sich die GII. submandibulares der Kontrolltiere (Abbildung 10 a) regulär mit vielen runden Azini, deren Zellen reichlich klare sekretorische Granula enthielten. Zwischen den Azini befanden sich dünne Bindegewebsbereiche mit Nerven und Gefäßen sowie vereinzelte Schaltstücke mit engem Lumen und wenigen dunkel gefärbten sekretorischen Zellen. Auch prominente Streifenstücke und sekretorische Tubuli („granular convoluted tubules“) mit dicht gepackten Granula waren deutlich zu erkennen.

In den mit BoNT (Abbildung 10 b-d) behandelten Drüsen fand ein ausgeprägter Umbau mit in Form und Größe veränderten Azini statt. Sie waren in den basalen Zellteilen dichter mit sekretorischen Vesikeln bepackt. Die Lumina der Streifenstücke waren größer als bei den Kontrolldrüsen. Signifikante Unterschiede zu den unbehandelten Drüsen konnten in den mit beiden Botulinumtoxinen in Kombination behandelten Drüsen (Abbildung 10 d) festgestellt werden.

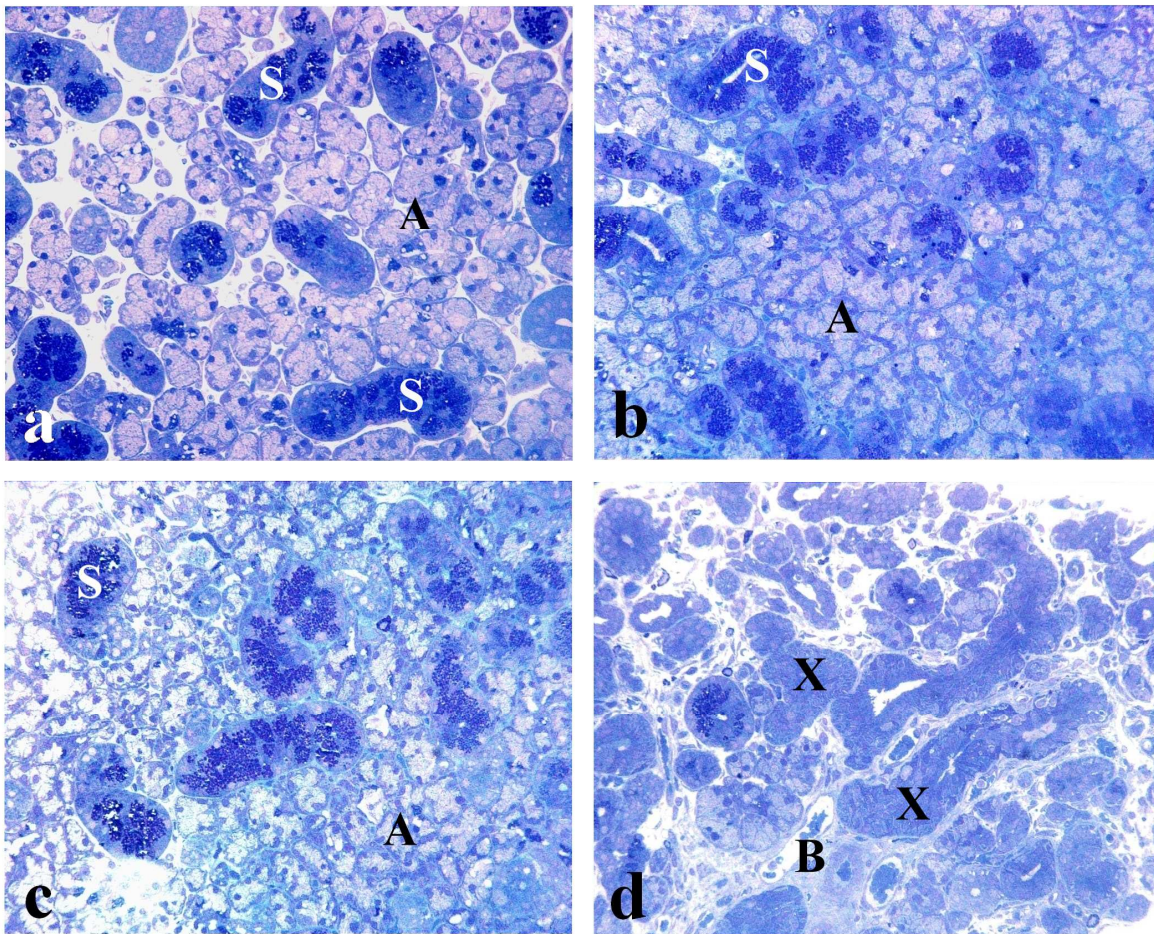


Abb. 10: Übersichten der Gl. submandibularis, Semidünnschnitte in Toluidin-Pyronin-Färbung bei 40facher Vergrößerung mit dem Hellfeldmikroskop. a: mit Kochsalzlösung behandelte Kontrolldrüse, b: mit BoNT/A behandelte Drüse, c: mit BoNT/B behandelte Drüse, d: mit Kombination von BoNT/A und B behandelte Drüse.

A= Azini, S= sekretorische Tubuli („granular convoluted tubules“), X= gangähnliche Strukturen in deutlich verändertem Drüsengewebe, B= lockeres, zellreiches Bindegewebe.

Dort waren nur noch wenige aktive sekretorische Azini zu finden, umschlossen von lockerem, zellreichem Bindegewebe. Zudem waren viele längere, gangähnliche Strukturen mit deutlichem Lumen erkennbar. Sie waren von Epithelzellen umgeben, die sowohl in ihrer Dichte als auch in der Zellhöhe stark variierten. Einige von ihnen enthielten dunkle sekretorische Granula, ähnlich denen in sekretorischen Tubuli und Streifenstückzellen. Die meisten Zellen in den Präparaten waren jedoch nahezu frei von sekretorischen Granula. In

einigen Regionen befanden sich „leere“ Zellen, die geschwollenen Myoepithelzellen ähnelten. Generell zeigten die Drüsen eindeutige Zeichen der Atrophie.

3.4 Immunhistochemische Untersuchungen

Mit der immunhistochemischen Färbung lässt sich die Lokalisation des Proteins Amylase sehr gut sichtbar machen. Amylase färbt sich in der immunhistochemischen Färbung braun an.

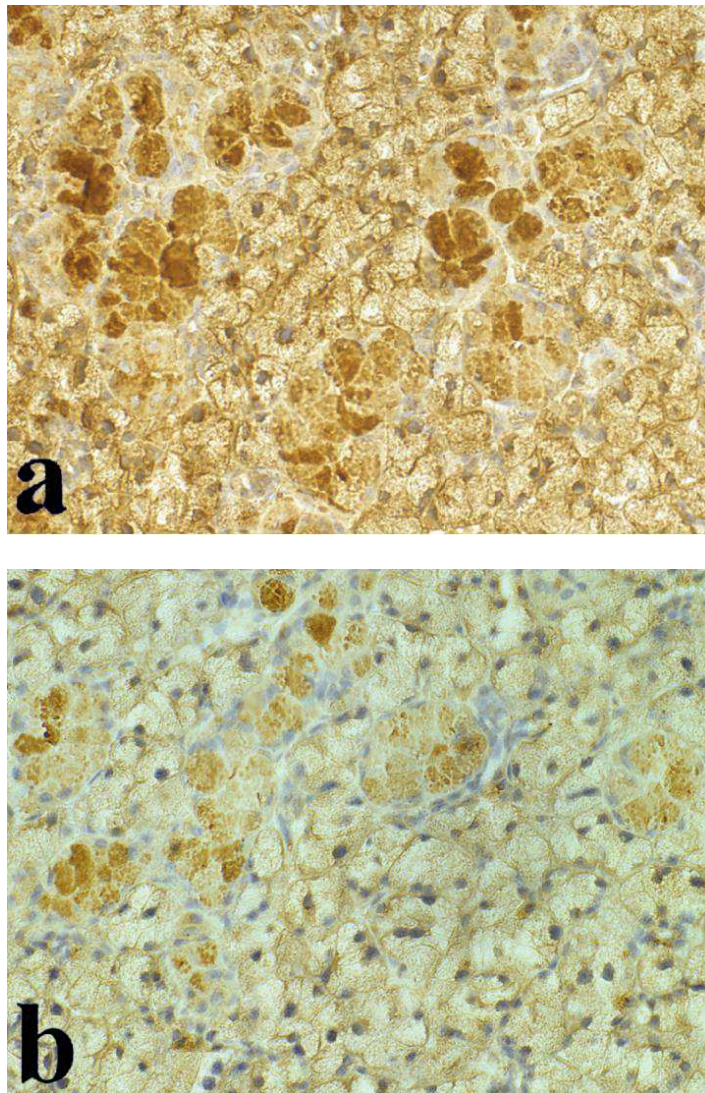


Abb. 11: Glandula submandibularis, Amylasefärbung bei 40facher Vergrößerung im Hellfeldmikroskop. a: Amylaseexpression in der Kontrolldrüse, b: Amylaseexpression in einer mit BoNT/B behandelten Drüse.

Wie in Abbildung 11 exemplarisch dargestellt ist, zeigten die mit Kochsalzlösung behandelten Drüsenpräparate eine starke Amylase-positive Färbung. Die mit BoNT behandelten Drüsenpräparate zeigten dagegen nur schwache, bis gar keine Färbung. Dies lässt einen deutlich geringeren Amylasegehalt vermuten. Besonders die Azini und auch einige Gangzellen der sekretorischen Tubuli („granular convoluted tubules“) zeigten in den mit Kochsalzlösung behandelten Drüsenpräparaten eine stärkere Färbung.

Ein Unterschied zwischen der Wirkung der verschiedenen Botulinumtoxinen konnte bei dieser subjektiven Betrachtungsweise nicht festgestellt werden. Da keine quantitative Analyse der immunhistochemischen Färbung angestrebt wurde, kann keine Aussage über die mögliche unterschiedliche Wirkung der BoNTs getroffen werden.

3.5 Western Blot Analyse

Die Banden der Immunoblots mit Anti-Amylase-Antikörper zeigten bei den verschiedenen Tieren sehr unterschiedlichen Proteingehalt. Die mit BoNT behandelten Drüsenseiten wiesen jedoch, wie in Abbildung 12 exemplarisch dargestellt, bei jedem Tier eine deutlich schwächere Amylasebande auf im Vergleich zu der mit Kochsalz behandelten Kontrollseite. Das Protein Amylase hat ein Molekulargewicht von 55 kD. Daher sind die Amylasebanden kurz über der 50 kD Marke des mitgeführten Standards zu finden.

Unterschiede zwischen der Wirkung von BoNT/A, BoNT/B und der Kombination von BoNT/A und BoNT/B konnten bei dieser Untersuchung nicht ausreichend beurteilt werden, da aufgrund der individuell unterschiedlichen physiologischen Amylaseproduktion schon die Amylasebanden der Kontrolldrüsen (linke Seite) bei jeder Ratte auf deutliche Unterschiede in der Proteinkonzentration hinwiesen. So ließ sich der Unterschied zu den behandelten Drüsen (rechte Seite) mit nur sehr schwach oder gar nicht nachweisbaren Amylasebanden schwer quantifizieren und vergleichen (siehe Abbildung 12 A). Die gleichmäßig ausgeprägten Actinbanden in Abbildung 12 B zeigen, dass bei den Western Blot Analysen in jede Geltasche die gleiche Proteinmenge der Drüsenlysate geladen wurde.

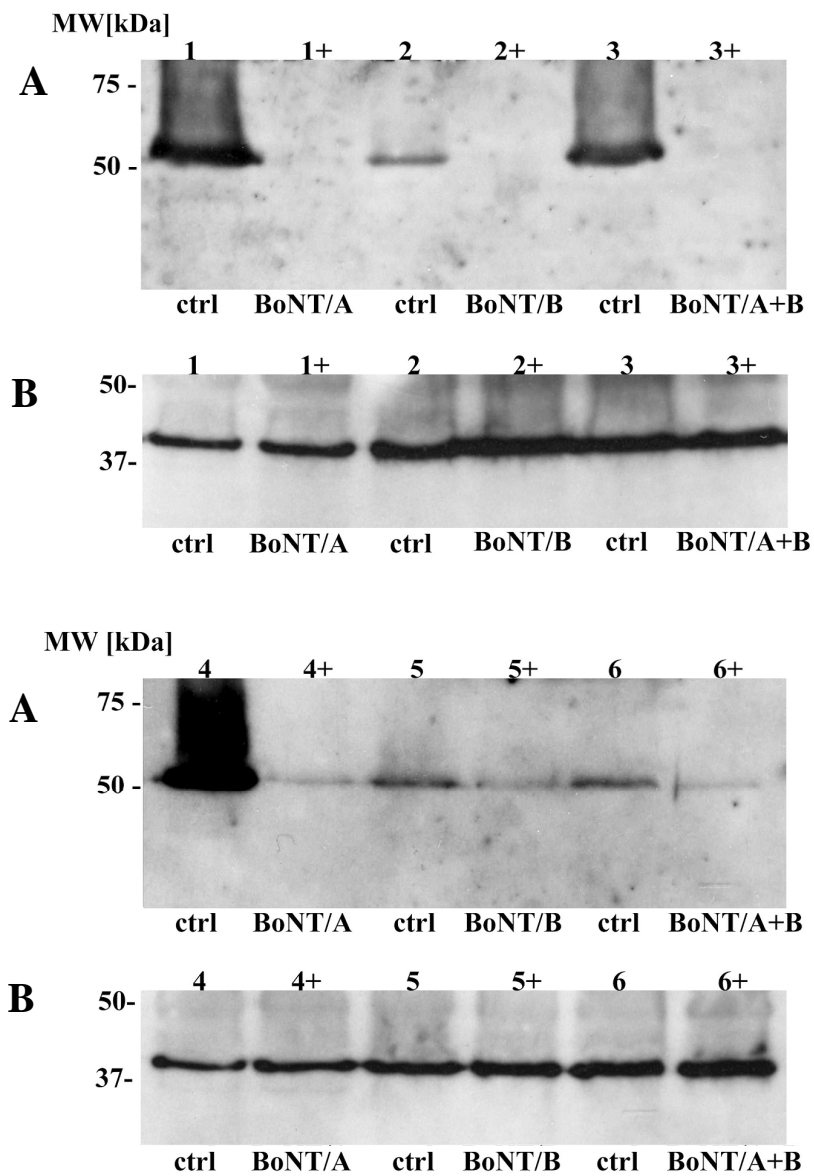


Abb. 12: **A)** Immunoblots der Lysate der Gll. submandibulares von sechs Wistar-Ratten. Die linken Drüsen wurden jeweils als Kontrolldrüse (ctrl) mit isotonischer Kochsalzlösung behandelt. Die rechten Drüsen (mit + gekennzeichnet) der Tiere 1 und 4 wurden jeweils mit 5 U BoNT/A, die rechten Drüsen der Tiere 2 und 5 mit 250 U BoNT/B und die rechten Drüsen der Tiere 3 und 6 mit einem Gemisch aus 5 U BoNT/A und 250 U BoNT/B behandelt. **B)** Ladekontrollen mit Anti- β -Actin.

3.6 Elektronenmikroskopische Untersuchungen

In den elektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigten sich die sekretorischen Azinuszellen der intakten Kontrolldrüsen (Abb. 13 a) gefüllt mit sekretorischen Vesikeln, welche eine getüpfelte Struktur aufwiesen. Die Granula waren homogen in Größe und Form und nicht miteinander verschmolzen. In den basalen Regionen der Zellen befanden sich die Nuklei, umrundet von reichlich rauem endoplasmatischem Retikulum und einigen Plasmaorganellen. Die Schaltstücke enthielten nur wenige granulierte Zellen (Abb. 13 b), während die Streifenstücke reich an granulierten Zellen waren. In den Zellen fanden sich basal gelegene Mitochondrien und kleine Mengen Glykogen (Abb. 13 c). Zwischen den Azini und den Gangstücken waren interstitielles Gewebe mit Kapillaren und Nervenendigungen nicht-myelinisierter Axone sichtbar (Abb. 13 d). Die Nervenendigungen enthielten überwiegend kleine, klare Vakuolen, sehr kleine dunkle Granula und vereinzelte große, ovale, dunkle Granula.

Sekretorische Zellen der mit BoNT/A behandelten Drüsen enthielten deutlich weniger sekretorisches Material. Das raue endoplasmatische Retikulum war stark vergrößert und vermischt mit vielen Mitochondrien. Auch die Struktur der sekretorischen Vesikel sah in Größe und Elektronendichte verändert aus. In einigen Zellen waren mehrere Vesikel miteinander verschmolzen und bildeten große, polymorphe Einheiten. Das interstitielle Gewebe hatte an Menge und Dichte zugenommen. In den Schaltstücke waren viele sekretorische Zellen zu finden, die den Zellen der Streifenstücke sehr ähnelten (Abb. 14 a). Das Lumen der Gänge war weit und unregelmäßig geformt. In den Streifenstücken hatte die Menge von basalem Zytoplasma und dicht gelagerten Glykogenflocken, Mitochondrien und einigen Lipofuscingranula deutlich zugenommen. Die Granula waren dicht gepackt, erschienen jedoch weniger elektronendicht als die der Kontrolldrüsen (Abb. 14 b). Auch die Axone im Interstitium stellten sich verändert dar: die Anzahl an kleinen, klaren Granula war reduziert. Stattdessen waren verschieden große, dunkle Granula sichtbar (Abb. 14 c).

Die mit BoNT/B behandelten Drüsenzellen wiesen in der elektronenmikroskopischen Untersuchung keine wesentlichen Unterschiede zu denen mit BoNT/A behandelten Drüsen auf. Die Azini waren klein (Abb. 14 d) und in den Zellen fand sich vermehrtes raues endoplasmatisches Retikulum und weniger Granula verschiedener Größe und Form. Das

Interstitium stellte sich dicht vermehrt dar. An den Zellen der Streifenstücke und Schaltstücke waren viele Desmosomen und Einstülpungen der Plasmamembranen angrenzender Zellen zu finden. Dies kann auf eine Schrumpfung der Zellen hinweisen.

Wie auch in den lichtmikroskopischen Untersuchungen beobachtet wurde, fanden sich die stärksten zellulären Veränderungen in den Drüsenzellen der mit BoNT/A und BoNT/B in Kombination behandelten Tiere. Hier waren deutlich weniger Azini zu finden und die Azinus- und Zellflächengröße war generell vermindert. Obwohl einige der Zellen reichlich mit großen Granula gefüllt waren, die elektronendichtes, inhomogenes Sekret enthielten, schienen die Zellen geschrumpft zu sein (Abb. 15 a). Der Nukleus hatte oft eine ungleichmäßige Form mit mehreren Einbuchtungen und fein verstreutem Chromatin. Statt den typischen dünnen Schaltstücken zeigten sich verlängerte, kurvige und dicke Gänge, die morphologisch eine Mischung aus Azinus, Schalt- und Streifenstück mit weitem, polymorphem Lumen darstellten (Abb. 15 b). Die Zellen enthielten eine Kombination aus großen, runden bis zu kleinen, polymorphen oder konfluidierenden Vesikeln. Apikal befanden sich mehrere klare, kleine, membrannahe Vesikel. In den Streifenstücken fanden sich wenige dunkle Granula, die in Größe und Elektronendichte variierten (Abb. 15 c). Basal konnten dicht gepackte Mitochondrien und viel Glykogen beobachtet werden. In anderen Gängen fanden sich sehr große Granula, durchsetzt mit einer Fülle von kleinen Vakuolen (Abb. 15 d, 15 e). Kleine Nervenzellaxone enthielten nur wenige klare Vesikel (Abb. 15 f).

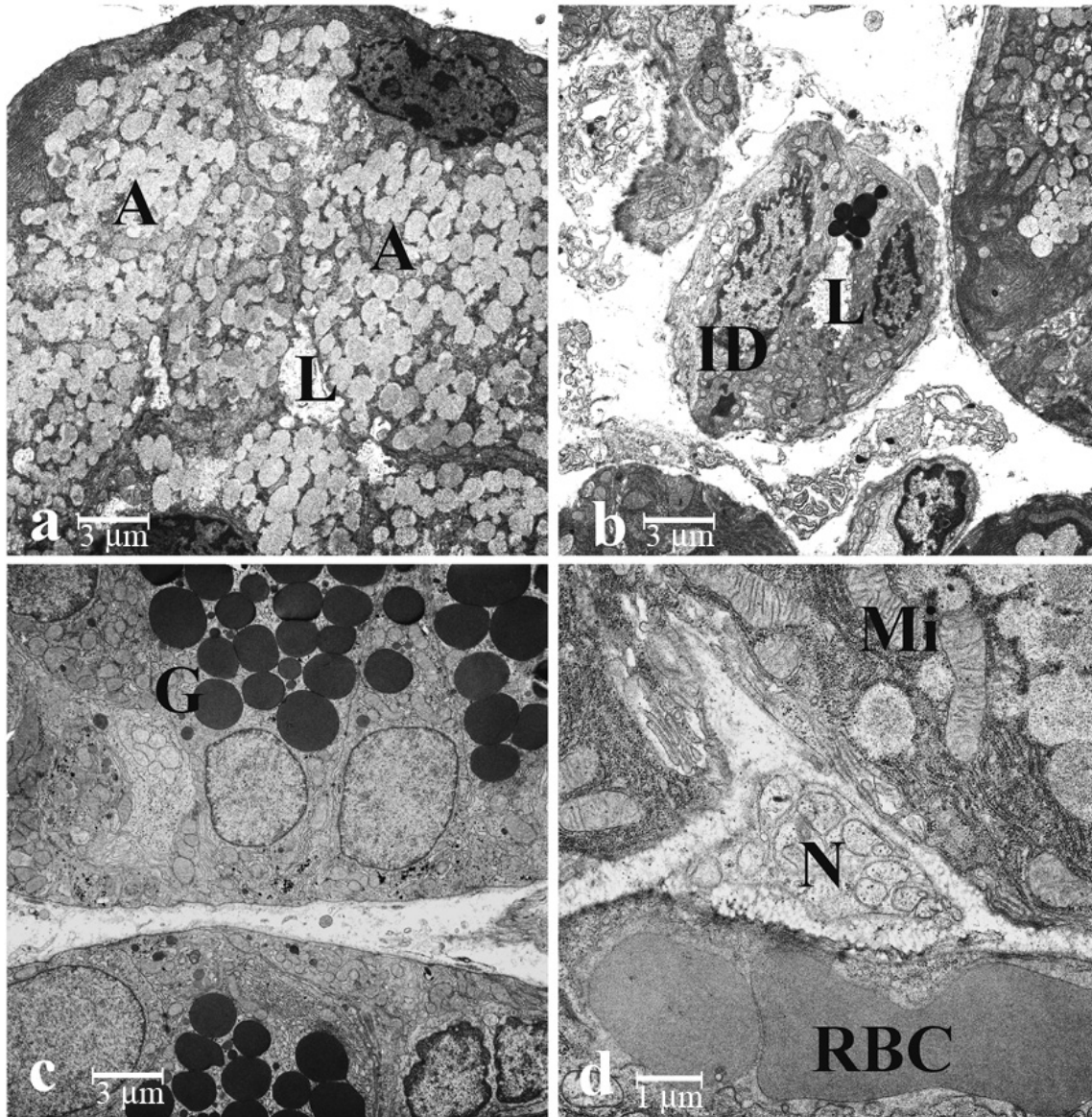


Abb. 13 a-d: Elektronenmikroskopische Aufnahme der Gl. submandibularis ohne BoNT.
a) Azinuszelle, 2710x b) Schaltstück, 2710x c) Streifenstück, 2710x d) Schwanzzelle mit terminalem Axon, 8750x
A= Azinuszelle, L= Lumen, ID= Schaltstücke (intercalated ducts), G= Granula, Mi= Mitochondrien, RBC= Erythrozyten (red blood cells), N= Nerv

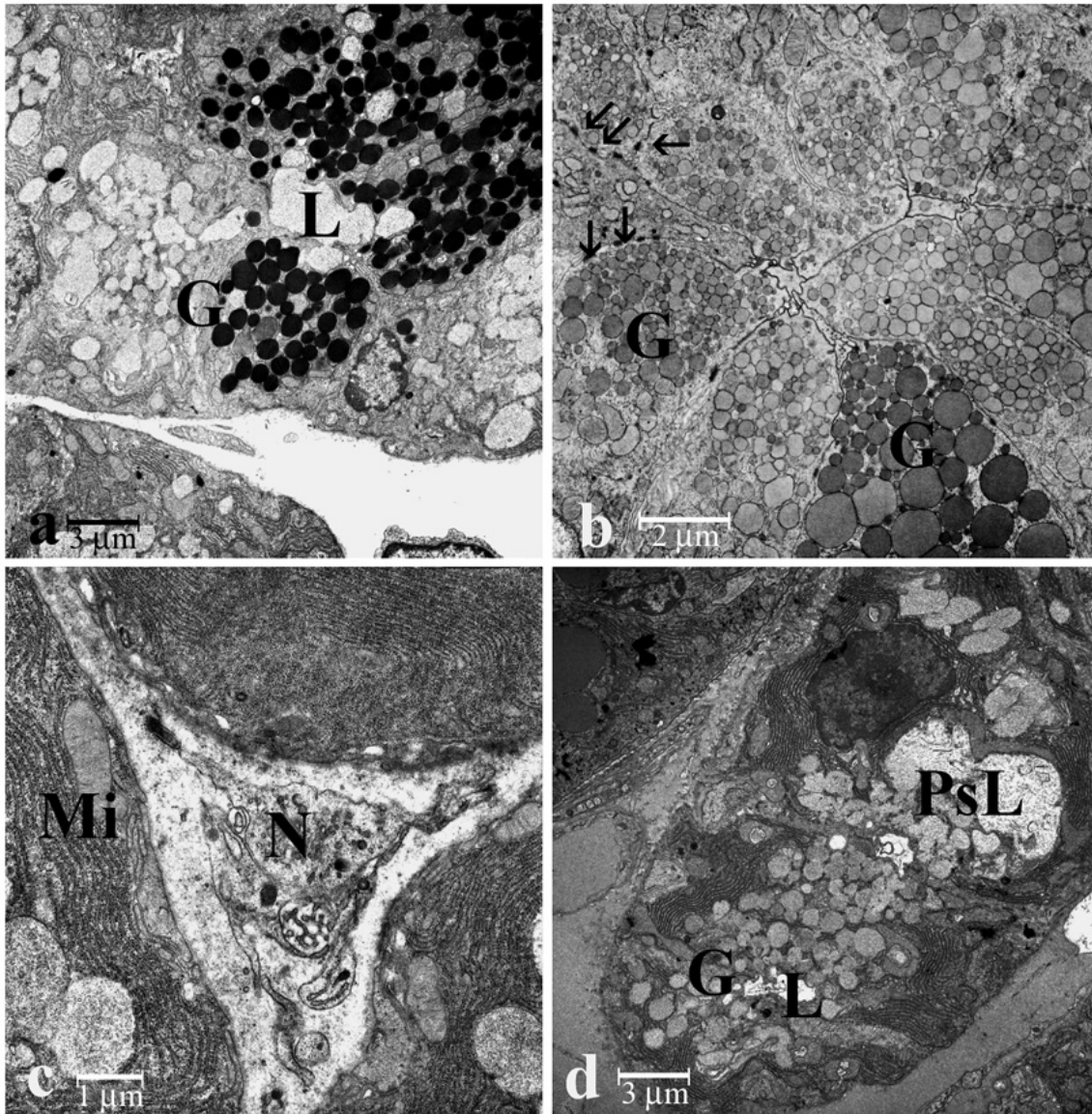


Abb. 14 a-d: Elektronenmikroskopische Aufnahme der Gl. submandibularis mit BoNT/A (Bilder a-c) oder BoNT/B (Bild d) Behandlung. a) Streifenstück, 2710x b) granuliert Streifenstückzellen, 3460x c) leicht veränderter Axon eines Neuronen, 8750x d) Azinuszelle, 2710x

L= Lumen, G= Granula, Mi= Mitochondrien, N= Nerv, PsL= Pseudolumen, ↑= Desmosomen

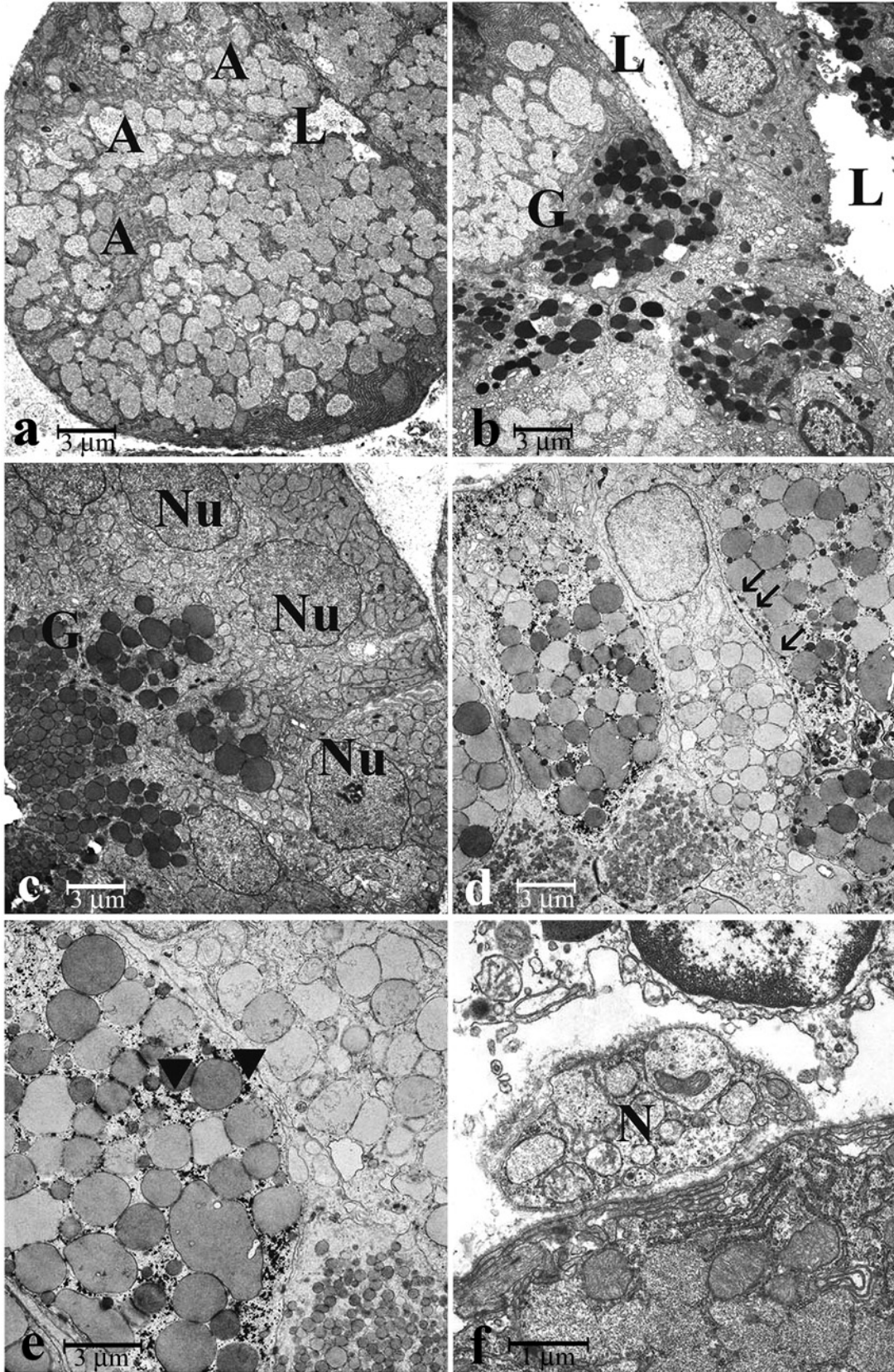


Abb. 15 a-f: Legende siehe folgende Seite.

Legende zu Abb. 15 a-f: Elektronenmikroskopische Aufnahme der Gl. submandibularis mit Kombinationsbehandlung von BoNT/A und B. a) Azinuszellen, 2710x b) an eine Azinuszelle angrenzendes Schaltstück, 2710x c) granulierte Streifenstückzellen, 2710x d) granulierte Streifenstückzellen, 2710x e) granulierte Streifenstückzellen, 5450x f) Nerv, 11100x

A= Azinuszelle, L= Lumen, G= Granula, Mi= Mitochondrien, N= Nerv, ↑=Desmosomen, ▼=Glykogen, Nu= Nukleus

4. Diskussion

Die parasympathische Denervation der Gl. submandibularis, nach Durchtrennung der Chorda tympani bei Ratten, führte in früheren Studien zu einer 15-30%igen Abnahme des Gewichts der Drüsen. Der DNA-Gehalt pro Drüse blieb jedoch unverändert [73,23]. Dies lässt vermuten, dass parasympathische Stimulation einen trophischen Effekt auf Speicheldrüsen hat und nach Denervation zwar eine Atrophie, aber kein vermehrter Zelltod auftritt. Vergleichbare glanduläre Veränderungen konnten in der vorliegenden Arbeit nach chemischer Denervation der Gll. submandibulares durch BoNT-Injektion gezeigt werden. Es wurde eine Gewichtsreduktion der Drüsen von durchschnittlich 9,2% nach BoNT-Behandlung im Vergleich zu den Kontrollen festgestellt. Die mit BoNT/B und die mit einer Kombination aus BoNT/A und BoNT/B behandelten Drüsen waren dabei signifikant leichter als die nur mit BoNT/A behandelten Drüsen. Zudem zeigten die morphologischen Untersuchungen mittels Elektronenmikroskopie nach intraglandulärer Applikation von BoNT deutliche Zeichen der Atrophie der Azinuszellen und eine reduzierte Menge an Sekretgranula. Die Granula erschienen kleiner, polymorph und weniger elektronendicht im Vergleich zu den Kontrollen. Auch die anschließend durchgeführten Messungen der Zellflächen zeigten signifikant kleinere Azinuszellen in den mit BoNT behandelten Drüsenpräparaten. Es bestätigte sich somit in allen Untersuchungsergebnissen eine durch BoNT-Behandlung induzierte Atrophie der Zellen. Zeichen der Apoptose nach Denervation konnten auch in der vorliegenden Arbeit nicht gefunden werden.

Auch Ellies et al. untersuchten unter anderem morphometrisch die Wirkung von Botulinumtoxin auf die Zellmorphologie in der Gl. submandibularis der Ratte [25]. Dabei wurden HE-gefärbte Schnitte der mit BoNT/A behandelten Gll. submandibulares mit einem computerbasierten Bildauswertungsprogramm (IBM-compatible stationary picture analysis system, IBAS 2.0) ausgewertet. Mithilfe dieses Programms wurde pro Präparat eine 0,88 mm² große Flächen mit serösen Azini eingescannt und alle in dieser Fläche sichtbaren Zellkerne gezählt. In dieser Arbeit konnten keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf Zellzahl und Zellflächengröße festgestellt werden. Diese Ergebnisse sind jedoch nicht ohne Vorbehalt zu betrachten, da die morphometrische Auswertung auf die Zählung der Zellkernanzahl pro 0,88 mm² Drüsenpräparat limitiert wurde und somit unzureichend ist.

Zellzwischenräume, überlagerte Azinuszellen, ineinander übergehende Azini und sich in der gemessenen Fläche befindliche andere Zellen außer Azinuszellen, wie zum Beispiel Myoepithelzellen, wurden in der Berechnung der Zellflächengröße nicht berücksichtigt. Zudem wurde keine standardisierte Methode zur Fixation des Gewebes für die morphometrischen Messungen verwendet. Unterschiede in der Schrumpfung des Gewebes während der Fixation wurden dadurch nicht berücksichtigt.

Im Gegensatz dazu wurden in der vorliegenden Arbeit in jedem HE-gefärbten Präparat der Gll. submandibulares 25 Azini standardisiert ausgemessen und die Größen der Azinuszellflächen ermittelt (siehe 2.3.4). Mit dieser Methode scheint eine genauere Beurteilung der Änderungen in der Azinuszellgröße des Drüsengewebes nach Injektion von Botulinumtoxin möglich zu sein. Um eine gleichmäßige Fixierung und Einbettung aller Gewebeproben zu erreichen und Unterschiede in der Schrumpfung des Gewebes zu vermeiden, wurden in der vorliegenden Arbeit alle untersuchten Proben gleichzeitig 48 Stunden in Bouin Hollande Lösung fixiert, anschließend in den Tissue Tek Entwässerungsautomaten (Vogel, Gießen) gegeben und danach eingebettet (siehe 2.3.3).

Weitere Veränderungen der Drüsen durch BoNT-Behandlung, die über die Atrophie der Zellen hinausgehen, wurden ebenfalls beobachtet. So wurde in den immunhistochemischen Untersuchungen und Western Blot Analysen ein reduzierter Amylasegehalt der mit BoNT behandelten Drüsen beobachtet. Dies ist mit der elektronenmikroskopisch festgestellten geringeren Menge an Sekretionsgranula in den Azinuszellen vereinbar. Der deutlich verminderte Amylasegehalt der mit BoNT behandelten Drüsen, lässt auf grundlegende, funktionelle Veränderungen des Speicheldrüsengewebes schließen. Diese scheinen über eine durch parasymphatische Denervation verursachte, temporär verminderte Flüssigkeits- und Elektrolytsekretion hinauszugehen. Der verminderte Amylasegehalt der mit BoNT behandelten Drüsen könnte auch auf eine Wirkung der BoNT auf den Exozytoseapparat in den Azinuszellen zurückzuführen sein. BoNT/A spaltet, wie in Kap. 1.2.3 beschrieben, die SNARE-Proteine SNAP 23 sowie 25 und BoNT/B spaltet die SNARE-Proteine VAMP 1 und 2. Diese Enzyme sind unter anderem an der Freisetzung von Acetylcholin an der präsynaptischen Membran von parasymphatischen Nervenendigungen beteiligt. Dadurch führt ihre Spaltung zu einer temporären parasymphatischen Denervierung der

Speicheldrüsen. Aber auch in Speicheldrüsenazinuszellen selbst konnten verschiedene SNARE-Proteine nachgewiesen werden. VAMP 2 wurde an der Membran sekretorischer Granula isoliert [33,34]. Es konnte zudem gezeigt werden, dass BoNT/B die VAMP 2-assoziierte Amylasefreisetzung von Azinuszellen inhibiert [34]. Syntaxin 2, 3, 4, SNAP 23 und weitere SNARE-Proteine wurden an der Plasmamembran von Speicheldrüsenzellen gefunden [80,42,43]. Die genaue Rolle dieser Proteine bei der Granulaexozytose ist noch nicht in allen Details bekannt. Es ist naheliegend, dass sie spezifische SNAREs des Exozytoseapparates von Azinuszellen repräsentieren könnten [43].

Die BoNTs haben also, wie in Abbildung 16 schematisch dargestellt, zwei verschiedene Angriffspunkte an den Speicheldrüsen. Die Inhibition der cholinergen parasymphatischen Innervation an der neuroglandulären Synapse und speziell die Spaltung, der an der Exozytose beteiligten SNAREs in den Azinuszellen durch BoNT, scheinen die Morphologie und die Funktion der Drüsen zu beeinflussen.

Arbeiten zur Veränderung der Speichelzusammensetzung nach intraglandulärer BoNT/A-Injektion bei Patienten mit Hypersalivation konnten allerdings keinen verminderten Amylasegehalt im Speichel feststellen. Die überwiegend intakte adrenerge Komponente und die isolierte cholinerge Inhibition durch BoNT bewirkte eine Reduktion der Speichelmenge, ließ die Proteinproduktion jedoch weitgehend unbeeinflusst [24]. Nach BoNT-Applikation nahm die Flussrate des Speichels deutlich ab. Da die Proteinproduktion jedoch relativ konstant blieb, resultierte sogar eine erhöhte Amylasekonzentration des Speichels bei mit BoNT/A behandelten Patienten [26].

In den Western Blot Untersuchungen waren entsprechend dem Molekulargewicht von Amylase nur Banden auf Höhe der 55 kDA-Marke des Molekulargewichtsstandard nachweisbar. Kleinere Amylase-immunreaktive Banden, die einen Hinweis für die Degradation des Proteins Amylase nach Toxinbehandlung liefern würden, stellten sich zumindest zu dem Untersuchungszeitpunkt zwei Wochen nach Toxininjektion nicht dar. Es ist somit wahrscheinlich, dass eine geringere Expression des Proteins Amylase in den mit Botulinumtoxin behandelten Drüsen vorliegt.

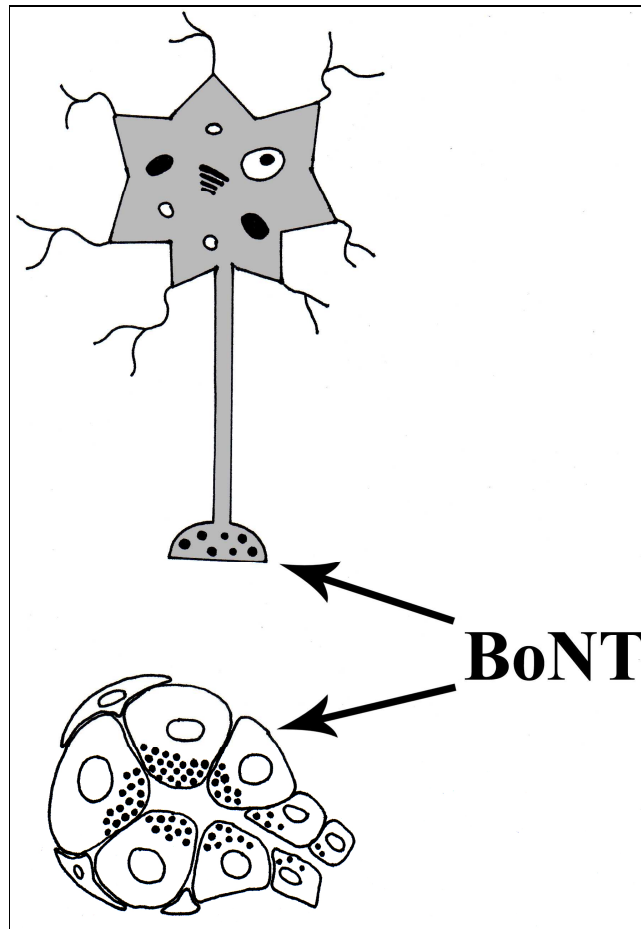


Abbildung 16: Angriffspunkte der Botulinumtoxine an den Speicheldrüsen. BoNTs spalten sowohl an der neuroglandulären Synapse als auch am Proteinoxozytoseapparat in den Azinuszellen verschiedene SNAREs und hemmen somit die Speichelsekretion neben dem neuroglandulären Weg auch auf dem glandulären Wege.

In der vorliegenden Arbeit wurden die immunhistochemischen Untersuchungen mit einer relativ niedrigen Antikörperverdünnung (1:100) des Erstantikörpers Anti-Amylase durchgeführt. Niedrig-verdünnte und nicht-gereinigte Antiseren können unspezifische Immunreaktionen und Kreuzaktivitäten zeigen, insbesondere dann, wenn die Schnitte im Citratpuffer erhitzt wurden. Die gewählte Verdünnung ist jedoch für den verwendeten Anti-Amylase Antikörper hinreichend beschrieben (Takamaso et al. [80]). Außerdem wurden die Western Blot Analysen mit demselben Anti-Amylase-Antiserum durchgeführt und zeigten keine Anzeichen einer unspezifischen Immunreaktion oder Kreuzreaktivität. Es waren nur Banden auf der 55 kDa-Marke des mitgeführten Standards nachweisbar. Somit ist davon

auszugehen, dass die immunhistochemische Färbung der Drüsenpräparate die „richtige“ (=55kDa) Amylase-Immunreaktivität darstellt und ebenfalls nur sehr geringe unspezifische Immunreaktionen aufgetreten sind.

Eine weitere wichtige Beobachtung in der vorliegenden Arbeit ist, dass die deutlichsten morphologischen Veränderungen der Drüsen in den elektronenmikroskopischen und Semidünnschnitt-Untersuchungen durch die Behandlung mit BoNT/A und BoNT/B in Kombination auftraten. Da die beiden Toxine unterschiedliche Proteine spalten, könnte die simultane Spaltung von verschiedenen SNAREs an der neuroglandulären Synapse und in den Azinuszellen für die stärkeren Effekte nach Kombinationstherapie verantwortlich sein.

Die Western Blot Analysen und immunhistochemischen Untersuchungen zeigten sich als in diesem Punkt ungeeignete Methoden zur Beurteilung der unterschiedlichen Wirkung von BoNT/A und BoNT/B separat, sowie der Kombination von beiden. Bei der Auswertung dieser Untersuchungen muss, wie bei allen Auswertungen in dieser Arbeit, jeweils der Vergleich von Kontrolldrüse (links) mit der mit Toxin behandelte Drüse (rechts) jedes Tieres betrachtet werden. Aufgrund der individuell unterschiedlichen physiologischen Amylaseproduktion wiesen allerdings schon die Amylasebanden der Kontrolldrüsen (linke Seiten) der verschiedenen Ratten auf deutliche Unterschiede in der Proteinkonzentration hin. So ließ sich der Unterschied zu den behandelten Drüsen (rechte Seiten) mit nur sehr schwach oder gar nicht nachweisbaren Amylasebanden schwer quantifizieren und vergleichen (siehe Abbildung 12 A). Da aber alle Tiere deutliche Unterschiede in der Amylaseimmunreaktivität in den Western Blot sowie in den immunhistochemischen Untersuchung von behandelte zu unbehandelte Drüse zeigten, kann davon ausgegangen werden, dass BoNT/A und BoNT/B einzeln sowie in Kombination einen starken Einfluss auf die Amylaseexpression haben.

In dieser Arbeit wurden erstmals mittels verschiedener etablierter Untersuchungsmethoden unter standardisierten Bedingungen die Veränderungen von Speicheldrüsen unter BoNT-Behandlung analysiert. Die Ergebnisse zeigen, nach intraglandulärer Injektion, deutliche morphologische und funktionelle Veränderungen des Drüsengewebes. Das lässt vermuten, dass der Effekt des BoNT auf die Speichelsekretion nicht nur mit der Inhibition der

cholinergen Innervation erklärt werden kann. Vielmehr gibt es Hinweise darauf, dass zu einem großen Teil auch die durch BoNT induzierte Inhibition der SNARE-Proteine in den Azini zu der Funktionsstörung der Speicheldrüsen führt. Dies sollte in weiteren Arbeiten zur genauen Wirkung der BoNTs auf die SNARE-Proteine des azinären Vesikelexozytoseapparates untersucht werden und könnte mittels Nachweis von Spaltprodukten der SNAREs in mit BoNT behandelten Azinuszellen erfolgen.

5. Zusammenfassung

Die intraglanduläre Injektion von Botulinumtoxinen führt zu einer temporären Denervation der Speicheldrüsen, welche eine reduzierte Speichelsekretion zur Folge hat. In dieser Arbeit wurden die funktionellen und strukturellen Veränderungen der submandibulären Drüsen von 18 Wistar-Ratten, nach Behandlung mit Botulinumtoxin A, B und einer Kombination von beiden Toxinen, untersucht. Die Toxine wurden jeweils als 0,1 ml Injektion in die rechte Gl. submandibularis der Tiere appliziert, während die linken Drüsen als Kontrollen mit 0,1 ml physiologischer Kochsalzlösung behandelt wurden. 14 Tage nach der intraglandulären Injektion wurden die Gll. submandibulares der Ratten entnommen und mit verschiedenen etablierten Methoden untersucht. Dabei wurde überprüft, ob es zu einer temporären Atrophie der Drüsen nach Applikation von Botulinumtoxinen kommt. In histologischen Untersuchungen von Semidünnschnitten und elektronenmikroskopischen Analysen des Drüsengewebes, insbesondere der Zellgranula und sekretorischen Vesikel, konnten eindeutige Zeichen der Atrophie der Azinuszellen gefunden werden. Diese waren am deutlichsten in den mit BoNT/A und BoNT/B in Kombination behandelten Drüsen zu sehen. Zudem waren die mit Toxin behandelten Gll. submandibulares bei der Gewichtsmessung direkt nach Entnahme signifikant leichter als ihre jeweiligen Kontrolldrüsen ($P=0,004$). Morphometrische Messungen zur Größe der Azinuszellen bestätigten diese Ergebnisse mit signifikant kleineren Zellflächen nach BoNT-Injektion ($P=0,031$). Desweiteren wurden Western-Blot-Analysen und immunhistochemische Amylasefärbungen des Drüsengewebes durchgeführt, die einen reduzierten Amylasegehalt in den mit BoNT behandelten submandibulären Drüsen im Vergleich zu den Kontrolldrüsen zeigten.

Die Ergebnisse dieser Arbeit verdeutlichen, dass intraglanduläre Applikation von BoNT strukturelle und funktionelle Veränderungen der Speicheldrüsen induziert. Diese Effekte könnten auf die Blockade der Acetylcholinausschüttung durch die Spaltung von SNAREs an den neuroglandulären Synapsen, aber auch insbesondere auf die Spaltung der an der Vesikelexozytose in den Azinuszellen beteiligten SNAREs, zurückgeführt werden.

Besonders deutliche Effekte konnten in den histologischen Untersuchungen von Semidünnschnitten und in den elektronenmikroskopischen Untersuchungen bei Kombinationsgabe von BoNT/A und BoNT/B gezeigt werden. Hierfür könnte die Spaltung von verschiedenen SNAREs an der neuroglandulären Synapse und in der Azinuszelle durch die unterschiedlichen BoNT verantwortlich sein.

6. Literaturverzeichnis

- [1] Antharavally BS, DasGupta BR (1997) Covalent structure of botulinum neurotoxin type E: location of sulfhydryl groups, and disulfide bridges and identification of C-terminal of light and heavy chains. *J Protein Chem* 16:787-799
- [2] Antonin W, Fasshauer D, Becker S, Jahn R, Schneider TR (2002) Crystal structure of the endosomal SNARE complex reveals common structural principles of all SNAREs. *Nat Struct Biol* 9:107-111
- [3] Augustine GJ (2001) How does Calcium trigger neurotransmitter release? *Curr Opin Neurobiol* 11:320-326
- [4] Baldys-Waligorska A, Pour A, Moriarty CM, Dowd F (1987) The effect of calcium and cyclic AMP on amylase release in digitonin-permeabilized parotid gland cells. *Biochim Biophys Acta* 929:190-196
- [5] Beaudoin AR, Grondin G (1991) Secretory pathways in animal cells: with emphasis on pancreatic acinar cells. *J Electron Microsc Tech* 17:51-69
- [6] Bennett MK, Scheller RH (1994) A molecular description of synaptic vesicle membrane trafficking. *Annu Rev Biochem* 63:63-100
- [7] Benninghoff A, Drenkhahn D (2002) *Anatomie 16. Auflage, Urban&Fischer Bei Elsevier, München*
- [8] Berridge MJ (1985) The molecular basis of communication within the cell. *Sci Am* 253:142-152
- [9] Beuche W (2004), Behandlung mit Botulinumtoxin B und F. in Lasakwi R, Roggenkämper P, (Hrsg) *Botulinumtoxin-Therapie im Kopf-Hals-Bereich 2.Auflage, Urban&Vogel, München*

- [10] Binscheck T, Wellhöner HH (2004) Struktur und Wirkungsmechanismen der Botulinum-Neurotoxine. in Lasakwi R, Roggenkämper P, (Hrsg) *Botulinumtoxin-Therapie im Kopf-Hals-Bereich 2.Auflage, Urban&Vogel, München*
- [11] Brodsky FM, Chen CY, Knuehl C, Towler MC, Wakeham DE (2001) Biological basket weaving: formation and function of clathrin-coated vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17:517-568
- [12] Bruns D, Jahn R (2002) Molecular determinants of exocytosis. *Pflügers Arch* 433:333-338
- [13] Butcher FR, Putney JW (1980) Regulation of parotid gland function by cyclic nucleotides and calcium. *Adv Cyclic Nucleotide Res* 13:215-249
- [14] Caselitz J, Jaup T, Seifert G (1981) Lactoferrin and lysozyme in carcinomas of the parotid gland. A comparative immunocytochemical study with the occurrence in normal and inflamed tissue. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol* 394:61-73
- [15] Castle AM, Castle JD (1998) Enhanced glycosylation and sulfation of secretory proteoglycans is coupled to the expression of a basic secretory protein. *Mol Biol Cell* 9:575-583
- [16] Castle D, Castle A (1998) Intracellular transport and secretion of salivary proteins. *Crit Rev Oral Biol Med* 9:4-22
- [17] Chapman ER (2002) Synaptotagmin: a Calcium sensor that triggers exocytosis? *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:498-508
- [18] Chilla R, Arglebe C (1975) Pharmacotherapy of hypertension and its significance for the function of the salivary glands. *MMW Munch Med Wochnschr* 117:1425-1428
- [19] Coffield JA, Bakry N, Zhang RD, Carlson J, Gomella LG, Simpson LL (1997) In vitro characterization of botulinum toxin types A, C and D action on human tissues: combined

electrophysiologic, pharmacologic and molecular biologic approaches. *J Pharmacol Exp Ther* 280:1489-1498

[20] Dickson EC, Shevky R (1923) Studies on the manner in which the toxin of *Clostridium botulinum* acts upon the body. 1. The effect upon the autonomic nervous system. *J Exp Med* 37:711-731

[21] Dolly JO, Lande S, Wray DW (1987) The effects of in vitro application of purified botulinum neurotoxin at mouse motor nerve terminals. *J Physiol* 386:475-484

[22] Dong M, Yeh F, Tepp WH, Dean C, Johnson EA, Janz R, Chapman ER (2006) SV2 is the protein receptor for botulinum neurotoxin A. *Science* 312:592-596

[23] Ekström J, Reinhold AC (2001) Reflex-elicited increases in female rat parotid protein synthesis involving parasympathetic non-adrenergic, non-cholinergic mechanisms. *Exp Physiol* 86:605-610

[24] Ellies M, Gottstein U, Rohrbach-Volland S, Arglebe C, Laskawi R (2004) Reduction of salivary flow with botulinum toxin: extended report on 33 patients with drooling, salivary fistulas, and sialadenitis. *Laryngoscope* 114:1856-1860

[25] Ellies M, Laskawi R, Götz W, Arglebe C, Tormählen G (1999) Immunohistochemical and morphometric investigations of the influence of botulinum toxin on the submandibular gland of the rat. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 256:148-152

[26] Ellies M, Laskawi R, Rohrbach-Volland S, Arglebe C, Beuche W (2002) Botulinum toxin to reduce saliva flow: selected indications for ultrasound-guided toxin application into salivary glands. *Laryngoscope* 112:82-86

[27] Emmelin N (1987) Nerve interactions in salivary glands. *J Dent Res* 66:509-517

- [28] Emmelin N (1961) Supersensitivity of salivary glands caused by botulinum toxin. *J Physiol* 156:121-127
- [29] Van Ermengem E (1897) Ueber einen neuen anaeroben Bacillus und seine Beziehung zum Botulismus. *Z Hyg Infektionskrankh* 26:1-56
- [30] Foran PG, Mohammed N, Lisk GO, Nagwaney S, Lawrence GW, Johnson E, Smith L, Aokik R, Dolly JO (2003) Evaluation of the therapeutic usefulness of botulinum neurotoxin B, C1, E and F compared with the long lasting type A. Basis for distinct durations of inhibition of exocytosis in central neurons. *J Biol Chem* 278:1363-1371
- [31] Fujita-Yoshigaki J (1998) Divergence and convergence in regulated exocytosis: the characteristics of cAMP dependent enzyme secretion of parotid salivary acinar cell. *Cell Signal* 10:371-375
- [32] Fujita-Yoshigaki J, Dohke Y, Hara-Yokoyama M, Furuyama S, Sugiya H (1999) Presence of a complex containing vesicle-associated membrane protein 2 in rat parotid acinar cells and its disassembly upon activation of cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 274:23642-23646
- [33] Fujita-Yoshigaki J, Dohke Y, Hara-Yokoyama M, Furuyama S, Sugiya H (1998) SNARE proteins essential for cyclic AMP-regulated exocytosis in salivary glands. *Eur J Morphol Suppl*:46-49
- [34] Fujita-Yoshigaki J, Dohke Y, Hara-Yokoyama M, Kozaki S, Furuyama S, Sugiya H (1996) Vesicle-associated membrane protein 2 is essential for cAMP-regulated exocytosis in rat parotid acinar cells. *J Biol Chem* 271:13130-13134
- [35] Gaisano HY, Sheu L, Grondin G, Ghai M, Bouquillon A, Lowe A, Beaudoin A, Trimble WS (1996) The vesicle-associated membrane protein family of proteins in rat pancreatic and parotid acinar cells. *Gastroenterology* 111:1661-1669

- [36] Garrett JR (1987) The proper role of nerves in salivary secretion: a review. *J Dent Res* 66:387-397
- [37] Garrett JR, Suleiman AM, Anderson LC, Proctor GB (1991) Secretory responses in glandular ducts and acini of submandibular glands in vivo to parasympathetic or sympathetic nerve stimulation in rats. *Cell Tissue Res* 264:117-126
- [38] Gorr SU, Venkatesh SG, Darling DS (2005) Parotid secretory granules: crossroads of secretory pathways and protein storage. *J Dent Res* 84:500-509
- [39] Göschel H, Wohlfarth K, Frevert J, Dengler R, Bigalke H (1997) Botulinum A toxin therapy: neutralizing and nonneutralizing antibodies--therapeutic consequences. *Exp Neurol* 147:96-102
- [40] Hanson PI, Roth R, Morisaki H, Jahn R, Heuser JE (1997) Structure and conformational changes in NSF and its membrane receptor complexes visualized by quick-freeze/deep-etch electron microscopy. *Cell* 90:523-535
- [41] Hunt JM, Bommert K, Charlton MP, Kistner A, Habermann E, Augustine GJ, Betz H (1994) A post-docking role for synaptobrevin in synaptic vesicle fusion. *Neuron* 12:1269-1279
- [42] Imai A, Nashida T, Shimomura H (2004) Roles of Munc 18-3 in amylase release from rat parotid acinar cells. *Arch Biochem Biophys* 422:175-182
- [43] Imai A, Nashida T, Yoshie S, Shimomura H (2003) Intracellular localisation of SNARE proteins in rat parotid acinar cells: SNARE complexes on the apical plasma membrane. *Arch Oral Biol* 48:597-604
- [44] Ito S, Karnowsky MJ (1968) Formaldehyde-glutaraldehyde fixatives containing trinitro compounds. *J Cell Biol* 39:168

- [45] Ito S , Winchester RJ (1963) The fine structure of the gastric mucosa in the bat. *J Cell Biol* 16:541-577
- [46] Jackson MB, Chapman ER (2006) Fusion pores and fusion machines in Ca²⁺- triggered exocytosis. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 35:135-160
- [47] Jahn R (2006) Neuroscience. A neuronal receptor for botulinum toxin. *Science* 312: 540-541
- [48] Jahn R, Lang T, Südhof TC (2003) Membrane fusion. *Cell* 112:519-533
- [49] Jongerius RH, Rotteveel JJ, van Limbeek J, Gabreels FJ, van Hulst K, van den Hoogen FJ (2004) Botulinum toxin effect on salivary flow rate in children with cerebral palsy. *Neurology* 63:1371-1375
- [50] Kamata Y, Kimura Y, Hiroi T, Sakaguchi G, Kozaki S (1993) Purification and characterization of the gangliosid-binding fragment of Clostridium botulinum type E neurotoxin. *Biochim Biophys Acta* 1156:213-218
- [51] Kamata Y, Yoshimoto M, Kozaki S (1997) Interaction between botulinum neurotoxin type A and ganglioside: ganglioside interactives the neurotoxin and quenches its tryptophan fluorescence. *Toxicon* 35:1337-1340
- [52] Klinke R, Silbernagel S, Gay R, Rothenburger A (2005) Physiologie. 5. Auflage, Thieme, Stuttgart
- [53] Koh TW, Bellen HJ (2003) Synaptotagmin 1, a Calcium sensor for neurotransmitter release. *Trends Neurosci* 26:413-422
- [54] Laemmli UK, Beguin F, Gujer-Kellenberger G (1970) A factor preventing the major head protein of bacteriophage T4 from random aggregation. *J Mol Biol* 47:69-85

- [55] Lin RC, Scheller RH (2000) Mechanisms of synaptic vesicle exocytosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16:19-49
- [56] Lipp A, Trottenberg T, Schink T, Kupsch A, Arnold G (2003) A randomized trial of botulinum toxin A for treatment of drooling. *Neurology* 61:1279-1281
- [57] Littleton JT, Barnard RJ, Titus SA, Slind J, Chapman ER, Ganetzky B (2001) SNARE-complex disassembly by NSF follows synaptic-vesicle fusion. *Proc Natl Acad Sci* 98:12233-12238
- [58] Maisey EA, Wadsworth JD, Poulain B, Shone CC, Melling J, Gibbs P, Tauc L, Dolly JO (1988) Involvement of the constituent chains of botulinum neurotoxins A and B in the blockade of neurotransmitter release. *Eur J Biochem* 177:683-691
- [59] Midura TF, Arnon SS (1976) Infant botulism. Identification of *Clostridium botulinum* and its toxin in faeces. *Lancet* 2:934-936
- [60] Molloy L (2007) Treatment of sialorrhoea in patients with Parkinson's disease: best current evidence. *Curr Opin Neurol* 20:493-498
- [61] Nashida T, Imai A, Shimomura H (2006) Relation of Rab26 to the amylase release from rat parotid acinar cells. *Arch Oral Biol* 51:89-95
- [62] Naumann HH, Helms J, Heberhold C (1999) Oto-Rhino-Laryngologie in Klinik und Praxis. Band 2, Thieme, Stuttgart
- [63] Neuhold N, Ullrich R, Huber E (1994) Histologic classification of epithelial salivary gland tumors. *Radiologe* 34:239-247
- [64] Parlati F, McNew JA, Fukuda R, Miller R, Sollner TH, Rothman JE (2000) Topological restriction of SNARE- dependent membrane fusion. *Nature* 407:194-198

- [65] Pazo JH, Rascovsky S, Jerusalinsky D, Medina JH, Tumilasci OR (1989) Increase of muscarinic cholinergic receptors in the rat submandibular glands after parasympathectomy and repeated administration of haloperidol. *Gen Pharmacol* 20:759-761
- [66] Poat JA, Templeton D (1982) Non-specific supersensitivity in rat parotid salivary glands following parasympathectomy. *J Auton Pharmacol* 2:79-85
- [67] Putney JW (1986) Identification of cellular activation mechanisms associated with salivary secretion. *Annu Rev Physiol* 48:75-88
- [68] Quissell DO, Barzen KA, Deisher LM (1993) Rat submandibular and parotid protein phosphorylation and exocytosis: effect of site-selective cAMP analogs. *Crit Rev Oral Biol Med* 4:443-448
- [69] Rins de David ML, Caceres A, Goldraj A (1990) Sexual dimorphism in rat submaxillary gland. *Acta Odontol Latinoam* 5:63-69
- [70] Rothman JE (1994) Intracellular membrane fusion. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 29:81-96
- [71] Schiavo G, Rossetto O, Benfenati F, Poulain B, Montecucco C (1994) Tetanus and botulinum neurotoxins are zinc proteases specific for components of the neuroexocytosis apparatus *Ann NY Acad Sci* 710:65-75
- [72] Schibler U, Hagenbuchle O, Young RA, Tosi M, Wellauer PK (1982) Tissue specific expression of mouse alpha-amylase genes. *Adv Exp Med Biol* 158:381-385
- [73] Schneyer CA, Hall HD (1966) Function of rat parotid gland after sympathectomy and total postganglionectomy. *Am J Physiol* 211:943-949
- [74] Scott AB (1980) Botulinum toxin injection into extraocular muscles as an alternative to strabismus surgery. *Ophthalmol* 87:1044-1049

[75] Scott AB, Kennedy RA, Stubbs HA (1985) Botulinum A toxin injection as a treatment for blepharospasm. *Arch Ophthalmol* 103:347-350

[76] Stecher B, Weller U, Habermann E, Gratzl M, Ahnert Hilger G (1989) The light chain but not the heavy chain of botulinum A toxin inhibits exocytosis from permeabilized adrenal chromaffin cells. *FEBS Lett* 255:391-394

[77] Sutton RB, Fasshauer D, Jahn R, Brunger AT (1998) Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature* 395:347-353

[78] Tabak LA, Levine MJ, Mandel ID, Ellison SA (1982) Role of salivary mucins in the protection of the oral cavity. *J Oral Pathol* 11:1-17

[79] Tacket CO, Rogawski MA (1989) Botulism. in Simpson LL *Botulinum-Neurotoxin and Tetanus Toxin*, 351-372, Academic Press, New York

[80] Tokoro T, Tezel E, Nagasaka T, Kaneko T, Nakao A (2003) Differentiation of acinar cells into acinoductular cells in regenerating rat pancreas. *Pancreatology* 3:487-49

[81] Takuma T, Arakawa T, Tajima Y (2000) Interaction of SNARE proteins in rat parotid acinar cells. *Arch Oral Biol* 45:369-375

[82] Takuma T, Ichida T (1986) Does cyclic AMP mobilize Ca^{2+} for amylase secretion from rat parotid cells? *Biochim Biophys Acta* 887:113-117

[83] Tamarin A, Sreebny LM (1965) The rat submaxillary salivary gland. A correlative study by light and electron microscopy. *J Morphol* 117:295-352

[84] Thesleff P (1989) An electrophysiological in-vivo study on the effects of nerve stimulation, drugs and denervation in the parotid gland of the rat. *Acta Physiol Scand* 136:235-243

- [85] Tucker WC, Weber T, Chapman ER (2004) Reconstitution of Calcium-regulated membrane fusion by synaptotagmin and SNAREs. *Science* 304:435-438
- [86] Venable JH, Coggeshall RA (1965) Simplified lead citrate stain for use in electron microscopy. *J Cell Biol* 25:407-408
- [87] Whitlock RH, Buckley C (1997) Botulism. *Vet Clin North Am Equine Pract* 13:107-128
- [88] Yoshimura K, Fujita-Yoshigaki J, Murakami M, Segawa A (2002) Cyclic AMP has distinct effects from Ca²⁺ in evoking priming and fusion/exocytosis in parotid amylase secretion. *Pflugers Arch* 444:586-596
- [89] Young JA, Schneyer CA (1981) Composition of saliva in mammalia. *Aust J Exp Biol Med Sci* 59:1-53
- [90] Young JA, Van Lennep EW (1978) Morphology of the salivary glands. *Academic Press Inc, London*
- [91] Zakowski JJ, Gregory MR, Bruns DE (1984) Amylase from human serous ovarian tumors: purification and characterization. *Clin Chem* 30:62-68

7. Anhang

Abkürzungsverzeichnis

Abb - Abbildung
ATP - Adenosintriphosphat
ADP - Adenosindiphosphat
BoNT - Botulinumtoxin
BoNTs - Botulinumtoxine
cAMP - zyklisches Adenosinmonophosphat
GDP - Guanosindiphosphat
Gl. - Glandula
Gll. - Glandulae
GTP - Guanosintriphosphat
GTPase - Guanosintriphosphatase
H.E. - Hämatoxylin Eosin
i.m. - intra musculär
KG - Körpergewicht
LD 50 – mittlere letale Dosis
M. - Musculus
N. - Nervus
SNAP - Soluble NSF attachment protein
SNARE - Soluble NSF attachment protein receptor
SNAREs - Soluble NSF attachment protein receptors
Tab - Tabelle
TeNTx - Tetanustoxin
VAMP - Vesicle associated membrane protein

Laborgeräte

A

Akkubetriebene Pipettierhilfe,
Autoklav, Fedegari, Typ FVA 2/ FVA 3

Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Fedegari Autoclavi, Albuzzano, Italien

B

Bechergläser
Begasungsbrutschrank BB16 function line
Bio-Fotometer
Bio-Rad´s Modular Mini Electrophoresis
System:

- Mini Protean 2 dual slab Cell
- Electrophoretic Transfer Cell

Bio-Rad Power Pac 300
Brutschrank, Heraeus Instruments

Kobe, Marburg
Heraeus Instruments, Hanau
Eppendorf, Hamburg
BioRad Laboratories, München

BioRad Laboratories, München
Kendro Laboratory Products, Langenselbold

C

Ceran-Laborkocher SLK 6

Schott AG, Mainz

E

Erlenmeyerkolben
Eismaschine
Einbettungsgerät Bavimed Enno
Einbettungsgerät Tissue Tek
Entwässerungsautomat Tissue Tek VIP
Elektronenmikroskop EM 10A/B

Kobe, Marburg
Ziegra, Isernhagen
Vieth Mikrotome GmbH, Wiesmoor
Vogel, Gießen
Vogel, Gießen
Zeiss, Jena

F

Flüssigstickstoff-Kryobehälter Locator
Filmkassetten BLUE M2 CURI x screens

Messer Group GmbH, Krefeld
AGFA, Köln

H

Heizplatte und Rührgerät stuart stir CB 161
HCL Heizblock Thermostat HBT 130-2

Bibby Sterilin, Newport, UK
Kobe, Marburg

I

Inkubationsschüttler Duomax 1030

Heidolph Instruments, Schwabach

Insulinspritzen Omnifix 40 Duo 0,45x12

Braun, Melsungen

K

Kühlschrank für pharmazeutische
Präparate +2°C

Sanyo, Bad Nenndorf

Kühlschrank +4°C und -20°C

Porkkamp, Finnland

L

Labor-Spülautomat, G 7883 CD

Miele, Gütersloh

Laborzentrifugen

Heraeus instruments, Hanau

- Laborfuge 400R function line

- Medifuge

Laborzentrifuge Universal 30 RF

Hettich, Tuttlingen

Laborwaage

Sartorius, Göttingen

Lichtmikroskop DM-RD

Leica, Wetzlar

M

Mikroskop Telaval 31

Zeiss, Jena

Mikroskop (binokulares Lichtmikroskop)

Zeiss, Jena

Mikroskop Olympus AX70TRF

Olympus, Hamburg

Mikrotom

Leica, Wetzlar

Mikrowelle space cube 50

Philips, Eindhoven, Niederlande

Mischrad

Fröbel Labortechnik, Lindau

Mörserschalen und Mörserstäbe

Haldenwanger, Berlin

P

Pipetten, Pipetman P

Gilson, Middleton, USA

Power Pac 300

BioRad Laboratories, München

Power Pac Universal

Power Pac HC

R

Reinstwasseranlage membra Pure, Astacus

MembraPure GmbH, Bodenheim

S

Sicherheitswerkbänke Herasefe, Kendro, Langenselbold
1x Skalpelle Disposable scalpel 22er und 15er Feather, Socorex, Schweiz
Spritze Microliter Syringes Hamilton Bonaduz, Schweiz

T

Tiefkühlschrank -30°C, MDF-U537 Sanyo, Bad Neudorf
Tissue cool plate Cop20 Medite Medizintechnik, Burgdorf

U

Ultra Tiefkühlschrank -86°C, MDF-U71V Sanyo, Bad Neudorf
Ultracut Mikrotom Leica Microsystems, Nußloch

V

Vortex-Genie 2 Scientific Industries, NY, USA

W

Wasserbad GFL, Burg Wedel

X

X-Ray Film Processor Optimax Typ TR MS Laborgeräte, Wiesloch

Liste der verwendeten Gebrauchslösungen und Puffer

Lysispuffer

1 ml Stammlösung Lysispuffer bestehend aus:

137 mM NaCl, 1% Nonidet P 40, 20 mM Tris/HCl pH 7,5, 2 mM EDTA,
10% Glycerol

+ 100 µl Protease

+ 50 µl Phosphatase

Puffer für Western Blot Analyse:

Laufpuffer für SDS-PAGE (10X Elektrophorese-Puffer; auf 2L a.d.):

| | |
|-----------|---------|
| Tris Base | 60,4 g |
| Glycin | 376,0 g |
| SDS | 20,0 g |

Transferpuffer Nass-Blot (pH 8,3; auf 1L a.d.):

| | |
|-----------|---------|
| Tris | 30,3 g |
| Glycin | 144,0 g |
| Tris Base | 60,4 g |

SDS – Probenpuffer, 4X:

| | |
|---------------------|---------|
| SDS 20% | 2 ml |
| Glycerin | 4 ml |
| B-Merkaptoethanol | 2 ml |
| Tris 2,0M pH 6,8 | 1,25 ml |
| Bromphenolblau 0,1% | 0,4 ml |

Gewebefixanslösungen:

Bouin Hollande Gebrauchslösung mit Eisessig:

- 100 Teile Bouin Hollande Stammlösung
- 10 Teile Formaldehydlösung, 37%ig, säurefrei (Merck 3999)
- 1 Teil Eisessig

Ito-Lösung:

- 2,5% Paraformaldehyd
- 2,5% Glutaraldehyd
- 0,05% Pikrinsäure
- 0,1 M Cacodilatpuffer pH 7,3

Puffer für Immunhistochemie:

TBS (Spülpuffer):

- 53 g NaCl
- 12 g Tris
- ad 1000 ml aqua dest (zum Gebrauch 1:10 verdünnt) pH 7,4 eingestellt

Tris HCl Puffer:

- 60,57 g Tris in ca. 500 ml aqua dest gelöst mit 1n HCl auf pH 7,4 eingestellt
- auf 1L mit aqua dest auffüllt
- zum Gebrauch 1:10 verdünnt

PBS 0,15M (1Liter):

- NaCl 8 g
- KCl 0,2 g
- NaHPO₄ 2H₂O 1,16 g
- KH₂PO₄ 0,2 g
- pH 7,4 eingestellt

10mM tri-Na-citrat-Dihydrat-Puffer:

2,9410 g/l, pH 6,0 mit HCl eingestellt

Methanol-Wasserstoffperoxid-Lösung:

200 ml Methanol + 6 ml 30%ige Wasserstoffperoxidlösung kurz vor Gebrauch vermengt

Gebrauchslösungen für Elektronenmikroskopie und Semidünnschnitte:**Eponstammlösung A:**

62 ml Glycid ether + 100 ml DDSA

Eponstammlösung B:

100 ml Glycid ether + 89 ml MNA

Eponstammlösung C:

Gleiche Teile von Epon A & B mit Beschleuniger DMP30 im Verhältnis 1,8% des Gesamtgewichts durchgemischt. Bei -20°C gelagert.

Uranylacetatlösung:

2 g Uranylacetat in 100 ml warmen aqua bidest. gelöst (gesättigte Lösung), pH 5 eingestellt und vor Gebrauch zentrifugiert

Bleicitratlösung:

0,125 g Bleicitrat in 40 ml aqua dest. gegeben, 5 Minuten geschüttelt, 5 ml 1M NaOH dazugegeben und mit weiteren 50 ml aqua dest. geschüttelt bis alles völlig gelöst war, pH 12,0 eingestellt

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Sommer
Vorname: Franziska Paula Maria
Geburtsdatum: 05.09.1983
Geburtsort: Ludwigshafen am Rhein
Eltern: Ingrid Sommer, geb. Mundinger, Diplommusiklehrerin
Johann Sebastian Sommer, Orchestermusiker
Geschwister: Theresa Sommer, Studentin, Ludmilla Sommer, Schülerin

Schulbildung

1989-1993 Hainbundschohle Göttingen-Weende
1993-1995 Orientierungsstufe Nord, Göttingen
1995-2002 Felix-Klein-Gymnasium, Göttingen
2002 Verleihung des Felix-Klein-Preises für besonderes Engagement an der Schule

Hochschulbildung

2002 Aufnahme des Studiums der Humanmedizin an der Philipps-Universität Marburg
2004 1.Staatsexamen (Physikum), Note „gut“
2005 Beginn der Dissertation
05/2009 2. Staatsexamen, Note „sehr gut“

Sonstiges

1995-2001 Privatstudium Klavier bei Herrn Prof. K.H. Kämmerling und Frau Prof H. Köhler an der Hochschule für Theater und Musik Hannover, erfolgreiche Teilnahme an verschiedenen nationalen und internationalen Wettbewerben.
2005-2007 Nachtdienst in der Abteilung für Transfusionsmedizin der Philipps-Universität Marburg bei Prof. Dr. V. Kretschmer

Akademische Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen/Herren in Marburg:

Adam, Adamkiewicz, Alter, Arnold, Aumüller, Barth, Bartsch, Basler, Bauer, Baum, Baumann, Behr, Benes, Berger, Bette, Bien, Boudriot, Cetin, Czubayko, Daut, Dinges, Dominguez, Donner-Banzhoff, Eilers, Elsässer, Feuser, Funk, Garten, Gecks, Gemsa, Gerdes, Görk, Gotzen, Gress, Grimm, Gundermann, Grzeschik, Hadji, Hartmann, Hasilik, Hegele, Herrmann-Lingen, Hertl, Herzum, Hilt, Hoffmann, Hörle, Hoyer, Ihm, Jacob, Jaques, Jonas, Kalder, Kalinowski, Kann, Kanngießer, Karakas, Karger, Kern, Kill, Kim-Berger, Kleine, Klenk, Klingmüller, Klose, Köhler, Konrad, Koolmann, Krause, Kretschmer, Krieg, Kroll, Krones, Krüger, König, Kuhlmann, Kühnert, Kuni, Lang, Lemke, Leonhardt, Lill, Löffler, Lohoff, Maier, Maisch, Mandic, Mandrek, Mann, Mennel, Moll, Moosdorf, Mueller, Müller, Müssigbrodt, Mutters, Neubauer, Oeffner, Oertel, Plant, Ramaswamy, Reinartz, Remschmidt, Renz, Richter, Röhm, Röper, Rosenow, Rothmund, Ruchholtz, Rupp, Sahmland, Sattler, Schäfer, Schmidt, Schnabel, Schneider, Schrader, Schwarz, Seitz, Slonka, Steiniger, Stiletto, Strauch, Stempel, Suske, Teymoortash, Vogelmeier, Voigt, Wagner, Waldegger, Weihe, Weiler, Werner, Westermann, Westphal, Wilke, Wennemuth, Wolf, Wulf, Zemlin, Ziring, Zwiorek.

Danksagungen

Herrn Prof. J.A. Werner, Direktor der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde der Philipps-Universität Marburg, gilt mein herzlicher Dank für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes sowie seinen unterstützenden Rat zur Fertigstellung der Arbeit.

Besonders danke ich Herrn Prof. Dr. med. A. Teymoortash, leitender Oberarzt der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde der Philipps-Universität Marburg für die Überlassung des Themas, die nie nachlassende vielfältige Unterstützung während der gesamten Arbeit mit konstruktiven Ratschlägen und einer hervorragenden Korrekturarbeit. Vielen Dank für die großartige Betreuung.

Herrn Prof. Dr. med. Aumüller, ehemaliger Leiter des Instituts für Anatomie und Zellbiologie der Philipps-Universität Marburg, danke ich vielmals für die großartige Unterstützung und Beratung bei der Durchführung und Auswertung der histologischen und insbesondere der elektronenmikroskopischen Untersuchungen, sowie die besonders freundliche Zusammenarbeit.

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. R. Mandic, Assistenzarzt der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde der Philipps-Universität Marburg, danke ich für die Betreuung und Unterstützung im Labor und für vielfältige Anregungen.

Herrn Priv.-Doz. Dr. M. Bette, Institut für Anatomie der Philipps-Universität Marburg, danke ich herzlich für die Unterstützung und die Hilfestellung bei den morphometrischen Untersuchungen, der Anfertigung der histologischen Präparate und der Formatierung der Abbildungen. Vielen Dank für die gute Zusammenarbeit.

Bei Herrn A. Scherag, Institut für medizinische Biometrie und Epidemiologie der Philipps-Universität Marburg, möchte ich mich für die kompetente und lehrreiche statistische Beratung im Rahmen dieser Dissertation bedanken.

Herrn Dr. S. Schulze und seinen Mitarbeitern im Tierstall der Philipps-Universität Marburg danke ich für die freundliche und kompetente Hilfe und Beratung bei den Tierversuchen und für die Betreuung der Tiere.

Herzlichen Dank an Frau R. Peldszus und Frau M. Sadowski, medizintechnische Assistentinnen der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde der Philipps-Universität Marburg und Frau G. Hoffbauer, medizintechnische Assistentin des Institutes für Anatomie der Philipps-Universität Marburg, für die Hilfsbereitschaft und herausragend freundliche und kompetente Unterstützung bei allen Laborarbeiten. Sie standen mir bei Fragen und technischen Problemen stets mit Ratschlägen zur Seite. Besonders für die große Hilfe bei der Durchführung der elektronenmikroskopischen Untersuchungen, der Einbettung des Drüsengewebes, der Herstellen der Ultradünnschnitte sowie der Kontrastierung für die Elektronenmikroskopie, danke ich Frau G. Hoffbauer.

Besonderer Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden F. Müller und M. Pauly für die Ermöglichung meines Studiums sowie die liebevolle Motivation während aller Phasen der Entstehung der vorliegenden Dissertation.

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

Strukturelle und funktionelle Veränderung der Glandula submandibularis der Wistar-Ratte nach intraglandulärer Applikation von Botulinumtoxin

im Medizinischen Zentrum für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde (Direktor: Herr Prof. Dr. med. J.A. Werner) unter der Anleitung und Unterstützung von Prof. Dr. med. A. Teymoortash ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt. Ergebnisse der vorliegenden Doktorarbeit wurden in folgenden Publikationsorganen veröffentlicht:

Teymoortash A, Sommer F, Mandic R, Schulz S, Bette M, Aumüller G, Werner JA:
Intraglandular application of botulinum toxin leads to structural and functional changes in rat acinar cells. *Br J Pharmacol* (2007) 152:161-7

Marburg, den 07.01.2009

Franziska Sommer

Englische Zusammenfassung

Background and purpose: Intraglandular injection of botulinum toxin (BoNT) leads to a transient denervation of the submandibular gland, associated with reduced salivary secretion. The purpose of the present study is to explore the morphological and functional changes in submandibular tissue after chemical denervation of the glands by botulinumtoxin application. Experimental approach: Tissue specimens of the right submandibular gland from 18 Wistar rats were examined after intraglandular injection of BoNT A, BoNT B, or a combination of both. As a sham control, an equivalent volume of saline was injected into the left submandibular gland. Morphometric measurements, immunohistochemistry, electron microscopy and western blot analysis were used to analyse the morphological and functional changes of the denervated glands. Key results: Morphological and ultrastructural analyses of the cell organelles and secretory granula showed clear atrophy of the acini, which was more prominent in glands treated with the combination of BoNT/A and B. Morphometric measurements of the glandular acini revealed a significantly reduced cell area of acinar cells after injection of BoNT ($P=0.031$). Furthermore, the expression of amylase was significantly reduced in BoNT treated glands. Conclusions and implications: Intraglandular application of BoNT induces major structural and functional changes in the salivary glands, indicated by glandular atrophy and reduced production of amylase. These effects may be due to glandular denervation by the inhibition of the soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment protein receptors (SNAREs) involved in acetylcholine release at the neuroglandular junction. Moreover, the effects may also be due to the inhibition of SNAREs which are involved in exocytosis of the granula in acinar cells. The combination of BoNT/A and BoNT/B showed the most promising results in this study, indicating that the subtypes have different effectivities in the inhibition of SNAREs at neuroglandular junctions or in acinar cells.