

Aus der Universitätsklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde mit  
Poliklinik Tübingen  
Geschäftsführender Direktor: Professor Dr. Dr. h.c. H. P. Zenner

Expressionsmuster von Vasopressin-Rezeptoren im  
Saccus und Ductus endolymphaticus der Ratte

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von

Sabine Bettina Frühwald

aus

Neustadt a. d. Aisch

2009

Dekan: Prof. Dr. I. B. Autenrieth

Erster Berichterstatter: Prof. Dr. M. Maassen

Zweiter Berichterstatter: Prof. Dr. H.-U. Häring

Gewidmet meinen lieben Eltern.

---

1	EINLEITUNG	1
1.1	Einführung	1
1.2	Morbus Menière	2
1.3	Der endolymphatische Hydrops	5
1.4	Pathophysiologie des Morbus Menière	6
1.5	Modelle des endolymphatischen Hydrops	8
1.6	ADH-abhängiges Volumenregulationssystem	9
1.7	Theoretische Grundlagen	10
1.7.1	Anatomie des Ductus und Saccus endolymphaticus der Ratte	10
1.7.2	Vasopressin-Rezeptoren	12
1.7.3	Antidiuretisches Hormon	14
1.8	Zielsetzung der Arbeit	16
2	MATERIAL UND METHODEN	17
2.1	Immunhistochemischer Nachweis der Vasopressinrezeptoren	17
2.1.1	Mikrochirurgisches Präparations- und Fixierverfahren	17
2.1.1.1	Material	17
2.1.1.2	Methode	18
2.1.2	Immunhistochemisches Färbeverfahren	20
2.1.2.1	Material	20
2.1.2.2	Methode	21
2.2	Nachweis des V2-Rezeptorproteins mittels Immunoblotverfahrens	23
2.2.1	Probenaufbereitung, Proteinbestimmung und Proteinfällung	23
2.2.1.1	Material	23
2.2.1.2	Methode	24
2.2.2	Gelelektrophorese und Western-Blot	26
2.2.2.1	Material	26
2.2.2.2	Methode	27
2.3	Antikörper für Immunhistochemie und Immunoblot	28
2.3.1	Primärantikörper	28
2.3.2	Sekundärantikörper	29

---

3	ERGEBNISSE	30
3.1	Immunhistochemie	30
3.1.1	V2-Rezeptor Nachweis - Immunhistochemie	31
3.1.1.1	Expression am Präparat und Kontrollgewebe	31
3.1.1.2	Verteilungsmuster V2-Rezeptor-Expression am Präparat	36
3.1.1.3	Detaildarstellung der V2-Rezeptor-Expression	37
3.1.2	V1a-Rezeptor Nachweis – Immunhistochemie	40
3.1.2.1	Expression am Präparat und Kontrollgewebe	40
3.1.3	V1b-Rezeptor Nachweis - Immunhistochemie	43
3.1.3.1	Expression am Präparat und Kontrollgewebe	43
3.1.3.2	Detaildarstellung der V1b-Rezeptor-Expression	45
3.2	Immunoblot – V2-Rezeptor	48
4	DISKUSSION	50
4.1	V2-Rezeptor	50
4.1.1	V2-Rezeptor - Immunhistochemie	51
4.1.2	V2-Rezeptor - Immunoblot	54
4.1.3	Der V2-Rezeptor als Bestandteil des Volumenregulationssystems	56
4.2	V1-Rezeptoren	57
4.2.1	V1a-Rezeptor - Immunhistochemie	57
4.2.2	V1b-Rezeptor - Immunhistochemie	59
5	ZUSAMMENFASSUNG	60
6	ANHANG	61
6.1	Literaturverzeichnis	61
6.2	Abkürzungsverzeichnis	70
6.3	Danksagung	71

## 1 EINLEITUNG

### 1.1 Einführung

Für die meisten Erkrankungen des Innenohres sind die ursächlichen Faktoren weitgehend unbekannt. Bis heute konnte auch die Ätiologie der Menière'schen Erkrankung nicht vollständig geklärt werden, und die Diagnose wird weiterhin anhand der klinischen Symptomtrias fluktuierende Tieftonschwerhörigkeit, Tinnitus und rezidivierende Drehschwindelattacken gestellt. Eine kausale Therapie dieser Erkrankung ist das Ziel vieler Forschungen. Dieses Ziel setzt jedoch möglichst genaue Kenntnisse der Ursachen der Menière'schen Erkrankung voraus.

Durch histopathologische Untersuchungen an Felsenbeinpräparaten von Patienten mit der Menière'schen Erkrankung wurde 1938 eine durch Volumenzunahme bedingte Ausweitung des endolymphatischen Systems entdeckt (Yamakawa, 1938 in Osaka; Hallpike und Cairns, 1938 in London). Klinisch wurde später eine Korrelation zwischen einer Erhöhung des Plasmaspiegels für das Antidiuretische Hormon (ADH), auch Vasopressin (V) genannt, und Innenohrerkrankungen, die mit einem idiopathischen Hydrops einhergehen, festgestellt (Takeda et al., 1995). In Tierexperimenten konnte durch eine systemische ADH-Applikation ein endolymphatischer Hydrops induziert werden (Kumagami et al., 1998; Takeda et al., 2000). In der Niere kennt man bereits ein ADH-gesteuertes Volumenregulationssystem mit einem ADH-Rezeptor, dem Vasopressin<sub>2</sub>-Rezeptor (V<sub>2</sub>-R), und dem zugehörigen Wasserkanal Aquaporin-2 (AQP-2) (Nielsen und Agre, 1995). Im Innenohr finden wichtige Prozesse, wie das Hören und die Steuerung des Gleichgewichtes, in Beziehung zu flüssigkeitsgefüllten Räumen statt. Zur Volumenregulation im Endolymphsystem des Innenohres könnte folglich ein Flüssigkeitsregulationssystem wie in der Niere existieren.

Somit war es Ziel dieser Arbeit, den V<sub>2</sub>-Rezeptor im Saccus endolymphaticus (SE) und Ductus endolymphaticus (DE) im Tiermodell Ratte mit verschiedenen Methoden nachzuweisen. Der Nachweis erfolgte mittels Immunhistochemie und erstmals auf Proteinebene mit Western-Blot. Außerdem wurden die ADH-Rezeptoren V<sub>1a</sub> und V<sub>1b</sub> immunhistochemisch nachgewiesen.

## 1.2 Morbus Menière

Die Symptomtrias fluktuierende Tieftonschwerhörigkeit, Tinnitus und rezidivierende Drehschwindelattacken definiert die Menière'sche Erkrankung. Oft findet sich auch ein Völlegefühl im Ohr (Mancini et al., 2002; Thai-Van et al., 2001). Diese Symptomkonstellation wurde im Jahre 1861 durch Prosper Menière in der „Gazette médicale de Paris“ erstmals beschrieben. Zur damaligen Zeit war das Auftreten dieser Symptome als apoplektiforme cerebrale Kongestion bekannt. Sie wurden dem Gehirn als Ursprungsorgan zugeordnet und als psychiatrische Erkrankung betrachtet. Prosper Menière postulierte die Ursache der Symptome erstmals im Innenohr, speziell in den Bogengängen (Menière, 1861). Dafür sprachen das gemeinsame Auftreten von auditorischen und vestibulären Symptomen. Hierbei stützte sich Prosper Menière auf die Erkenntnisse von Flourens, der bei Untersuchungen an Brieftauben das Gleichgewichtsorgan in den Bogengängen des Innenohres lokalisiert hatte (Flourens, 1842). 1867 wurde der Begriff der „Menière'schen Erkrankung“ erstmals in einer wissenschaftlichen Veröffentlichung von Politzer benutzt (Poltzer, 1867). Simon Duplay prägte 1872 den Begriff „Morbus Menière“ für den von Prosper Menière beschriebenen Komplex von Symptomen (Duplay, 1872).

Die Häufigkeit des Morbus Menière wird in der Literatur unterschiedlich angegeben. Gründe hierfür können mit der wechselnden Symptomatik, der Schwierigkeit einer Differentialdiagnose und den nicht einheitlichen diagnostischen Kriterien zusammenhängen. 1972 veröffentlichte die „American Academy of Otolaryngology“ (AAO) Richtlinien zur Diagnose der Menière'schen Krankheit. 1995 wurden diese Richtlinien zuletzt neu definiert (Committee on Hearing and Equilibrium, 1972 und 1995). Cawthorne und Hewlett haben 1954 in Großbritannien eine Prävalenz von 0,16 % in der Bevölkerung festgestellt (Cawthorne und Hewlett, 1954). In einer weiteren britischen Studie berichteten Harrison und Naftalin 1968 über eine Häufigkeit von 0,1% in der englischen Bevölkerung (Harrison und Naftalin, 1968). Aktuelle deutsche Literaturangaben berichten von einer Prävalenz von 0,1 %, wobei jeder fünfte Patient eine positive Familienanamnese hat (Schaaf, 2007). Die Inzidenz der Menière'schen Erkrankung kann von genetischer Prädisposition und von Umweltfaktoren beeinflusst sein. Diese Tatsache

könnte auch die unterschiedlich hoch ausfallende Inzidenzrate in bestimmten Regionen, Ländern und Kontinenten erklären (Mancini et al., 2002). Die HNO-Klinik der Universität Erlangen-Nürnberg berichtete 1995 über eine Inzidenz von 2,9 % pro Jahr (Haid et al., 1995). Das Geschlechterverhältnis von Männern zu Frauen wird in der Literatur sehr unterschiedlich angegeben: es reicht bei Patienten mit Morbus Menière von 75 % zu 25 % (Sajjadi et al., 1998) über 60 % zu 40 % (Stahle et al., 1978) bis hin zu einem nahezu ausgeglichenen Verhältnis von 53 % zu 47 % (Morgenstern, 1985). Der Erkrankungsgipfel liegt zwischen dem 20. und 60. Lebensjahr (Paparella et al., 1991; Paparella, 1985 und 1994). Die Angaben über die Häufigkeit eines beidseitigen Morbus Menière variieren zwischen 12 % und 30 % (Haid et al., 1995; Kitahara, 1991).

Zu den wichtigsten Differentialdiagnosen der Menière'schen Krankheit zählt man unter anderem die Neuropathia vestibularis, Migraine cervicale, Lues, Apoplexia labyrinthi, Cupolithiasis, Encephalitis disseminata, Akustikusneurinom, Perilymphfistel, basiläre Impressionen und Medikamentennebenwirkungen (Morgenstern, 1994). Die Diagnose Morbus Menière ist eine Ausschlussdiagnose. Zur Diagnosesicherung werden verschiedene Verfahren angewandt. Durch die Elektrocochleographie können sich Hinweise für einen endolymphatischen Hydrops ergeben (Jahnke, 1994; Camilleri et al., 2001). Der Glyceroltest zur Diagnose eines endolymphatischen Hydrops wurde erstmalig 1966 von Klockhoff und Lindblom in der Diagnostik des Morbus Menière eingesetzt (Klockhoff und Lindblom, 1966). Bei negativem Ergebnis ist ein Morbus Menière jedoch nicht auszuschließen. Die Sensitivität des Tests wird in der Literatur mit bis zu 70% angegeben (Morgenstern, 1985 und 1994). Die direkte Darstellung eines endolymphatischen Hydrops kann heute klinisch experimentell mit hochauflösender Magnetresonanztomographie durchgeführt werden (Niyazov et al., 2001). Die Hirnstammaudiometrie (BERA) dient zur Abgrenzung einer cochleären von zentralen Läsionen, wie einem Akustikusneurinom oder einem Kleinhirnbrückenwinkel tumor (Costa et al., 2002).

Die Behandlung des Morbus Menière ist empirisch und stellt ein hochkontroverses Thema dar, da die Pathogenese weitgehend unbekannt ist. Auch gibt es bisher kein Therapieschema, das den Langzeitverlauf der Krankheit nachhaltig



beeinflussen kann (Thai-Van et al., 2001; Green und Saeed, 2002). Die medikamentöse Therapie behandelt die den Patienten am stärksten einschränken- den Symptome, insbesondere die rezidivierenden Schwindelattacken (Woodworth et al., 2000; Costa et al., 2002; Botrill et al., 2003). In der medika- mentösen Langzeittherapie werden Rheologika, wie Betahistin oder Pentoxifyllin sowie Diuretika eingesetzt (Jahnke, 1994; Thai-Van et al., 2001; Costa et al., 2002). Bei Verdacht eines akuten Hydrops haben sich Diure- tika, wie Thiazide, Furosemid, Acetazolamid, oder als Ergänzung, osmotisch wirkende Substanzen, wie Mannitol, bewährt (Jahnke, 1994; Thai-Van et al., 2001). Im anfallsfreien Intervall stehen Diuretika, vestibuläre Sedativa und ge- fäßwirksame Mittel zur Verfügung (Costa et al., 2002).

In der operativen Therapie wird zwischen funktionserhaltenden und destruie- renden Verfahren unterschieden (Helms, 1985; LaRouere, 1996; Woodworth et al., 2000). Zur Therapie des Morbus Menière beschrieb Portmann 1927 erst- mals die Saccotomie, die heute eine der am häufigsten gewählten operativen Vorgehensweisen darstellt (Portmann, 1927). Zur Entlastung des Saccus endolymphaticus existieren verschiedene Techniken. Anzuführen sind hier die Dekompression durch knöcherne Abtragung, die Saccotomie sowie der subarachnoidale Shunt (Helms, 1985 und 1996; LaRouere, 1996). Das Prinzip von Dekompressionsoperationen besteht darin, dass durch eine Mastoidektomie eine knöcherne Druckentlastung des Saccus endolymphaticus erreicht wird (Helms, 1985). Das Prinzip einer Saccotomie besteht in einem zu- sätzlichen äußeren „Shunt“ des Saccus endolymphaticus in das Mastoid (Helms, 1996). Beim Anlegen eines subarachnoidalen Shunts wird auf chirurgi- schem Weg eine Verbindung zwischen Endolymphe und dem subarachnoidalen Raum hergestellt. Diese Verbindung hat die Funktion einer Drainage, so dass die Endolymphe in den Subarachnoidalraum abfließen kann und somit der endolymphatische Hydrops beseitigt wird (Thai-Van et al., 2001). Dieses Ver- fahren wird jedoch kaum noch angewandt. Eine Placebo-Operation im Sinne einer Mastoidektomie konnte in einer Studie vergleichbare Erfolge zu einer Saccotomie erzielen (Thomsen et al., 1983). Destruierende Verfahren kommen zum Einsatz, wenn die Patienten weder auf eine medikamentöse noch auf eine

funktionserhaltende operative Therapie Besserung zeigen: Labyrinthektomie, transtemporale Neurektomie oder translabyrinthäre Neurektomie (Bottrill et al., 2003).

Eine weitere Behandlungsmethode für therapieresistenten starken Schwindel ist die Injektion von Gentamycin ins Ohr, eine sogenannte chemische Ablation. Fowler hat im Jahre 1948 die Applikation ins Mittelohr entwickelt, und Schuknecht injizierte das Aminoglykosid im Jahre 1957 erstmals ins Innenohr (Fowler, 1948; Schuknecht, 1957). Dabei zerstört Gentamycin die Funktion des Vestibularorgans im betroffenen Ohr und reduziert somit die Inzidenz von Schwindelanfällen. Als unerwünschte Nebenwirkung kann es zu Hörverlust bis hin zu Taubheit in dem betroffenen Ohr kommen (Sennaroglu et al., 2001). Lithium, ein Inhibitor der Adenylatzyklase, kann auch als Therapeutikum bei Morbus Menière eingesetzt werden (Lutz, 1974; Fukushima et al., 2005). Neuestes Therapieverfahren ist eine Druckpulsbehandlung über ein Paukenröhrchen. Die Grundlage der Wirksamkeit wird in einer Regulation des Endolymphvolumens unter Beteiligung des Sinus endolymphaticus gesehen (Thomsen et al., 2005; Plontke, 2007).

### 1.3 Der endolymphatische Hydrops

Viele der oben genannten Therapien sollen auf die Volumenzunahme im endolymphatischen System wirken, welche den endolymphatischen Hydrops als pathophysiologisches Korrelat des Morbus Menière darstellt. Hallpike und Cairns stellten besonders heraus, dass die postmortalen Felsenbeine der an Morbus Menière erkrankten Patienten keine weiteren pathologischen Befunde zeigten, die ursächlich für den Hydrops hätten sein können (Hallpike und Cairns, 1938). Dieser idiopathische Hydrops steht im Gegensatz zu den bereits zuvor bekannten Hydropsbefunden bei Labyrinthitis oder einem luetisch ausgelösten Hydrops (Schuknecht, 1993). In der Regel sind im häutigen Labyrinth der Ductus cochlearis und der Sacculus betroffen. Der Utriculus und die Bogengänge sind seltener einbezogen (Schuknecht, et al., 1986; Costa et al., 2002; Mancini et al., 2002). Im Frühstadium einer Menière'schen Krankheit betrifft der endolymphatische Hydrops hauptsächlich den Sacculus und den apikalen Teil

des Ductus cochlearis. Durch Progression des Hydrops wird später auch der basale Anteil des Ductus cochlearis einbezogen. Die Reissner-Membran wölbt sich im Zuge dessen in die Scala vestibuli vor. Die so erweiterte Scala media kann den gesamten Raum der Scala vestibuli einnehmen und sich sogar der knöchernen Wand des Labyrinths anlegen. In Felsenbeinpräparaten von Patienten, die primär über Schwindelattacken klagten, zeigten sich stets auch Ausweitungen des Sacculus. Teilweise steht die Wand des Sacculus in Kontakt mit der Fußplatte des Stapes. Hierbei können sich zwischen der Fußplatte und dem Sacculus fibrotische Züge ausbilden. Dies erklärt, dass bei etwa 30% aller Morbus Menière Patienten ein positives Hennebert'sches Zeichen auftritt (Morgensstern, 1983 und 1985). Unter dem Hennebert'schen Zeichen versteht man ein positives Fistelsymptom.

#### 1.4 Pathophysiologie des Morbus Menière

Der endolymphatische Hydrops soll bei Patienten mit Morbus Menière zu Rupturen des häutigen Labyrinths im Bereich des Helicotremas und des Sacculus führen (Lindsay et al., 1958; Schuknecht, 1981). Die Reissner-Membran, als Locus minoris resistentiae in diesem System, trennt Endolymph und Perilymphe. Nach einer Ruptur vermischt sich kaliumreiche Endolymph mit der Perilymphe und erreicht so die Sinneszellen. Die plötzlich erhöhte Kaliumkonzentration in der Perilymphe, und somit am basalen Pol der Sinneszellen des Corti'schen Organs, soll zu einer Depolarisation der Sinneszellen führen. Aufgrund der Lokalisation der Schädigung lassen sich der plötzliche Hörverlust, der Tinnitus, sowie die Schwindelattacken erklären (Lawrence und McCabe, 1959). Bei einem weiteren histopathologisch untersuchten Fall mit Endolymphhydrops waren die Rupturen ausschließlich auf die Cochlea beschränkt. Dieser Patient hatte nur klinische Symptome in Form von fluktuierendem Tieftonhörverlust und Tinnitus in Form eines tiefen Rauschens. Dies lässt sich durch die Ausweitung des Endolymphraums erklären, wodurch die Beziehung von Haarzellen und Tectorialmembran verzerrt wird (Lang, 1998). Dies ist vor allem im apikalen Bereich der Cochlea der Fall, wo die Basilarmembran weniger steif ist und sich deshalb stärker auslenken lässt. Im Tonschwellenaudiogramm drückt sich der

endolymphatische Hydrops zunächst als Tieftonhörverlust, in fortgeschrittenem Stadium als Hörverlust im tiefen und mittleren Frequenzbereich aus (Lehnhardt et al., 2001). Die typischerweise zur Trias des Morbus Menière gehörenden Schwindelerscheinungen fehlten hier, da das häutige Labyrinth im Bereich des Sacculus intakt war (Lindsay et al., 1958).

Im Tierversuch am Meerschweinchen wurde beobachtet, dass Rupturen der Reissner-Membran rasch verkleben können und innerhalb von 24 bis 72 Stunden heilen (Kimura, 1982). Eine wieder intakte Reissner-Membran erlaubt eine Wiederherstellung des Ionengradienten und erklärt so die Besserung der Symptome. Diese *Restitutio ad integrum* schafft jedoch auch eine erneute Ausgangssituation für das Wiederentstehen des Hydrops mit einer erneuten Ruptur der Reissner-Membran, was einen weiteren Anfall zur Folge haben kann (Hamann und Arnold, 1999).

Über die Entstehung des idiopathischen endolymphatischen Hydrops wurden verschiedene Hypothesen entwickelt. Einerseits wird eine übermäßige Endolymphproduktion durch die Stria vascularis angenommen (Kitano et al., 1997), andererseits eine verminderte Endolymphresorption durch den Saccus endolymphaticus (Kimura und Schuknecht, 1965; Lundquist, 1965). Eine Bedeutung des Saccus endolymphaticus für die Physiologie des Innenohres postulierte Portmann 1921 als erster aufgrund seiner Experimente an Fischen. Er erkannte Gleichgewichtsstörungen bei diesen Tieren nach der Obstruktion eines kleinen Kanals zwischen dem Saccus endolymphaticus und der Umgebung, dem Seewasser (Portmann, 1921).

Guild wies 1927 einen Farbstoff im Saccus endolymphaticus nach, welchen er zuvor in den Endolymphraum der Cochlea injiziert hatte, und entwickelte so die Theorie des longitudinalen Endolymphflusses in Richtung des Saccus endolymphaticus (Guild, 1927). Der Endolymphraum, als Mittelpunkt des Interesses der Morbus Menière Forschung, ist beim Menschen schwer zugänglich und bisher nur postmortal genau zu untersuchen. Deshalb versuchte man Tiermodelle für den endolymphatischen Hydrops zu entwickeln.

### 1.5 Modelle des endolymphatischen Hydrops

Basierend auf den oben genannten Ergebnissen, gelang es Naito 1959 erstmals beim Säuger, am Modell des Meerschweinchens, durch chirurgische Obliteration des Saccus endolymphaticus einen endolymphatischen Hydrops zu erzeugen (Naito, 1959). Als Modell für die Ruptur der Reissner-Membran injizierte man kaliumreiche Flüssigkeit in den Perilymphraum und wies so die neurotoxische Wirkung der kaliumreichen Endolymph auf die Sinneszellen nach (Dohmann und Johnsen, 1959). Hierdurch lassen sich jedoch nur die Symptome Hörverlust und Schwindel erklären.

Das am weitesten verbreitete Tiermodell zur Erzeugung eines endolymphatischen Hydrops war weiterhin die chirurgische Obliteration des Ductus und Saccus endolymphaticus beim Meerschweinchen (Kimura und Schuknecht, 1965; Kimura, 1982). Rupturen des Endolymphepithels nach Induktion des Hydrops konnten im Experiment jedoch nicht beobachtet werden. Rezidivierende Schwindelattacken waren im Tiermodell ebenfalls nicht nachweisbar (Kimura, 1982). Damit stellt die Obstruktion des Ductus und Saccus endolymphaticus zwar ein Modell für den endolymphatischen Hydrops, nicht jedoch für den Morbus Menière dar. Darüber hinaus ist die Methode invasiv und entspricht damit nicht einem idiopathischen Hydrops.

Ein pharmakologisches Modell für den akuten endolymphatischen Hydrops ist die lokale Applikation (Injektion) von Cholera-toxin in den endolymphatischen Raum (Feldmann und Brusilow, 1975) oder in den perilymphatischen Raum (Lohuis et al., 1999). Die Wirkung des Cholera-toxins in der Stria vascularis wurde bislang über eine G-Protein-vermittelte Stimulation von Adenylatcyclasekomplexen erklärt (Koch und Zenner, 1988). Dieses Tiermodell ist weniger invasiv, doch auch hier sind die Symptome des Morbus Menière nicht in der typischen Form darzustellen. Somit musste nach weiteren Faktoren gesucht werden, die im Zusammenhang mit dem Auftreten einer Morbus Menière Attacke stehen und Aufschluss über die pathophysiologischen Zusammenhänge geben können. Klinisch konnte eine Korrelation zwischen einer Erhöhung des Plasmaspiegels für ADH und Innenohrerkrankungen, die mit einem idiopathischen Hydrops einhergehen, festgestellt werden (Takeda et al., 1995). Im Tierexperiment

wurde gezeigt, dass sowohl durch eine akute (Kumagami et al., 1998) als auch durch eine chronische systemische Applikation von ADH ein endolymphatischer Hydrops induziert werden kann (Kumagami et al., 1998; Takeda et al., 2000). Wie bei der Choleratoxinwirkung wurde eine durch die Adenylatzyklase vermittelte Wirkung durch das ADH in der Stria vascularis vermutet (Zenner und Zenner, 1979). Die Plasmaspiegel der im Tiermodell applizierten Höchstmenge des ADH entsprachen den erhöhten Werten, die bei Patienten mit Morbus Menière gemessen werden konnten (Takeda et al., 2000). Dieses neue Tiermodell des endolymphatischen Hydrops ist nicht invasiv und kommt somit dem idiopathischen Hydrops bisher am nächsten. Wenn die ADH-Wirkung auf das Innenohr keinen sekundären Effekt, sondern einen direkten Wirkungsmechanismus darstellt, kann im Innenohr ein ADH-abhängiges Volumenregulationssystem existieren.

#### 1.6 ADH-abhängiges Volumenregulationssystem

Das Peptidhormon ADH inhibiert in der Niere die Diurese. Es koppelt dort an den V2-Rezeptor und bewirkt über Zwischenschritte die Translokation des AQP-2 aus intrazellulären Vesikeln in die Plasmamembran von Sammelrohrzellen (Nielsen et al., 1995; Marples et al., 1999). Aus dem klinisch und tierexperimentell beobachteten Zusammenhang zwischen einer Erhöhung des ADH-Plasmaspiegels und dem Auftreten eines endolymphatischen Hydrops liegt es nahe, ein dem der Niere ähnliches Volumenregulationssystem für das endolymphatische System des Innenohres zu postulieren. Zunächst vermutete man, dass erhöhte Plasmaspiegel für ADH über eine V2-Rezeptor vermittelte Überproduktion von Endolymph in der Stria vascularis die Entstehung des endolymphatischen Hydrops bedingen (Kitano, 1997). Eine vom ADH und auch vom Choleratoxin abhängige Stimulation der Adenylatzyklase konnte in der Stria vascularis nachgewiesen werden (Zenner und Zenner, 1979; Koch und Zenner, 1988). Der Wasserkanal AQP-2 konnte weder mittels Immunzytochemie noch mittels in-situ-Hybridisierung im Innenohr, einschließlich der Stria vascularis, nachgewiesen werden (Takumi et al., 1998). Neuere Ergebnisse zeigen jedoch eine Expression von AQP-2 in der Cochlea, sowohl

auf mRNA-Ebene mittels RT-PCR als auch auf Proteinebene im Western Blot und in der Immunhistochemie (Mhatre et al., 2002). Der Saccus endolymphaticus war in die bisher dargestellten Untersuchungen oft nicht einbezogen, da er sich anatomisch außerhalb des Labyrinths befindet und eine spezielle Präparationstechnik erfordert. In einer fraktionierten Präparation von Innenohrgewebe, welche den Saccus endolymphaticus berücksichtigte, konnte der V2-Rezeptor mittels RT-PCR nachgewiesen und im Saccus endolymphaticus lokalisiert werden (Kumagami et al., 1998). Andere Fraktionen des Innenohres zeigten nur eine geringe Expression des V2-Rezeptors. Auch die Bindung von  $^{125}\text{I}$ -markiertem ADH in Präparaten des humanen Saccus endolymphaticus konnte mittels Autoradiographie nachgewiesen werden. Als weiteres Glied in der Regulationskette konnte, ebenfalls mittels RT-PCR, das AQP-2 im Saccus endolymphaticus lokalisiert werden (Kumagami et al., 1998). Eine andere Studie konnte den AQP-2-Nachweis auf mRNA-Ebene mittels RT-PCR im Saccus endolymphaticus bestätigen (Beitz et al., 1999). Einer weiteren Arbeitsgruppe gelang der Nachweis in der Cochlea, jedoch nicht im Saccus endolymphaticus (Fukushima et al., 2002). Es konnte auch nachgewiesen werden, dass, analog zur Niere, eine Vasopressinapplikation zu erhöhter Expression von AQP-2 mRNA im Saccus endolymphaticus der Ratte und in der Cochlea führt (Terashima et al., 1998; Sawada et al., 2002). Ebenfalls einen Zusammenhang zwischen der ADH-Applikation und dem Anstieg der AQP-2 mRNA in der Cochlea konnte eine andere Arbeitsgruppe nachweisen (Gu et al., 2006).

## 1.7 Theoretische Grundlagen

### 1.7.1 Anatomie des Ductus und Saccus endolymphaticus der Ratte

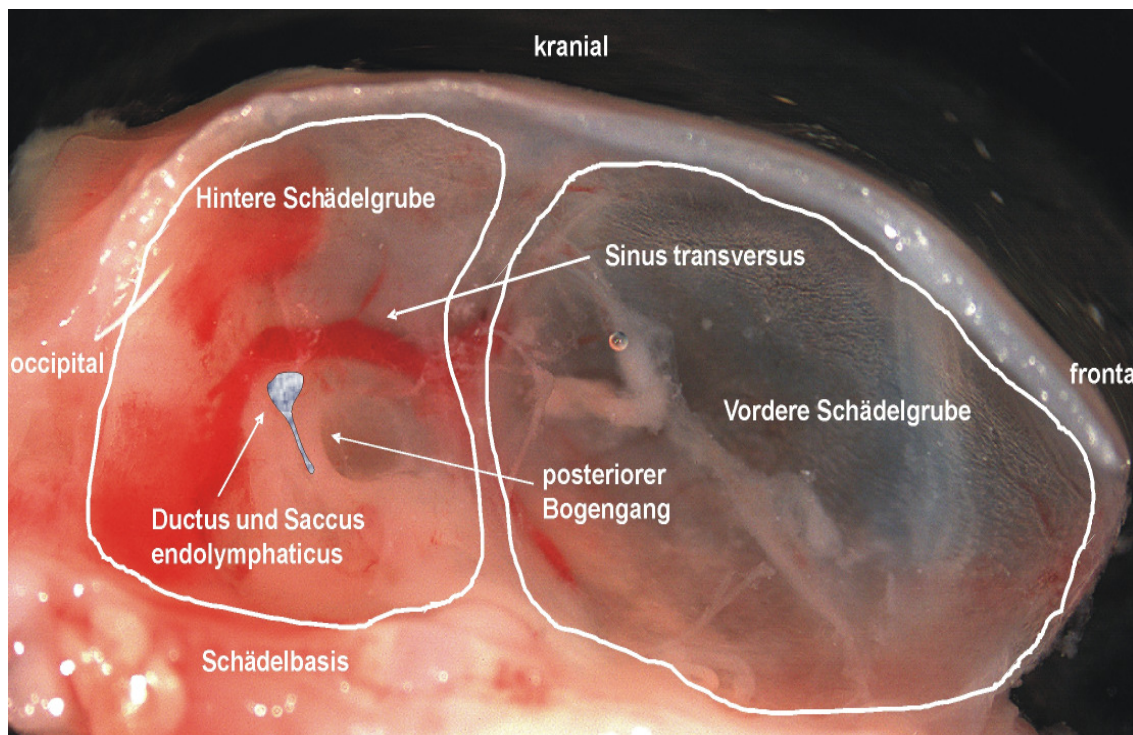
Ductus und Saccus endolymphaticus stellen einen blind endenden Ausläufer des mit kaliumreicher Endolymphflüssigkeit gefüllten Endolymphsystems des Innenohres dar. Sie liegen subdural im Bereich der hinteren Schädelgrube. Der Ductus endolymphaticus entsteht aus der Vereinigung von Ductus sacculus und Ductus utricularis. Er ist im Bereich des Vestibulums noch relativ weitelumig und verengt sich bei seinem Eintritt in den knöchernen Aquaeductus vestibuli. Die Gesamt-

länge des Ductus endolymphaticus beträgt bei der adulten Ratte ca. 1,5 mm. Er wird in einen weitleumigen Anfangsteil, einen engen Mittelabschnitt und einen sich weitenden Übergangsteil zum Saccus endolymphaticus hin unterteilt (Dahlmann und von Düring, 1995).

Der Saccus endolymphaticus liegt caudal des Meatus acusticus internus und in unmittelbarer Nachbarschaft des Canalis semicircularis posterior auf dem Sinus transversus. Er wird in einen proximalen, einen intermediären und in einen distalen Teil untergliedert. Diese Nomenklatur geht auf Guild zurück, der sie beim Saccus endolymphaticus des Meerschweinchens festgelegt hat (Guild, 1927). Der distale Teil ist gegenüber dem proximalen Teil um 95° abgewinkelt. Die Gesamtlänge des Saccus endolymphaticus beträgt bei der adulten Ratte ca. 1,7 mm. Der überwiegende Anteil des proximalen Teils liegt intraossär. Nach Verlassen des knöchernen Kanals verläuft der proximale Teil in einer knöchernen Rinne. Die andere Seite dieses Teils zeigt zum Subarachnoidalraum und wird teilweise von einem Knochensporn, dem Operculum, überragt. Der sich anschließende intermediäre Teil liegt extraossär in einer Duraduplikatur. Hierbei liegt die eine Seite dem Sinus transversus zugewandt und die andere Seite in Richtung des angrenzenden Subarachnoidalraums. Der distale Teil des Saccus endolymphaticus ist meist kollabiert. Zwischen den beiden letztgenannten Teilen und dem Sinus transversus spannt sich ein Netz aus elastischen Fasern.

Das Kapillarnetz des Ductus und Saccus endolymphaticus wird aus der Arteria labyrinthi, der Arteria meningea posterior und einem Ast der Arteria cerebellaris inferior anterior oder posterior versorgt. Der enge Mittelteil ist im Verhältnis zu den anderen beiden Teilen des Ductus endolymphaticus mit einem erheblich reduzierten Kapillarnetz ausgestattet. Der proximale und der intermediäre Teil des Saccus endolymphaticus weisen sinusnah und arachnoideanah ein reiches Kapillarnetz auf. Der distale Teil ist auf der arachnoideanahen Seite gut mit Kapillaren versorgt, auf der sinusnahen Seite finden sich nur 1 bis 2 Kapillaren. Im Epithel des Ductus und Saccus endolymphaticus finden sich Ribosomenreiche Zellen (RRZ) sowie Mitochondrienreiche Zellen (MRZ). Im intermediären Abschnitt des Saccus endolymphaticus zeigen sich besonders viele der Mitochondrienreichen Zellen (Dahlmann und von Düring, 1995).





**Abbildung 1:** Anatomie und Lagebeziehungen des Ductus und Saccus endolymphaticus der vier Tage alten Ratte. Der Schädel wurde sagittal halbiert und das Gehirn entfernt. Die Abbildung zeigt die Ansicht der linken Schädelhälfte von innen. In der hinteren Schädelgrube liegt der Ductus und Saccus endolymphaticus (in der Abbildung schematisch hervorgehoben) auf dem Sinus transversus. Der Ductus endolymphaticus liegt in einem Kanal im Schädelknochen. Der Saccus endolymphaticus ist in eine Duraduplikatur eingebettet. Parallel zum Ductus endolymphaticus findet sich der posteriore Bogengang. Originalgröße der abgebildeten Schädelhälfte ca. 2 x 1 cm.

### 1.7.2 Vasopressin-Rezeptoren

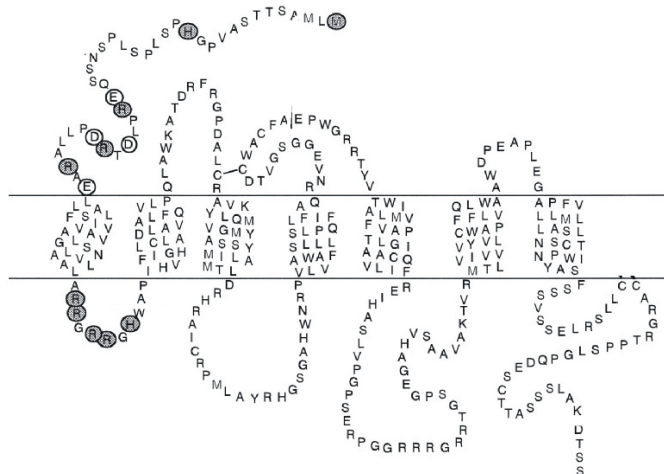
Vasopressin-Rezeptoren gehören zur Familie 1 der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (Abbildung 2). Typisch für diese Rezeptorfamilie sind sieben hydrophobe transmembranäre  $\alpha$ -Helizes. Abwechselnd intra- und extrazelluläre Schleifen verbinden diese transmembranären Domänen. Außerdem besitzen die Rezeptoren eine extrazelluläre N-terminale Domäne und eine zytoplasmatische C-terminale Domäne.

Der V2-Rezeptor wurde im Nierenmark, und dort in der basolateralen Membran der Hauptzellen des Sammelrohres, lokalisiert (Nonoguchi et al., 1995). Der V2-Rezeptor der Ratte ist ein integrales Membranprotein, bestehend aus 371 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 40748 Da. Die glykosilierte Form des

V2-Rezeptors weist ein Molekulargewicht von 62 kDa auf (Nonoguchi et al., 1995).

Der V1a-Rezeptor wurde in glatten Muskelzellen von Gefäßen, Hepatozyten, Blutplättchen, Lymphozyten, Monozyten, Typ II-Pneumozyten, von Nebennierenrinde, von Gehirn, Reproduktionsorganen und Mesangiumzellen der Niere (Briner et al., 1992; Ostrowski et al., 1993; Thibonnier et al., 1994), im dicken aufsteigenden Ast der Henle Schleife, und in den Haupt- und Nebenzellen des Sammelrohres der Niere nachgewiesen (Tashima et al., 2001). Der V1a-Rezeptor der Ratte ist ein integrales Membranprotein. Er besteht aus 424 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 47510 Da.

Der V1b-Rezeptor der Ratte wurde in großer Anzahl in der Hypophyse nachgewiesen, vor allem im Hypophysenvorderlappen. In peripheren Geweben findet er sich im Gehirn, in der Niere, im Thymus, im Herz, in der Lunge, in der Milz und dem Uterus (Lolait et al., 1995; Saito et al., 1995). Außerdem wurde der V1b-Rezeptor im Nebennierenmark nachgewiesen (Grazzini et al., 1996). Der V1b-Rezeptor der Ratte ist ein integrales Membranprotein. Er besteht aus 421 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 47085 Da.

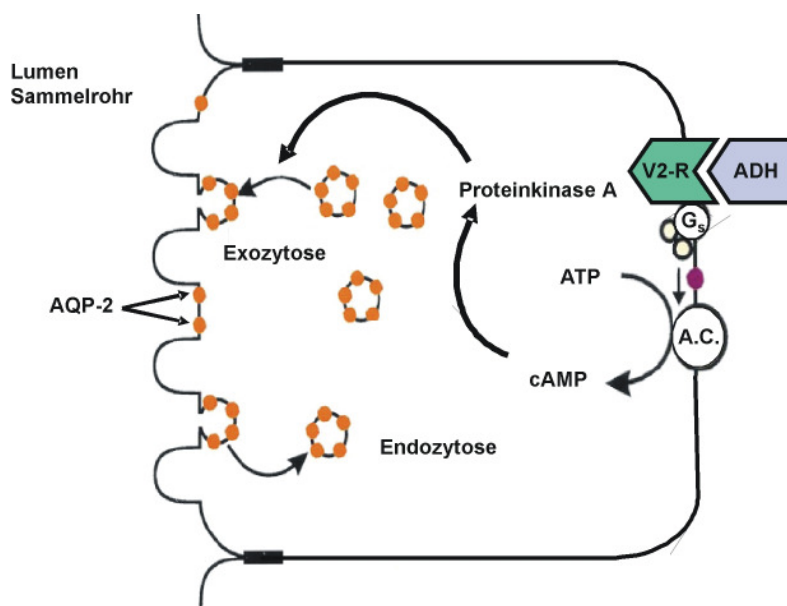


**Abbildung 2:** Schematische Darstellung eines Rezeptors der Familie 1. Gezeigt sind sieben hydrophobe transmembranäre  $\alpha$ -Helizes, welche abwechselnd über intra- und extrazelluläre Schleifen verbunden sind. Schema modifiziert nach Schülein et al., 1996. Hormonrezeptorproteine an Zelloberflächen haben eine hohe Bindungsaffinität für ein spezifisches Hormon. Wenn dieses Hormon an den Rezeptor gebunden hat, löst der Rezeptor-Hormon-Komplex eine Kaskade von Reaktionen aus, die die Funktionen der Zelle regulieren.

### 1.7.3 Antidiuretisches Hormon

ADH ist ein 9 Aminosäuren langes, zyklisches Peptidhormon, welches im Hypothalamus gebildet wird. Über die Neurosekretion der Hypophyse gelangt es in den Blutkreislauf. Zu den Wirkungen gehören die Inhibition der Diurese, die Kontraktion glatter Muskulatur, die Stimulation der Glykogenolyse in der Leber, die Modulation der Insulinsekretion, die Regulation der Hodenfunktion und die Modulation der adrenocorticotropen Hormonausschüttung aus der Hypophyse. Die ADH-vermittelte Wirkung auf V2-Rezeptoren resultiert in einer Aktivierung des Adenylatcyclasekomplexes und der Erhöhung des intrazellulären cAMP (Lolait et al., 1992). Die ADH-Wirkung auf die Rezeptorsubtypen V1a und V1b resultiert in einer Hydrolyse von Phosphatidylinositol und der Freisetzung intrazellulären Calciums (Morel et al., 1992; Jard, 1998).

In der Niere existiert ein ADH-vermitteltes Wasserregulationssystem, das die Wasserrückresorption im Sammelrohr über Aquaporine steuert. Abbildung 3 verdeutlicht die Bindung von ADH an den V2-Rezeptor in der basolateralen Membran der Hauptzelle des Sammelrohrs der Niere. An den Rezeptor ist ein heterotrimeres G-Protein (Gs) gekoppelt. Dieses stimuliert die in der Membran benachbarte Adenylatcyclase (AC). Diese verwandelt zytosolisches Adenosintriphosphat (ATP) in cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP), welches als second messenger fungiert. Der Anstieg der cAMP-Konzentration aktiviert die Protein Kinase A (PKA). Diese ist in der Lage verschiedene Proteine zu phosphorylieren (Marples et al., 1999). AQP-2 liegt in den Hauptzellen des Sammelrohres der Niere in intrazellulären Membranvesikeln vor. AQP-2 wird durch die PKA an Ser256 phosphoryliert und in die apikale, nach luminal gerichtete Membran eingebaut (Fushimi et al., 1997). ADH führt so zu einer etwa zehnfach erhöhten Wasserpermeabilität des renalen Sammelrohres. Der Effekt ist bei sinkendem ADH-Spiegel reversibel, indem AQP-2 wieder in die intrazellulären Vesikel transloziert (Nielsen et al., 1995). Eine längerdauernde Einwirkung von ADH vermittelt, über eine cAMP-abhängige Erhöhung der Transkription, einen Anstieg der absoluten Zahl von AQP-2 (Di Giovanni et al., 1994; Marples et al., 1999).



**Abbildung 3:** V2-Rezeptor Regulationskaskade. ADH bindet an den V2-Rezeptor. An den Rezeptor ist ein heterotrimeres G-Protein ( $G_s$ ) gekoppelt. Dieses stimuliert die in der Membran benachbarte Adenylatcyclase (AC). Diese verwandelt zytosolisches ATP in cAMP, welches als second messenger fungiert. Der Anstieg der cAMP-Konzentration aktiviert die Proteinkinase A (PKA). Diese ist in der Lage, verschiedene Proteine zu phosphorylieren (Marples et al., 1999). AQP-2 liegt in intrazellulären Membranvesikeln vor. AQP2 wird durch die PKA phosphoryliert und in die apikale, nach luminal gerichtete Membran eingebaut (Fushimi et al., 1997). Schema modifiziert nach Marples et al., 1999.

Die Vasopressin-Rezeptoren V1a und V1b vermitteln unterschiedliche Wirkungen bei gleichem Regulationsweg in der Zelle. V1a ist ein weit verbreiteter Rezeptor und an vielen Wirkungen des ADH beteiligt, mit Ausnahme der ACTH-Sekretion (V1b). ADH bindet an die Rezeptoren und aktiviert die Phospholipase C (PLC), welche Phosphatidylinositol-4,5-diphosphat ( $PIP_2$ ) hydrolysiert, was zur Produktion von Inositol-1,4,5-triphosphat ( $IP_3$ ) und Diacylglycerol (DAG) führt.  $IP_3$  führt zur Freisetzung von  $Ca^{2+}$ . DAG aktiviert die Proteinkinase C (PKC), die  $Ca^{2+}$ -Kanäle anspricht und die DNA-Synthese beeinflussen kann (Thibonnier et al., 2000).

### 1.8 Zielsetzung der Arbeit

Durch seine charakteristischen Symptome beeinträchtigt der Morbus Menière die Lebensqualität der Betroffenen nachhaltig und in vielfältiger Weise. Nach oft erfolglosen konservativ-medikamentösen Maßnahmen verbleibt häufig nur eine Gentamicinapplikation oder die chirurgische Intervention. Ziel der Wissenschaft muss es sein, nachdem die Erkrankung Morbus Menière seit fast 150 Jahren bekannt ist, ihre Ursache zu ergründen.

Der Saccus und Ductus endolymphaticus wurde bisher nicht ausreichend isoliert betrachtet. Im Rahmen dieser Arbeit soll das Verfahren zur Präparation und Konservierung des Saccus und Ductus endolymphaticus weiterentwickelt und verbessert werden. Der V2-Rezeptor im Saccus und Ductus endolymphaticus, im Tiermodell Ratte, soll nachgewiesen werden, um einen entscheidenden Baustein des beschriebenen ADH-gesteuerten Volumenregulationssystems zu sichern. Der experimentelle Nachweis mittels Immunhistochemie ist der erste Schritt hierzu.

Anschließend soll mit Hilfe des Immunoblots die Existenz des Proteins im Gewebe des Saccus und Ductus endolymphaticus bestätigt werden. ADH greift auch an den V1a- und V1b-Rezeptoren an und könnte so über einen Feedback-Mechanismus am Volumenregulationsprozess beteiligt sein. Somit wurden auch diese beiden Rezeptoren in die Untersuchungen am Gewebe des Saccus und Ductus endolymphaticus mittels Immunhistochemie mit einbezogen. Eine kausale und nachhaltige Therapie kann nur durch gesicherte Grundlagen in der Kenntnis der Entstehung der Erkrankung gefunden werden.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Immunhistochemischer Nachweis der Vasopressinrezeptoren

#### 2.1.1 Mikrochirurgisches Präparations- und Fixierverfahren

##### 2.1.1.1 Material

###### Geräte und Hilfsstoffe

Schere – grobzählig	Aesculap, Tuttlingen
Schere – fein	Aesculap, Tuttlingen
Skalpell	Aesculap, Tuttlingen
Pinzette – grob	Aesculap, Tuttlingen
Pinzette – fein	Aesculap, Tuttlingen
Stahlspitzen	selbst hergestellt
Bleistifthalter für Stahlspitzen	Biograph Super 0.3 T
House-Löffel	Karl Storz, Tuttlingen
Pasteurpipette – Glas	John Poulten, St. Barking, UK
24-well-Gewebekulturplatten	cellstar, Greiner, Frickenhausen
Stereolupe (Stemi 2000)	Zeiss, Halbergmoos
Kaltlichtquelle	Zeiss, Halbergmoos
Novotron Inkubationsschüttler HAT	Infors, Bottmingen, Schweiz

###### Lösungen

###### PBS (Phosphate Buffered Saline) Pufferlösung

PBS –Tabletten GIBCO BRL, Paisley, Schottland  
Der pH-Wert wurde mit HCL oder NaOH auf  $7,4 \pm 0,05$  eingestellt. Die Endkonzentrationen, laut Angabe des Herstellers, lag bei 0,14 M NaCl, 0,01 M Phosphat und 3 mM KCl.

###### PFA (Paraformaldehyd) - Fixierlösung (4%) Merck, Darmstadt

40 g PFA

20 g NaOH-Plätzchen

100 ml Lösung 1

10 ml Lösung 2 und Lösung 3

Der pH-Wert wurde unter dem Abzug mit HCl oder NaOH auf  $7,4 \pm 0,05$  eingestellt. Das Gesamtvolumen wurde mit Aqua destillata auf 1 Liter aufgefüllt.

Lösung 1	8 g NaCl
	0,4 g KCl
	1 g Glucose
	23,83 g HEPES in 100ml Aqua destillata
Lösung 2	1,47 g $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ in 100 ml Aqua destillata
Lösung 3	2,03 g $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ in 100 ml Aqua destillata

#### 2.1.1.2 Methode

Eine Anzeige beim Regierungspräsidium Tübingen zur Organentnahme lag vor. Die Entnahme des Ductus und Saccus endolymphaticus, von Sammelrohren der Niere, von Nierenkortex und von Nebennierengewebe erfolgte aus vier Tage alten Ratten (postnatal Tag 4) des Stammes Wistar. Für die vorliegende Arbeit wurden insgesamt ca. 600 Stück Saccus und Ductus endolymphaticus entnommen. Die Präparation fand jeweils vormittags innerhalb einer Stunde nach Entnahme aus dem Käfig statt. Die Ratten wurden bei einer Raumtemperatur von 22°C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50 % und einem 12-stündigen Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten. Die Tiere erhielten Nagerfutter und Wasser ad libitum.

Die Ratten wurden durch Dekapitation getötet. Anschließend wurde mit einer feinen Schere die Kopfhaut sagittal durchtrennt und nach lateral abpräpariert. Die Schädelkalotte wurde ebenfalls sagittal durchtrennt und der Gesichtsschädel mit dem Skalpell vom Neurokranium abgetrennt. Nach Entfernung des Hirngewebes aus den beiden Schädelhälften wurde die Dura kranial des Sinus transversus mittels einer feinen Pinzette vorsichtig eröffnet, um später die Penetration des Fixativs durch die Dura zu erleichtern. Für die Perfusionsfixierung wurde zunächst die Cochlea freipräpariert und mit einer feinen Pinzette am Helicotrema ein kleiner Knochendeckel entfernt, um so das häutige Labyrinth zu eröffnen. Rundes Fenster und ovales Fenster wurden ebenso freipräpariert und eröffnet.

Aus dem ovalen Fenster wurde der Stapes mit der Pinzette entfernt, um eine ungehinderte Perfusion der Cochlea zu ermöglichen. Diese Präparationsschritte erfolgten unter dem Mikroskop, während das Präparat in eisgekühltem PBS lag, um den Gewebeerhalt bestmöglich zu sichern. Für die nachfolgenden Schritte wurde das Präparat in Gewebekulturplatten mit 4 % PFA-Fixierlösung umgesetzt. Um den zwischen den Durablättern liegenden Ductus und Saccus endolymphaticus ausreichend zu fixieren, wurde PFA-Fixierlösung durch das runde sowie das ovale Fenster in das häutige Labyrinth eingespült. Zur Spülung wurde eine speziell angefertigte Pasteurpipette verwendet. Der Spülvorgang wurde so lange fortgesetzt, bis an der Öffnung am Apex der Cochlea die PFA-Fixierlösung austrat. Dies konnte man am Sistieren der Schlierenbildung in diesem Bereich erkennen. Auf die Stelle, an welcher vorher die Dura eröffnet worden war, wurde ebenfalls noch PFA-Fixierlösung mit der Pipette aufgespült, um die Fixierung des Ductus und Saccus endolymphaticus sicherzustellen.

Der Perfusionsfixierung folgte eine Immersionsfixierung mit 4 % PFA-Fixierlösung für eine Stunde. Im Anschluss daran erfolgte die Feinpräparation des fixierten Ductus und Saccus endolymphaticus in eisgekühlter PBS-Lösung. Die Schädelhälfte wurde mit einer groben Pinzette stabil fixiert. Mit einer feinen Pinzette und der eigens hierfür angefertigten dünnen Stahlspitze in einem Bleistifthalter wurden die dichten und vielzähligen Durafasern um den Ductus und Saccus endolymphaticus vorsichtig entfernt. Dieser Präparationsschritt stellte den entscheidenden und schwierigsten Abschnitt der eigens für dieses Projekt entwickelten Präparationstechnik dar. Erstmals wurden Saccus und Ductus endolymphaticus von vier Tage alten Ratten für immunhistochemische Färbungen als Gesamtpräparat gewonnen. Aufgrund des äußerst fragilen Gewebes resultierten viele Gewebeschäden während der Präparation, und somit waren etliche Präparate nicht für die Anfertigung einer Übersichtsdarstellung geeignet. Das Übertragen in Gewebekulturplatten zur anschließenden Färbung erfolgte atraumatisch mit einem House-Löffel. Aus denselben Tieren wurde auch Nieren- und Nebennierengewebe entnommen. Diese Präparate dienten als Positivkontrolle. Dorsal wurde die Haut des Tieres paravertebral auf Nierenhöhe mit dem Skalpell eröffnet und die beiden Nieren aus dem Nierenlager herausgelöst. Die Or-



gane wurden längs median geteilt und anschließend für eine Stunde in die 4 % PFA-Fixierlösung zur Immersionsfixierung gegeben. Ebenso wurde mit der Nebenniere verfahren. Nach der einstündigen Fixierung wurden die Präparate in PBS weiterverarbeitet. Die Feinpräparation der Niere bestand im Herauslösen des Sammelrohrbereiches unterhalb des Cortex. Hierbei wurde besonders darauf geachtet, mit zwei Pinzetten die Sammelrohrbündel möglichst fein zu zerteilen. Der Nierenkortex wurde mit einer Pinzette in kleinere Stücke zerteilt. Die Nebennieren wurden mit dem Skalpell längs halbiert. Die Präparate wurden mit dem House-Löffel in Gewebekulturplatten übertragen.

## 2.1.2 Immunhistochemisches Färbeverfahren

### 2.1.2.1 Material

#### Geräte und Hilfsstoffe

Zentrifuge (Biofuge pico)	Heraeus Instruments, Hanau
Objekträger, Deckgläschen	Langenbrinck, Emmerdingen
BD Cell Tak™ - Tissue Adhesive	BD Bioscienc., Bedford, USA
FluorSave™ Reagent	Calbiochem, San Diego, USA
ImmunoPen™	Calbiochem, San Diego, USA
Fluoreszenzlichtmikroskop - Axioplan2 imaging	Zeiss, Halbergmoos
Kamera - AxioCam HRm	Zeiss, Halbergmoos
Auswertungssoftware – Axio Vision	Zeiss, Halbergmoos

#### Lösungen

##### Spülpuffer

0,5 % Triton X-100 in PBS	Jackson, West Grove, USA
Präinkubationslösung	
4 % Ziege-Normal-Serum in PBS	Jackson, West Grove, USA

##### Reaktionspuffer

2 % NaCl und 1 % Ziege-Normal-Serum in PBS	Jackson, West Grove, USA
--	--------------------------

DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindol, dihydrochlorid)

0,1 g DAPI / ml in PBS

MoBiTec, Göttingen

DAPI ist ein Fluoreszenzfarbstoff zur Kerngegenfärbung mit einem Absorptionsmaximum bei 359 nm und einer Emission bei 461. Es entsteht ein blauer Farbeindruck.

Die verwendeten Primär- und Sekundärantikörper sind unter 2.3 beschrieben.

#### 2.1.2.2 Methode

Nach Abschluss der einstündigen Immersionsfixierung in 4 % PFA-Lösung folgten zwei 15 minütige Waschschrte in PBS. Anschließend wurden die Präparate in Spülpuffer gespült. Im nächsten Schritt wurden die Präparate mit jeweils 500 µl Präinkubationslösung für 80 min inkubiert. Dies diente dazu, der unspezifischen Bindung des Antikörpers im folgenden Inkubationsschritt vorzubeugen. Mit der angegebenen Endkonzentration wurden die jeweiligen Antikörper in 500 µl Reaktionspuffer auf die Präparate gegeben und über Nacht bei 2-8°C inkubiert. Alle übrigen Wasch- und Inkubationsschritte fanden bei Raumtemperatur auf dem Inkubationsschüttler statt. Am folgenden Vormittag wurden die Präparate mit PBS gespült und gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen.

Der Sekundärantikörper wurde in der angegebenen Endkonzentration in 500 µl Reaktionspuffer für 2-3 min bei 1300 rpm zentrifugiert. Nur der Überstand wurde weiterverwendet. Dieser Schritt sollte Proteinaggregate, die sich bei der Lagerung gebildet haben könnten, entfernen und somit unspezifische Hintergrundmarkierungen im fertigen Präparat reduzieren. Sofort nach dem Aufbringen des fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpers wurde die Gewebekulturplatte lichtdicht abgedeckt, um ein Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffes zu verhindern. Nach 60 min Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden die Präparate mit PBS gespült und dreimal 30 min in PBS gewaschen, um ungebundene Sekundärantikörper zu entfernen.

Um das Lageverhältnis der ADH-Rezeptoren zum Kern erkennen zu können, wurde dieser im folgenden Schritt mit DAPI-Lösung in oben angegebener Kon-

zentration gefärbt. Pro Well wurden 500 µl der Lösung verwendet und für 5 min inkubiert. Anschließend wurde wieder mit PBS gewaschen. Für die folgende Auswertung der Präparate mussten diese auf Glasobjektträgern fixiert werden. Hierzu wurde Cell tak, ein spezieller organischer Kleber, verwendet. „Cell tak – Tissue Adhesive“ ist eine Lösung, die polyphenolische Proteine enthält, die aus der Miesmuschel (*Mytilus edulis*) extrahiert wurden. Diese Proteine sind der Hauptbestandteil des Klebers, welchen die Muschel sezerniert, um sich auf festen Strukturen zu verankern. Cell tak lässt Gewebepräparate auf Glasobjektträgern besser haften. Cell tak wurde 1:5 in PBS gelöst. Pro Objektträger wurde ein Tropfen dieser Lösung mittig aufgetragen. Die Trocknung erfolgte bei Raumtemperatur. Mit ImmunoPen wurde um Cell tak eine kreisförmige Markierung auf den Objektträger aufgebracht, einerseits als hydrophobe Barriere, andererseits als Schutz vor Schmutz und Verunreinigungen. Über Cell tak wurde ein Tropfen FluorSave gegeben, in welchen das Präparat mit einem House-Löffel überführt wurde. Die FluorSave-Lösung härtet nach einigen Stunden aus. Die mit einem Deckglas versehenen Präparate wurden weiterhin dunkel bei 4°C aufbewahrt, um die Fluoreszenzmarkierung möglichst lange zu erhalten.

Die Darstellung der Oberflächenstruktur der Präparate erfolgte in der Differential-Interferenz-Kontrastierung, auch Normarskikontrastierung genannt. Die Fluoreszenzproteindarstellung erfolgte mittels immunhistochemischer Fluoreszenzmarkierung mit dem Fluorophor Alexa 488. Der Fluoreszenzfarbstoff 4',6-diamidino-2-phenylindol,dihydrochlorid wurde zur Fluoreszenzzellkerngegenfärbung verwendet.

Die Auswertung der Präparate erfolgte mit Hilfe der Epifluoreszenzmikroskopie am Axioplan2 imaging-Mikroskop mit der Kamera AxioCam HRm. Hierzu wurde für die Übersichtsaufnahmen ein Achromat-Objektiv mit einer numerischen Apertur von 0,15 und einer fünffachen Vergrößerung verwendet. Die zusammengesetzten Bilder wurden mit einem Plan-Neofluar-Objektiv mit einer numerischen Apertur von 0,9 und 25facher Vergrößerung erstellt. Die Detaildarstellungen der whole-mount-Präparate wurden mit einem Plan-Achromat-Objektiv mit 1,3 numerischer Apertur und einer 63fachen Vergrößerung aufgenommen. Die Bildaquisition erfolgte mit der Axiovision-Software im zvi-Dateiformat. An-

schließlich wurden die Bilder einzeln als tif-Datei formatiert und dann mit der Software Adobe Photoshop und Microsoft PowerPoint weiterverarbeitet. Vom selben Präparat wurden jeweils Aufnahmen im Differential-Interferenz-Kontrast, eine Abbildung der Immunfluoreszenz-Färbung und die Fluoreszenz-Zellkern-Gegenfärbung nebeneinander montiert.

## 2.2 Nachweis des V2-Rezeptorproteins mittels Immunoblotverfahrens

Im Immunoblotverfahren, auch Western-Blot genannt, wurde der V2-Rezeptor als Protein nachgewiesen. Die Präparation des Ductus und Saccus endolymphaticus und der Nieren erfolgte in derselben Art und Weise wie für die Immunhistochemischen Verfahren. Um die Zeit der Proteolyse in den Geweben möglichst gering zu halten, wurde die Präparation in eisgekühltem PBS durchgeführt. Der Strukturverlust der Gewebe stand für die Proteingewinnung nicht im Vordergrund. Die Gewebe wurden zügig in Eppendorf-Cups überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der Gewebe erfolgte bei  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Pro Eppendorf-Cup wurden 50 Stück Saccus und Ductus endolymphaticus eingefroren, um eine ausreichende Proteinmenge für den Nachweis des V2-Rezeptorproteins zu erreichen.

### 2.2.1 Probenaufbereitung, Proteinbestimmung und Proteinfällung

#### 2.2.1.1 Material

##### Geräte und Hilfsstoffe

Zentrifuge (sorvall RC 26 plus)	Kendro Laboratory Prod., USA
Gewebezerkleinerer (Homogenisator)	Braun, Bachofer, Reutlingen
Ultraschallbad (sonorex TK 30)	Bandelin electronics, Berlin
Vortex	Scientific Ind., New York, USA
Photometer (Ultraspec II)	LKB, Biochrom
Zentrifuge (Biofuge pico)	Heraeus Instruments, Hanau

## Lösungen

Complete-Proteaseinhibitorlösung

Complete, EDTA-free Tabletten Roche, Mannheim

Die Lösung wird mit einer Tablette in 1 ml Aqua bidestillata hergestellt.

Lysepuffer-Lösung

Merck, Darmstadt

7,5 mM Na-Phosphat:

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> / M = 138 g / mol (1 Volumen-Teil) 103,5 mg

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> / M = 178 g / mol (3 Volumen-Teile) 133,4 mg

2 mM MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O / M = 203,3 g / mol 40,7 mg

1 mM EGTA / M = 380,4 g / mol 38,4 mg

Alle Substanzen werden in Aqua bidestillata gelöst und der pH-Wert wird mit HCl oder NaOH auf 7,5 eingestellt. Dann wird die Lösung auf 100 ml aufgefüllt.

Bradford Reagent (Coomassie-Brillantblau) Sigma-Aldrich, Steinheim

Aqua bidestillata GIBCO BRL, Paisley, Schottland

Methanol Merck, Darmstadt

Chloroform Merck, Darmstadt

## 2.2.1.2 Methode

Die Complete-Proteaseinhibitorlösung wurde 1:20 in Lysepufferlösung verdünnt und sofort auf die gefrorenen Gewebeproben gegeben. Anschließend wurden die Gewebeproben homogenisiert und dann für 7 min in ein mit Eiswasser gefülltes Ultraschallbad gelegt. Danach wurden die Proben für 30 min auf Eis inkubiert und wiederholt mit dem Vortex gemischt. Im Anschluss wurden die Präparationen in einem fünffachen Einfrier-Auftau-Zyklus lysiert (freeze and thawing). Die Proben wurden dann bei 22300 rpm und 4°C für 1 Stunde zentrifugiert.

Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 300 µl Lysepuffer-Complete-Lösung, versetzt mit 1 % Triton X-114, aufgenommen. Dieser Ansatz wurde bei 4°C für 1 Stunde inkubiert und dabei alle 10 min mit dem Vortex gemischt. Anschließend wurde bei 20000 rpm bei 4°C für 30 min zentrifugiert. Diese Schritte

dienten dazu, eine maximale Proteinkonzentration in der Probe zu erreichen. Der Überstand des letzten Zentrifugationsschrittes wurde weiterverwendet. Bis zur Verarbeitung im Immunoblot wurden die Gewebehomogenate bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

Um die Proteinkonzentration des jeweiligen Gewebehomogenats zu kennen, wurde die Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt. Bei dieser Methode wird ausgenutzt, dass es durch die Bindung von Proteinen an das Bradford Reagent (Coomassie-Brillantblau) zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs von 465 nm nach 595 nm kommt (Bradford, 1976). Die Proteine im Probenvolumen wurden durch Zugabe von NaOH möglichst vollständig gelöst.

Dann wurden 5  $\mu\text{l}$  Proteinprobe, 10  $\mu\text{l}$  0,1N NaOH und 85  $\mu\text{l}$  Aqua bidestillata gemischt. Auf die Proteinlösung wurden 3 ml Bradford Reagent pipetiert und gut gemischt. Diese Lösung wurde unmittelbar in eine Photometerküvette überführt und bei einer Wellenlänge von 595 nm die Extinktion bestimmt. Der Referenzwert (Nullwert) wurde mit 5  $\mu\text{l}$  Lysepufferlösung anstatt der Proteinprobe bestimmt. Anschließend wurde anhand der Eichkurve die Proteinkonzentration ermittelt.

Für die Proteinfällung nach Wechsel und Flügge wurde jeweils ein Probenvolumen von 300  $\mu\text{l}$  verwendet. Zur Probe wurden 600  $\mu\text{l}$  Methanol gegeben. Dann wurde das Gemisch 30 s bei 12000 rpm zentrifugiert. Weiterhin wurden 300  $\mu\text{l}$  Chloroform hinzu pipetiert. Diese Mischung wurde genauso zentrifugiert. Anschließend wurden 300  $\mu\text{l}$  Aqua dest. zugegeben und dann für 3 min bei 12000 rpm zentrifugiert.

Dann wurde die obere Methanolphase vorsichtig abgenommen und verworfen. Zur unteren Chloroformphase und zur Interphase mit den Proteinen wurden 450  $\mu\text{l}$  Methanol gegeben, gemischt und für 5 min bei 12000 rpm zentrifugiert, um das Protein zu pelletieren. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde für die Gelelektrophorese weiterverarbeitet.

## 2.2.2 Gelelektrophorese und Western-Blot

## 2.2.2.1 Material

## Geräte und Hilfsstoffe

Western Blot System: X Cell Sure Lock™ Mini-Cell	Invitrogen, Paisley, UK
Bis[2-hydroxyethyl]imino-tris[hydroxymethyl]methan-HCl-gepufferte Polyacrylamid -Gele (4 - 12 %)	
X-Cell II™ Blot Modul	
Sponge Pad for X Cell II™ Blotting	
PVDF-Membrane (= polyvinylidene difluoride) Filter Paper Sandwich	
Folienschweißgerät (Polystar 242)	Hartenstein, Würzburg
Inkubationsschüttler (Novotron)	Infors, Bottmingen, Schweiz
Entwicklerkassette (Hypercassette™)	Amersham, Buckinghamsh., UK
Röntgenfilm (Hyperfilm™)	Amersham, Buckinghamsh., UK

## Lösungen

<u>Sample-Buffer-Lösung</u>	Invitrogen, Paisley, UK
NuPage™LDS sample buffer (4x)	
NuPage® Reducing Agent	

<u>Laufpuffer-Lösung</u>	Invitrogen, Paisley, UK
50ml NuPage® 3-(N-morpholino) propan sulfonic SDS Running Buffer	
500µl NuPage® Antioxidant	
950 ml ultrapure water	

Proteinleiter-Lösung

Precision Plus Protein™Standards (10 – 250 kDa)	Bio-Rad, München
---	------------------

Blotpuffer

50 ml NuPage® Transfer Buffer	Invitrogen, Paisley, UK
1 ml NuPage® Antioxidant	
749 ml Aqua destillata	
200 ml Methanol	Merck, Darmstadt

Waschpuffer

0,02 % Tween 20 ad 1000 ml PBS

Sigma-Aldrich, Steinheim

Blockingpuffer

5% Magermilchpulver ad 50 ml Waschpuffer

Roth, Karlsruhe

ECL<sup>TM</sup> Western Blotting Detection Reagents    Amersham, Buckinghamshire, UK  
Röntgenfilmentwickler (CURIX 60)                    Agfa, Köln

## 2.2.2.2 Methode

Das nach der Proteinfällung gewonnene Pellet wurde in Aqua bidestillata, Sample Buffer und Reducing Agent gelöst. Nach Zugabe des Reducing Agent musste die Probe gleich weiterverarbeitet werden, da die Probe sonst reoxidieren könnte. Die Proben wurden im Vortex für 10 min bei 70 °C im Thermoblock erhitzt. Nach Abkühlung wurden die Gewebeproben bei 15000 rpm zentrifugiert, um ungelöste Bestandteile zu sedimentieren.

Pro Geltasche wurde jeweils ein Probenvolumen von 20 µl mit unterschiedlichem Proteingehalt verwendet. Von der Proteinleiter-Lösung wurden 10 µl pro Geltasche aufgetragen, um später Referenzwerte für die Bestimmung der Molekulargewichte zur Verfügung zu haben. Die elektrische Auftrennung der Proteine erfolgte für 50 min bei 200 V (konstant) und 100 – 115 mA pro Gel. Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden vom Gel auf die PVDF-Membran „geblottet“. Hier erfolgte die unspezifische Bindung der Proteine an die Membran. Der Blotvorgang erfolgte für 1 Stunde bei 30 V (konstant) und 170 mA. Anschließend wurde die Membran in Blockingpuffer auf einem Schüttler für 2 Stunden inkubiert, um die unspezifischen Bindungsstellen abzusättigen. Nach dem Blockierungsschritt wurde die Membran an drei Seiten in einer Plastikfolie verschweißt. Die Primärantikörper wurden in Blockingpuffer und PBS in oben angegebener Konzentration gelöst. Die Antikörperlösung wurde auf die Membranen gegeben und diese dann eingeschweißt. Die Membranen wurden auf einem Schüttler bei 2 – 8 °C über Nacht inkubiert. Zum Entfernen der Antikörperlösung wurde dreimal für 15 min mit Waschpuffer gewa-



schen. Der Sekundärantikörper wurde in der angegebenen Konzentration in Blockingpuffer verdünnt. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgte 1 Stunde bei Raumtemperatur. Anschließend wurde mit Waschpuffer dreimal für 15 min gewaschen.

10 ml des ECL<sup>TM</sup>Western Blotting Detection Reagents wurden auf die gewaschene Membran gegeben und diese für 1 min inkubiert. Dann wurde die Membran in die Entwicklerkassette mit dem Röntgenfilm gelegt. Der Nachweis des Protein-Antikörper-Komplexes erfolgte mittels der Enhanced Chemiluminescence-Reaktion (ECL). Eine Detektionsmethode, bei der in Gegenwart von Peroxidase und Wasserstoffperoxid Luminol oxidiert wird, wobei es zu einer Lichtemission kommt, welche einen Röntgenfilm an der entsprechenden Stelle belichtet. Zur Dokumentation der Ergebnisse wurden die Röntgenfilme mit einem Flachbettscanner gescannt.

### 2.3 Antikörper für Immunhistochemie und Immunoblot

Für die immunhistochemischen Färbungen der Präparate des Saccus und Ductus endolymphaticus sowie für den Immunoblot wurden folgende Primär- und Sekundärantikörper eingesetzt.

#### 2.3.1 Primärantikörper

Ratte Arginin Vasopressin V2-Rezeptor Antikörper (AVP-V2) Bio Trend, Köln  
Das Zielepitop ist ein 18 Aminosäuren umfassendes Peptid in der ersten extrazellulären Domäne (Lolait et al., 1992; Firsov et al., 1994; Nonoguchi et al., 1995).

Ratte Arginin Vasopressin V1a-Rezeptor Antikörper (AVP-V1a) Bio Trend, Köln  
Das Zielepitop ist eine 18 Aminosäuren lange Peptidsequenz in der zytoplasmatischen Domäne zwischen den transmembranären Domänen 5 und 6 (Morel et al., 1992; Innamorati et al., 1996; Thibonnier et al., 1994 und 2000).

Ratte Arginin Vasopressin V1b-Rezeptor Antikörper (AVP-V1b) Bio Trend, Köln  
Das Zielepitop ist ein 18 Aminosäuren umfassendes Peptid in der ersten extrazellulären Domäne (Saito et al., 1995; Lolait et al., 1995).

Die polyklonalen Antikörper wurden alle in Kaninchen generiert. Die verwendete Endkonzentration für die Immunhistochemie und den Immunoblot betrug jeweils 10 µg/ml.

### 2.3.2 Sekundärantikörper

Die Sekundärantikörper binden an den Primärantikörper und sind selbst mit einem für die jeweilige Nachweismethode geeigneten Reagenz gekoppelt. Mit ihrer Hilfe kann das Zielepitop als Ergebnis, im Sinne einer Fluoreszenzmarkierung oder einer spezifischen Bande, sichtbar gemacht werden.

#### Ziege-anti-Kaninchen IgG (H+L )

Molecular Probes, Göttingen

Der Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenzfärbungen ist mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa® 488 konjugiert. Das Absorptionsmaximum liegt bei 495 nm und die Emission bei 519. Es entsteht bei Belichtung ein grüner Farbeindruck. Die verwendete Endkonzentration betrug 5 µg/ml.

#### Ziege-anti-Kaninchen IgG (H+L )

Santa Cruz, Heidelberg

Der Sekundärantikörper für den Immunoblot ist mit dem Katalysator Merrettichperoxidase für die Nachweisreaktion Enhanced Chemiluminescence (ECL) gekoppelt. Die verwendete Endkonzentration betrug 0,7 µg/ml.

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Immunhistochemie

Um die Expression und zelluläre Lokalisation der Vasopressin-Rezeptoren im Saccus und Ductus endolymphaticus der Ratte (postnatal Tag 4) nachzuweisen, wurden an ca. 150 Häutchenpräparaten immunhistochemische Färbungen durchgeführt. In jedem Färbedurchgang wurden Positivkontrollen mitgeführt. Als Positivkontrolle diente Nieren- und Nebennierengewebe von vier Tage alten Ratten. Die immunhistochemischen Färbungen wurden alle mittels Epifluoreszenzmikroskopie (Axioplan2 imaging) ausgewertet. Die Bildaquisition erfolgte im zvi-Dateiformat (Axivision-Software). Formatiert wurden die Bilder als tif-Datei zur Bearbeitung mit Photoshop und PowerPoint. Im direkten Vergleich wurden drei verschiedene Darstellungsarten des identischen Präparates nebeneinander abgebildet: jeweils mittig in den Abbildungen die immunhistochemischen Fluoreszenzproteindarstellungen mit dem Fluorophor Alexa® 488 (Alexa 488), rechts die Abbildungen mit einer Fluoreszenz-Zellkerngegenfärbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff 4',6-diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid (DAPI) sowie links die Differential-Interferenz-Kontrastierungen (DIC). Die Aufnahmen in der DIC-Kontrastierung stellen die erhaltene Gewebestruktur der einzelnen Präparate und deren Oberflächenbeschaffenheit dar. Die Aufnahmen der Zellkerngegenfärbung mit DAPI ließen anhand der Lokalisation der einzelnen Zellkerne eine homogene Zellverteilung und einen zusammenhängenden Gewebeverband der jeweiligen Präparate erkennbar werden. Durch die Anfärbung des Zellkerns war in den vergrößerten Ansichten auch eine exaktere Lokalisation der korrespondierenden Zellen möglich. Durch die Form des Zellkerns konnte teilweise auch auf den dargestellten Zellen-Typ geschlossen werden, wie zum Beispiel Endothel- und Epithelzellen. Detaildarstellungen gaben Aufschluss über die Lage der spezifischen Markierungen im Verhältnis zur Zellwand und zum DAPI markierten Zellkern. Angaben zur subzellulären Lokalisation der Markierungen waren bei den lichtmikroskopischen Aufnahmen nicht möglich.

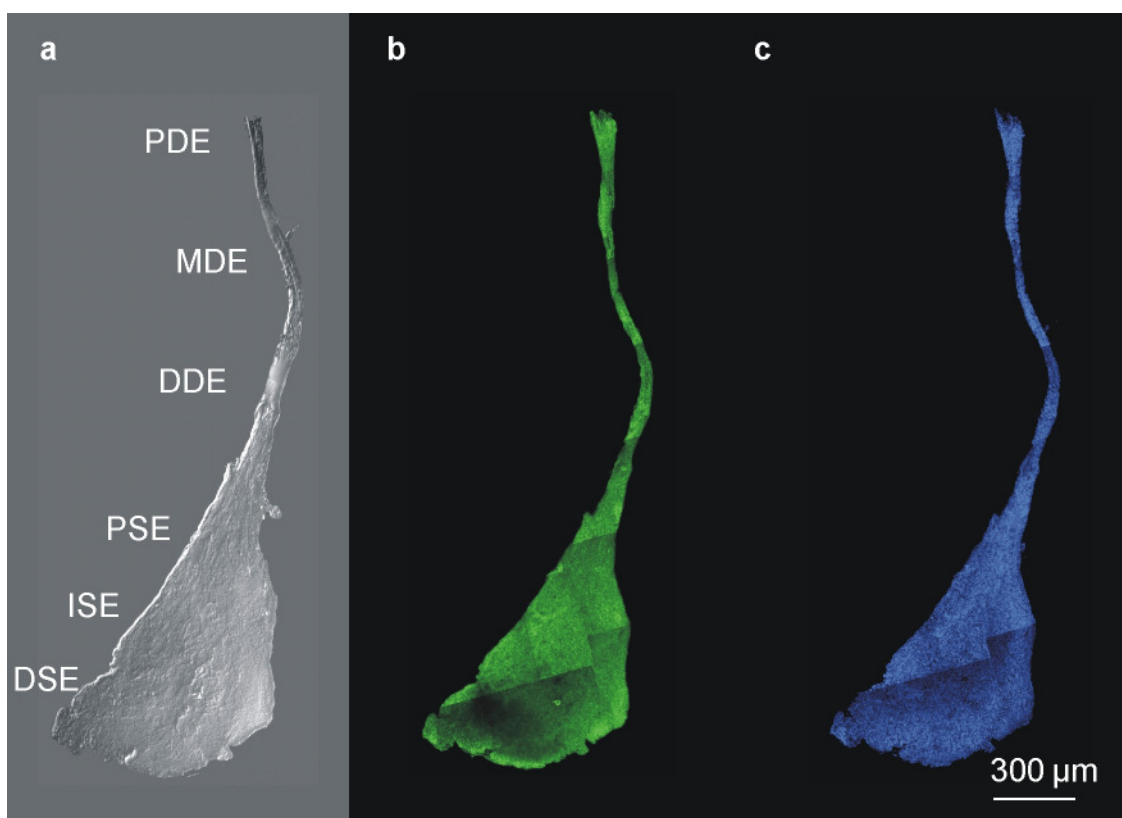
### 3.1.1 V2-Rezeptor Nachweis - Immunhistochemie

#### 3.1.1.1 Expression am Präparat und Kontrollgewebe

Anhand der Übersichtsabbildungen der Häutchenpräparate des Saccus und Ductus endolymphaticus konnte gezeigt werden, dass sich die spezifische V2-Rezeptormarkierung im gesamten Präparat findet. Das folgend dargestellte Ergebnis ist repräsentativ für ca. 30 Häutchenpräparate, die in identischer Weise gefärbt wurden und zu gleichen Ergebnissen führten. Die Übersichtsabbildungen wurden aus vielen Einzelaufnahmen zusammengesetzt, um bei entsprechender Vergrößerung die spezifische Markierung noch ausreichend identifizieren zu können. An den Rändern der Einzelbilder sind Intensitätsunterschiede der jeweiligen Markierungen sichtbar, obwohl die einzelnen Aufnahmen mit konstanten Belichtungszeiten angefertigt wurden. Diese Artefakte resultierten aus unterschiedlich intensiv fluoreszierenden Arealen innerhalb des jeweiligen Bildausschnittes.

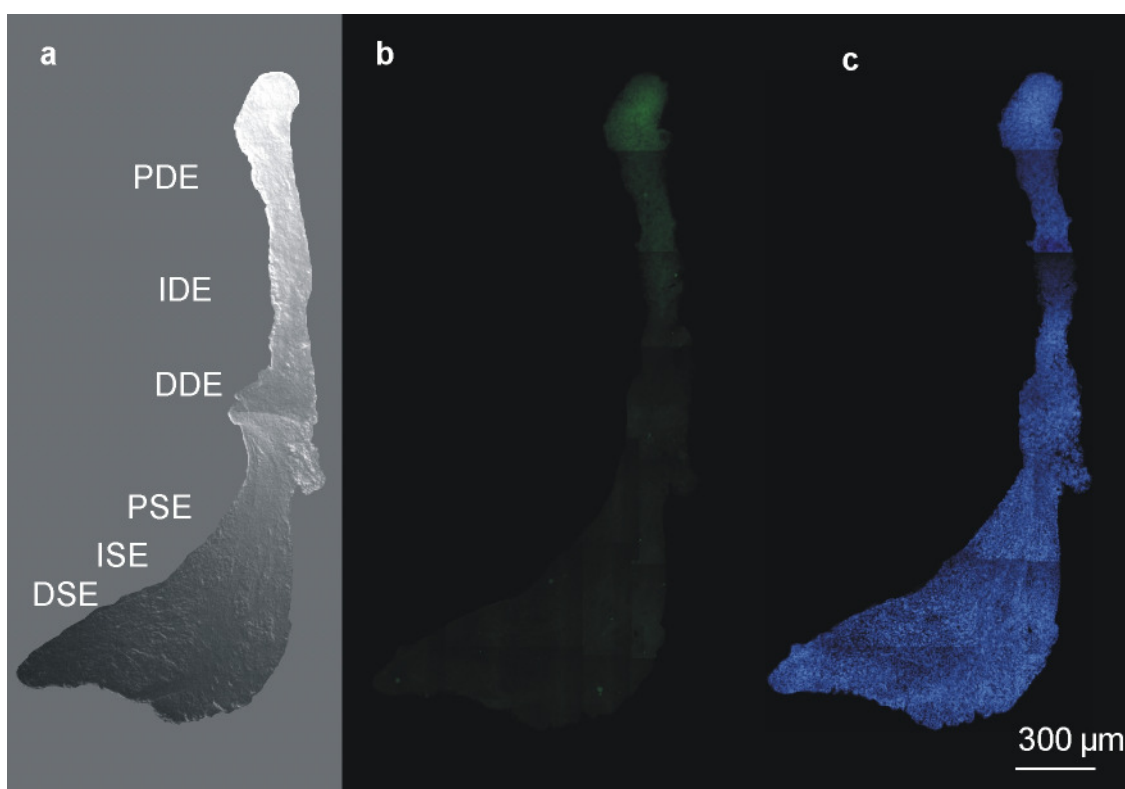
In Abbildung 4a ist die Übersichtsdarstellung eines Häutchenpräparates des Saccus und Ductus endolymphaticus in der DIC-Kontrastierung gezeigt. Die Bezeichnungen im Bild nehmen Bezug auf die anatomische Unterteilung in jeweils einen proximalen (P), intermediären (I) und distalen (D) Abschnitt des Saccus (SE) und Ductus (DE) endolymphaticus. Aufgrund des äußerst fragilen Gewebes des Saccus und Ductus endolymphaticus kam es immer wieder zu kleinen Präparationsdefekten, welche in einer Diskontinuität der Oberflächenstruktur resultierten (Abbildung 4: im distalen Anteil des Saccus endolymphaticus). Der Ductus endolymphaticus war präparativ äußerst schwierig von den anhaftenden Durafasern zu trennen, was sich im Ergebnis teilweise als Überlagerungen oder unspezifisch markierte Areale darstellte. Dies ist in Abbildung 4a im Bereich des distalen Ductus endolymphaticus zu sehen. Abbildung 4b zeigt eine Übersichtsdarstellung des Häutchenpräparates des Saccus und Ductus endolymphaticus nach V2-Rezeptor-spezifischer Immunfluoreszenzfärbung. Die positive Markierung stellt sich im gesamten Präparat hellgrün dar. Somit wurde immunhistochemisch die Expression des V2-Rezeptors im gesamten Saccus und Ductus endolymphaticus nachgewiesen. Bereits in der Übersichtsdarstellung des Häutchenpräparates fiel eine Musterung auf. Im Sin-

ne eines sehr engmaschigen Gitternetzes schien die Markierung abwechselnd bei einzelnen Zellen stärker und bei anderen Zellen schwächer ausgeprägt zu sein. Eine homogene Zellverteilung im gesamten Häutchenpräparat konnte anhand der blau imponierenden Zellkerngegenfärbung mit DAPI belegt werden. Eine Unterbrechung des geschlossenen Zellverbandes scheint in der Abbildung 4c nur aufgrund von erheblichen Intensitätsunterschieden an den Einzelbildübergängen vorzuliegen.



**Abbildung 4:** Übersichtsdarstellungen eines Häutchenpräparates des Ductus und Saccus endolymphaticus aus der rechten Schädelhälfte einer postnatalen Ratte. (a) Die Differential-Interferenz-Kontrastierung des Häutchenpräparates des Ductus und Saccus endolymphaticus zeigt die weitgehend unversehrte Gewebestruktur und die auch bei allen folgenden Übersichtsdarstellungen verwendete Gliederung in die folgenden Abschnitte: DDE - distaler Anteil des Ductus endolymphaticus, IDE - intermediärer Anteil des Ductus endolymphaticus, PDE - proximaler Anteil des Ductus endolymphaticus, DSE - distaler Anteil des Saccus endolymphaticus, ISE - intermediärer Anteil des Saccus endolymphaticus, PSE - proximaler Anteil des Saccus endolymphaticus. (b) Die V2-Rezeptor-spezifische Immunfluoreszenzfärbung zeigt eine weitgehend homogene Verteilung der spezifischen Markierung über das gesamte Präparat. Zellen mit stärkerer Markierung wechseln sich mit weniger stark markierten Zellen ab. (c) Die Zellkerngegenfärbung mit DAPI am Häutchenpräparat des Ductus und Saccus endolymphaticus zeigt eine homogene Zellverteilung.

Abbildung 5b zeigt die Negativkontrolle zur Abbildung 4b: eine Immunfluoreszenzfärbung des Häutchenpräparates ohne V2-Rezeptor-spezifischen Primärantikörper. Hier zeigte sich keine spezifische Markierung, jedoch war eine schwache Hintergrundfluoreszenz sichtbar. Diese Hintergrundfluoreszenz wurde auf ein nicht vollständiges Auswaschen des fluorchrommarkierten Sekundärantikörpers zurückgeführt. Dieser geht eventuell schwache unspezifische Bindungen mit bestimmten Epitopen, wie zum Beispiel Mikrovilli, ein. Die Zellkerngegenfärbungen mit DAPI in Zusammenschau mit der DIC-Darstellung ließen in den Übersichtsdarstellungen erkennen, dass der Gewebeverband des Präparates weitgehend erhalten ist (Abbildung 5a und 5c). Die breiter imponierende Stelle im Bereich des distalen Ductus endolymphaticus war durch eine Überlagerung des Gewebes des Ductus endolymphaticus beim Aufbringen des Präparates auf den Objektträger entstanden.

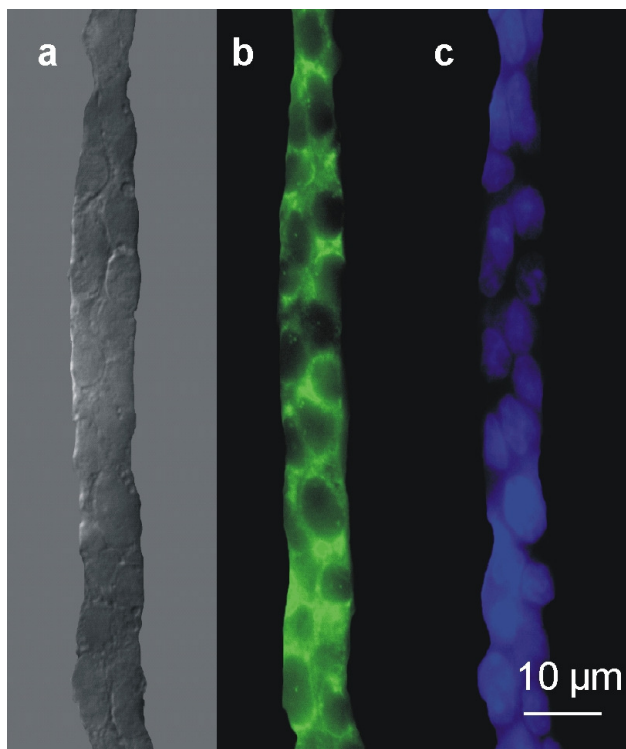


**Abbildung 5:** Übersichtsdarstellungen eines Häutchenpräparates des Ductus und Sacculus endolymphaticus der postnatalen Ratte ohne Verwendung des spezifischen Primärantikörpers. (a) Die Differential-Interferenz-Kontrastierung des Häutchenpräparates zeigt die weitgehend unversehrte Gewebestruktur des Präparates. Im Bereich des distalen Abschnittes des Ductus endolymphaticus hatten sich beim Aufbringen des Gewebes auf den Objektträger einige Zelllagen übereinander geschoben. (b)

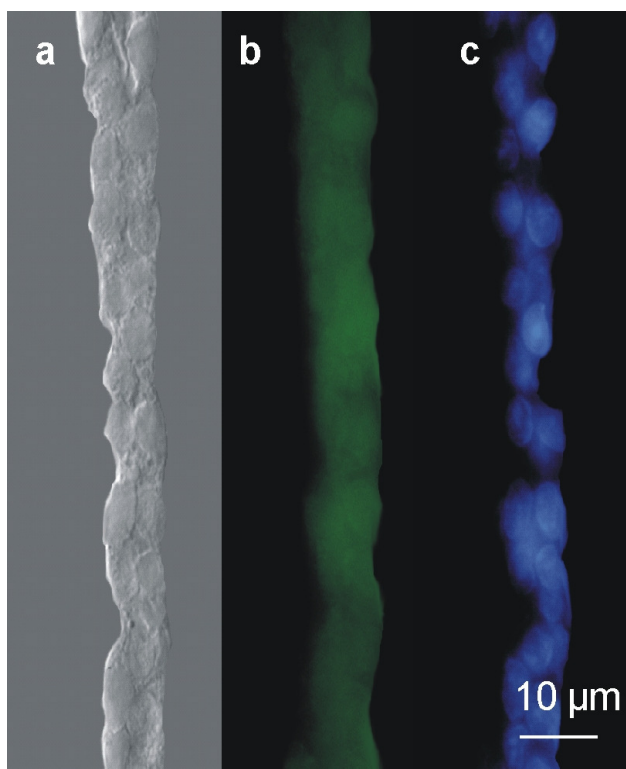
Die Negativkontrolle zur V2-Rezeptor-spezifischen immunhistochemischen Färbung ohne Primärantikörper zeigt keine spezifische Markierung. Eine schwache Hintergrundfluoreszenz ist aufgrund unspezifischer Bindungen oder einer nicht vollkommenen Auswaschung des Sekundärantikörpers im Präparat erkennbar. (c) Die Zellkerngegenfärbung mit DAPI zeigt eine homogene Zellverteilung und erhaltene Gewebestruktur des Präparates.

Die Expression des V2-Rezeptors im Sammelrohr der Niere und die einfache Handhabung des Nierengewebes bei der Präparation machte die Niere zum idealen Kontrollgewebe. In den Abbildungen 6 und 7 sind mikrodissizierte Sammelrohre der Niere der vier Tage alten Ratte abgebildet. In der DIC-Aufnahme stellte sich die erhaltene Gewebestruktur des Sammelrohres mit gut erkennbaren Zellgrenzen dar (Abbildung 6a und 7a). Die Immunfluoreszenzfärbung mit dem Primärantikörper gegen den V2-Rezeptor des Sammelrohres in Abbildung 6b zeigte die spezifische hellgrüne Markierung. Bei näherem Betrachten einzelner Zellen imponierte die Markierung im Verlauf der Zellmembran. Dies wurde besonders deutlich, wenn man einen direkten Vergleich der Lokalisation einer einzelnen Zelle in der DIC-Aufnahme (Abbildung 6a), der korrespondierenden Zellkerne in der Aufnahme mit DAPI-Zellkerngegenfärbung (Abbildung 6c) und der intensiv hellgrünen, der Zellmembran folgenden V2-Rezeptor-spezifischen Fluoreszenzmarkierung anstellte. Die Zellkernfärbung mit DAPI erlaubte zusammen mit der spezifischen Immunfluoreszenz eine Zuordnung der Markierung zum Epithel des Sammelrohres. Lichtmikroskopisch ließen sich die Zellen des Sammelrohres nicht eindeutig in Hauptzellen und Nebenzellen differenzieren.

In Abbildung 6b ließen sich Zellen mit einer sehr intensiven membranständigen Markierung ausmachen. Hier könnte es sich um Hauptzellen des Sammelrohres handeln, in welchen der V2-Rezeptor beschrieben wurde. Abbildung 7b zeigt die Negativkontrolle ohne Primärantikörper, in der keine spezifische Markierung sichtbar war. Die Abbildungen 7a und 7c zeigen die korrespondierenden Abbildungen in DIC und DAPI. Die relativ ausgeprägte Hintergrundfluoreszenz in Abbildung 7b kann auf die hohe enzymatische Aktivität des Nierengewebes zurückzuführen sein, wodurch viele Abbauprodukte entstehen, die unspezifische Epitope für die Antikörper darstellen können.



**Abbildung 6:** Übersichtsdarstellungen eines mikrodisssezierten Sammelrohres der Niere der postnatalen Ratte mit V2-Rezeptor-spezifischem Primärantikörper (**Positivkontrolle**). (a) Die DIC-Kontrastierung eines mikrodisssezierten Sammelrohres der Niere zeigt eine unversehrte Gewebestruktur des Epithels mit gut erkennbaren Zellgrenzen. (b) Die V2-Rezeptor-spezifische immunhistochemische Färbung des mikrodisssezierten Sammelrohres zeigt die spezifische Markierung deutlich membranständig. (c) Die Zellkerngegenfärbung mit DAPI zeigt eine homogene Zellverteilung; hier war eine eindeutige Zuordnung der Zellkerne zu den entsprechenden Zellen in der DIC-Kontrastierung und zu der gezeigten membranständigen Immunfluoreszenzmarkierung möglich.

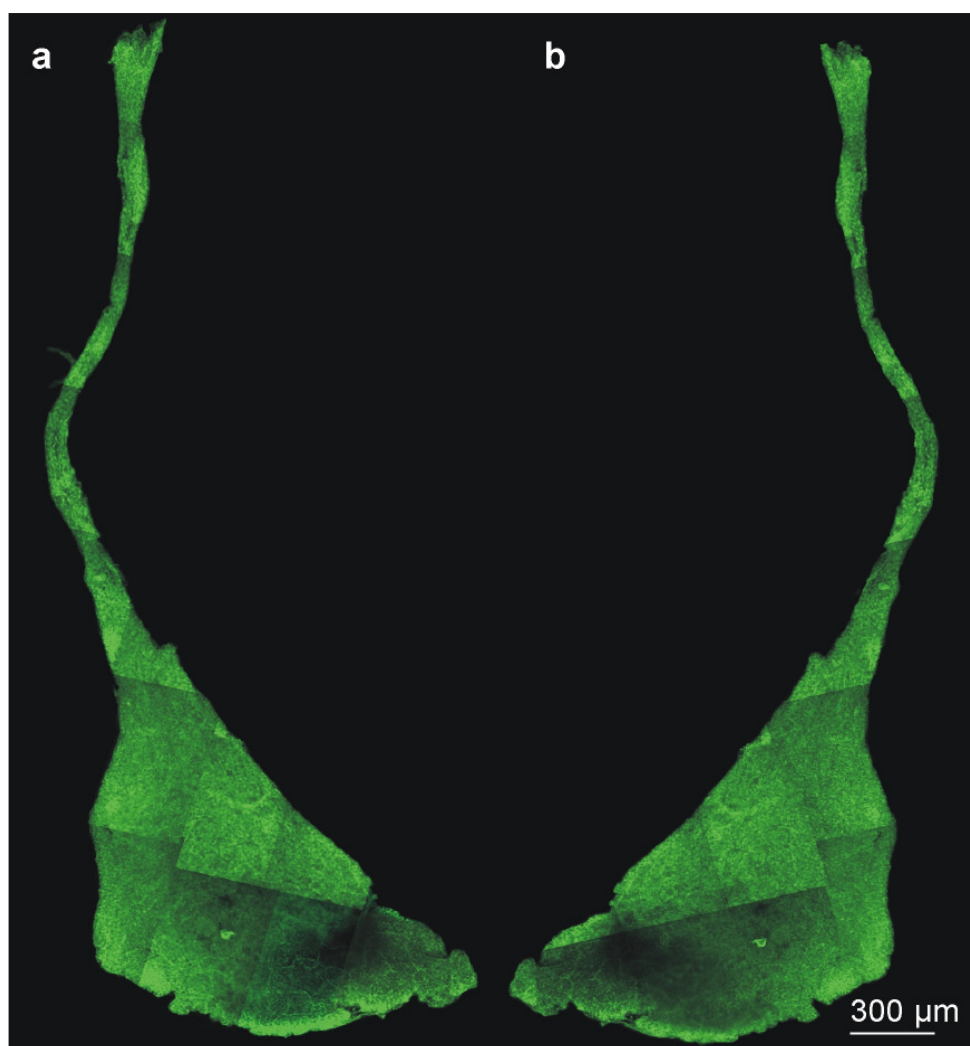


**Abbildung 7:** Übersichtsdarstellungen eines mikrodisssezierten Sammelrohres der Niere der postnatalen Ratte **ohne** Primärantikörper (**Negativkontrolle**). (a) vgl. Abbildung 6a. (b) Die Negativkontrolle zur V2-Rezeptor-spezifischen immunhistochemischen Färbung (ohne Primärantikörper) des mikrodisssezierten Sammelrohres der Niere zeigt keine spezifische Markierung. Die stärkere Hintergrundfluoreszenz, im Vergleich zum Ductus und Saccus endolymphaticus, kann auf die höhere enzymatische Aktivität der Niere und somit auf häufigere unspezifische Bindungen im Präparat zurückzuführen sein. (c) Die Zellkerngegenfärbung (DAPI) des mikrodisssezierten Sammelrohres zeigt eine homogene Zellverteilung. Eine eindeutige Zuordnung der Zellkerne zu den zugehörigen Zellen in der DIC-Darstellung war möglich.



### 3.1.1.2 Verteilungsmuster V2-Rezeptor-Expression am Präparat

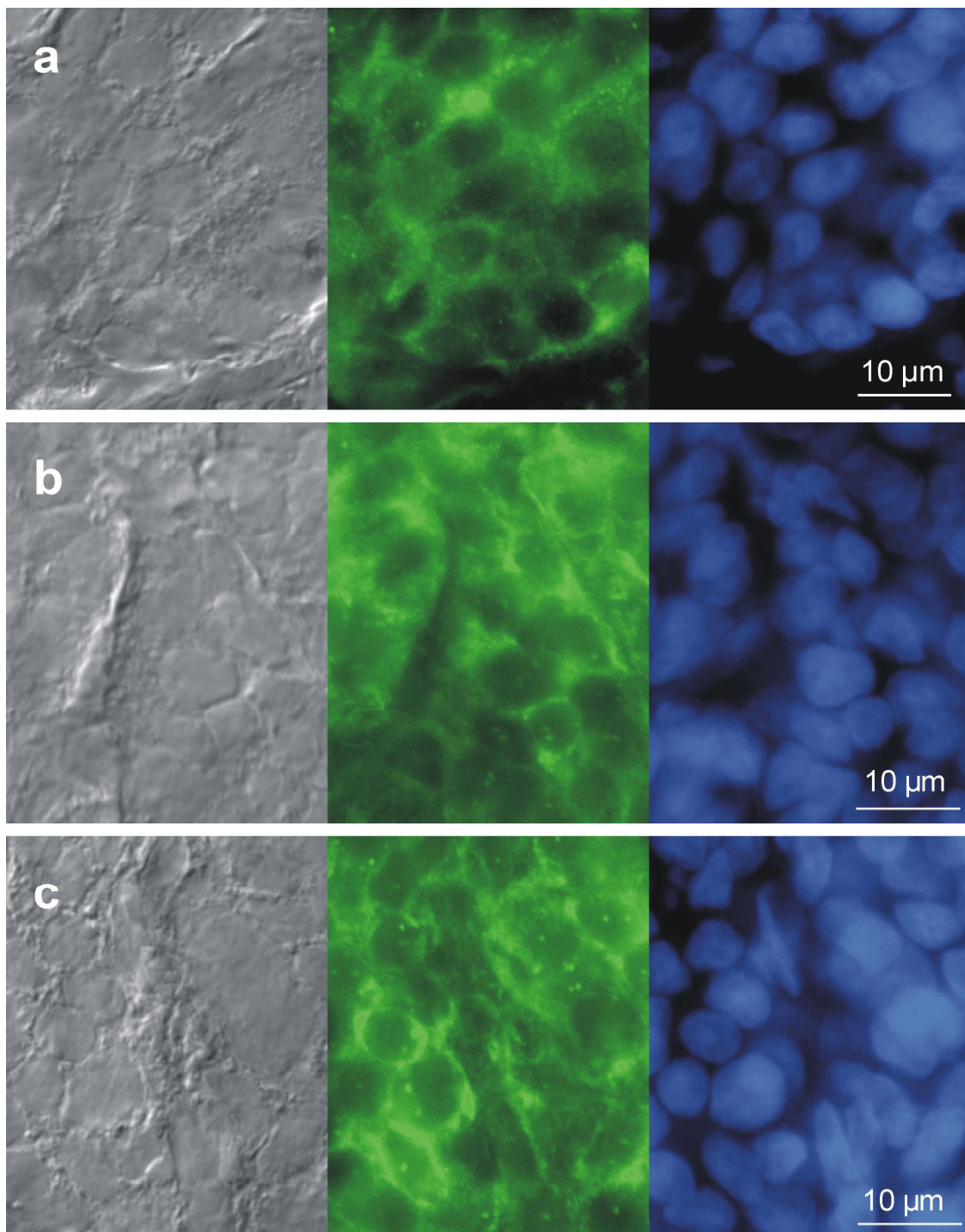
Die beiden Präparate zeigen die sinusnahe und die arachnoideanahe Seite eines Häutchenpräparates des Saccus und Ductus endolymphaticus einer rechten Schädelhälfte einander gegenübergestellt. Auch diese Übersichtsdarstellungen wurden aus vielen einzelnen Mikroskopbildern zusammengesetzt. Die Verteilung und Intensität der Markierungen der beiden verglichenen Seiten zeigte keine deutlich erkennbaren Unterschiede.



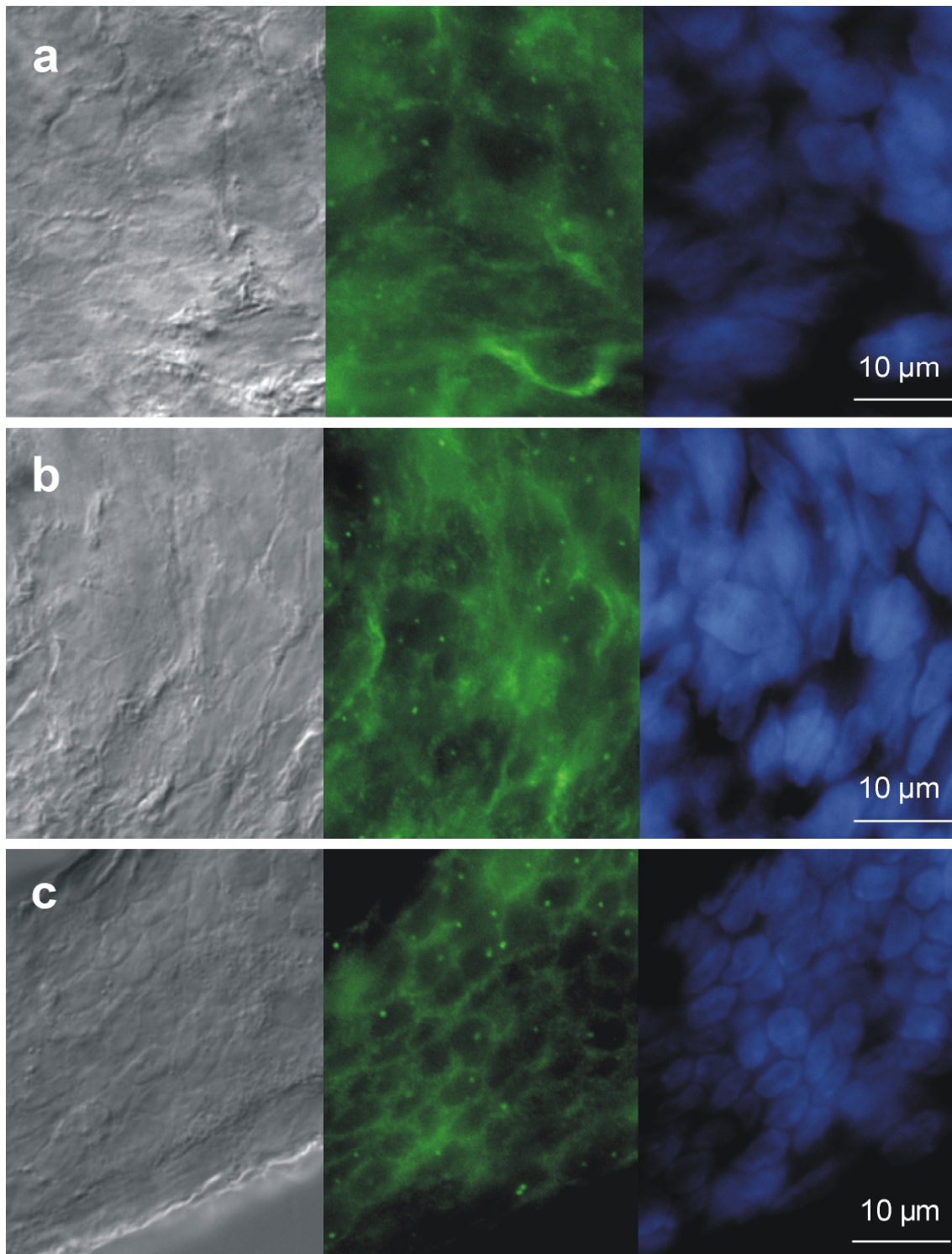
**Abbildung 8:** Übersichtsdarstellung eines Häutchenpräparates des Ductus und Saccus endolymphaticus der postnatalen Ratte mit V2-Rezeptor-Fluoreszenzmarkierung. (a) Die sinusnah gelegene Seite des Präparates. (b) Die arachnoideanahe Seite des Präparates. Es zeigt sich in beiden Darstellungen eine nahezu gleichmäßige Verteilung der Markierung in allen Abschnitten des Saccus und Ductus endolymphaticus.

### 3.1.1.3 Detaildarstellung der V2-Rezeptor-Expression

Um einen exakten Eindruck der einzelnen Abschnitte des Saccus und Ductus endolymphaticus mit der jeweils vorliegenden Expression des V2-Rezeptors zu erhalten, wurden Detailaufnahmen bei hoher Vergrößerung erstellt (Abbildung. 9 und 10). Saccus und Ductus endolymphaticus wurden analog der Untergliederung aus Abbildung 4 in einen distalen, einen intermediären und einen proximalen Anteil unterteilt. In dem in Abbildung 9 dargestellten Präparat fand sich in allen Abschnitten des Saccus endolymphaticus eine deutlich ausgeprägte Immunfluoreszenzmarkierung. Die Markierung folgte einem zellulären Muster, wie in den Übersichtsabbildungen beschrieben. Dies war gut im Vergleich mit der Oberflächenstruktur im DIC-Bild links und der homogenen Zellverteilung in der DAPI-Färbung, in den jeweils rechten Bildausschnitten, zu sehen. Die Markierungen konnten der Zellmembran zugeordnet werden. Dies entspricht der Lokalisation des V2-Rezeptors in der Zellmembran der Nierenzellen. Einzelne, sehr ausgeprägt markierte Punkte in der Abbildung konnten auf Präzipitate, im Sinne von Verunreinigungen oder auf unspezifische Bindungen an andere Epitope der Zellen, zurückgeführt werden. Eine Unterscheidung der basolateralen oder apikalen Zellmembranseite konnte anhand der Auswertung der Präparate nicht eindeutig getroffen werden. Der Ductus endolymphaticus, in den Abbildungen 10, zeigte im Vergleich zum Saccus endolymphaticus eine unregelmäßigere Zellverteilung mit entsprechend undeutlicherer V2-Rezeptor Immunfluoreszenzmarkierung. Dies war hauptsächlich auf die äußerst schwierige Präparation der filigranen Struktur des Ductus endolymphaticus zurückzuführen. Präparatorisch bedingte Gewebeschäden und dem Ductusgewebe noch aufgelagerte Reste von Durafasern, die eine unspezifische Markierung hervorriefen, beeinträchtigten hier die Aussagekraft der Immunfluoreszenzbilder. Ein kontinuierlicher Zellverband lag, wie anhand der mit DAPI blau gefärbten Zellkerne sichtbar wird, nicht immer vor. Insgesamt imponierte die spezifische Markierung, nicht in dem Maße ausgeprägt, wie im Saccus endolymphaticus. Eine V2-Rezeptorspezifische Markierung lag, im Vergleich zur Negativkontrolle und aufgrund der Lage der Markierung entlang der Zellmembran vor.



**Abbildung 9:** Detaildarstellung der V2-R-Expression an Ausschnitten des Häutchenpräparates des Saccus endolymphaticus. (a) Distaler Anteil des Saccus endolymphaticus. (b) Intermediärer Anteil des Saccus endolymphaticus. (c) Proximaler Anteil des Saccus endolymphaticus. Die linke Bildreihe zeigt die Differential-Interferenz-Kontrast-Darstellung mit erhaltener Oberflächenstruktur der Zellen. Die jeweils mittleren Abbildungen stellen die spezifischen Immunfluoreszenzmarkierungen dar. Sie zeigen eine membrannahe Markierung der jeweiligen Zellen. Die rechte Bildreihe zeigt die blaue Zellkerngegenfärbung mit DAPI. Es fand sich eine homogene Zellverteilung, welche anhand der dargestellten Zellkerne auszumachen ist.



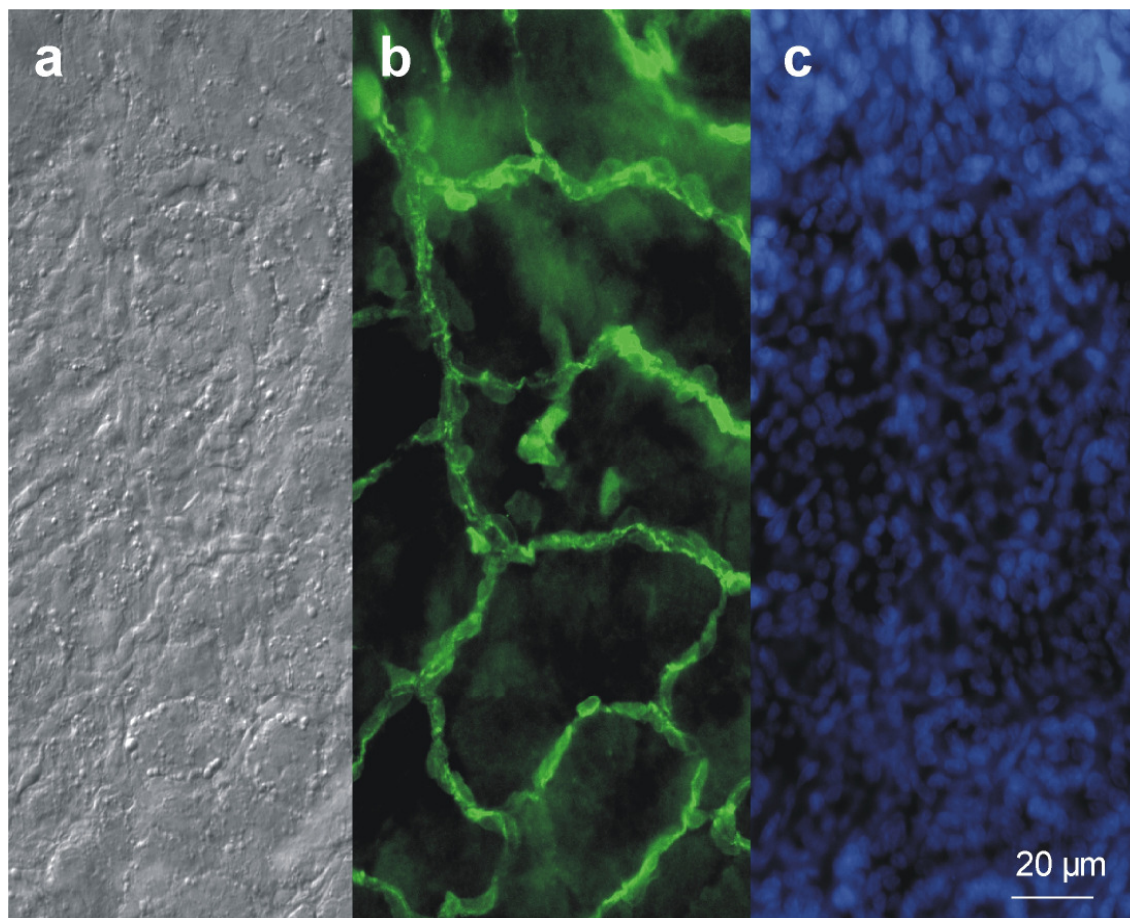
**Abbildung 10:** Detaildarstellung der V2-R-Expression an Ausschnitten des Häutchenpräparates des Ductus endolymphaticus. (a) Distaler Anteil des Ductus endolymphaticus. (b) Intermediärer Anteil des Ductus endolymphaticus. (c) Proximaler Anteil des Ductus endolymphaticus. Die Differential-Interferenz-Kontrastierung des Häutchenpräparates des Ductus endolymphaticus, jeweils am linken Bildrand, zeigt die Oberflächenstruktur der Zellen, die hier im Vergleich zu den Abbildungen des Saccus endolymphaticus verwuschener erschienen. Gewebeschäden, durch die äußerst

schwierige Präparation der filigranen Struktur hervorgerufen, und noch auf dem Gewebe aufgelagerte Reste von Durafasern ließen die Oberflächenstruktur nicht so deutlich erkennbar werden. In der mittleren Bildreihe ist die V2-Rezeptor-spezifische hellgrüne Immunfluoreszenzmarkierung abgebildet. Die spezifische Markierung fand sich membrannah, jedoch deutlich schwächer ausgeprägt als in den Abschnitten des Saccus endolymphaticus. Vor allem in den distalen und intermediären Abschnitten stellten sich die Markierungen verwaschen dar. In der rechten Bildreihe ist die blaue Zellkerngegenfärbung mit DAPI dargestellt. Präparationsartefakte waren hier besonders im intermediären und proximalen Anteil des Ductus endolymphaticus erkennbar. Ein kontinuierlicher Zellverband lag, wie anhand der mit DAPI gefärbten Zellkerne sichtbar wird, nicht durchgehend vor.

### 3.1.2 V1a-Rezeptor Nachweis – Immunhistochemie

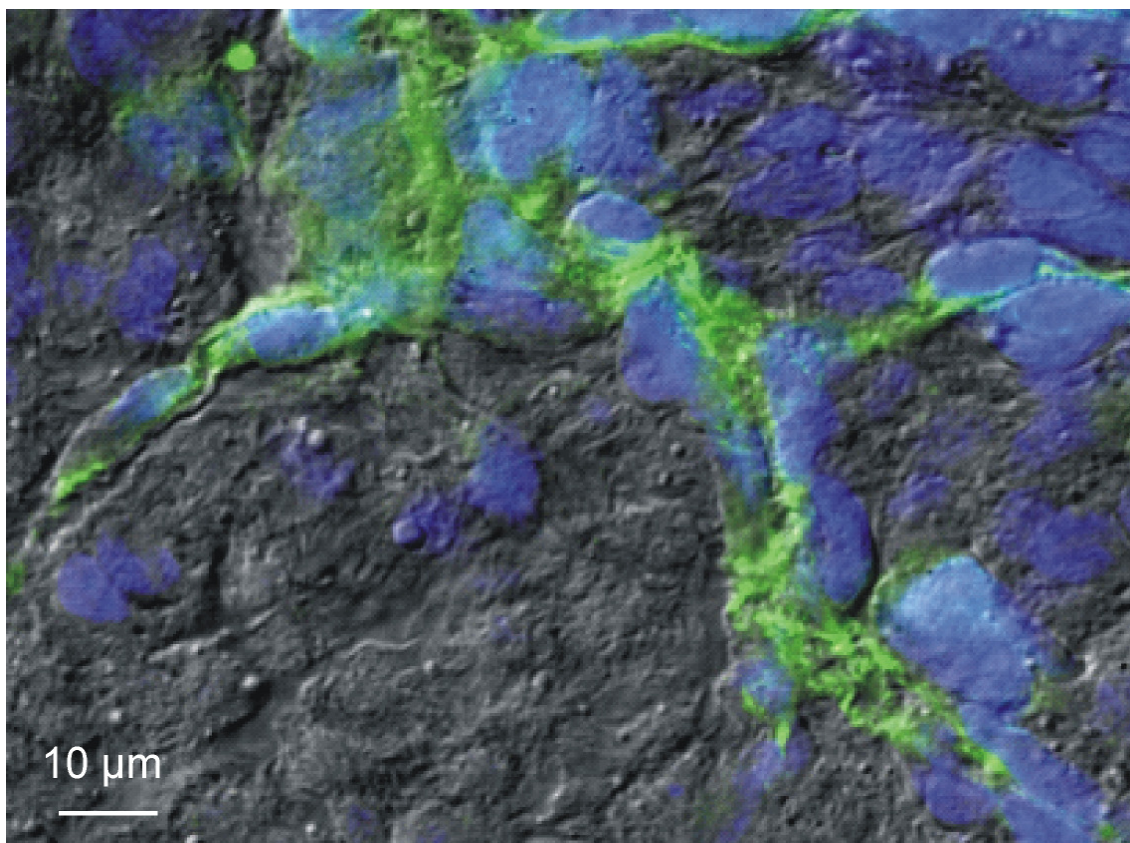
#### 3.1.2.1 Expression am Präparat und Kontrollgewebe

Eine Übersichtsaufnahme aus zusammengesetzten Einzelbildern des Saccus und Ductus endolymphaticus, wie beim V2-Rezeptor, konnte bei dem V1a-Rezeptor-fluoreszenzmarkierten Präparat nicht angefertigt werden, da die Fluoreszenzmarkierung unter der Belichtung des Mikroskops sehr schnell ausblüht. Obwohl dieses Phänomen wiederholt auftrat, konnte bisher keine Ursache eruiert werden. Die Abbildung wurde repräsentativ für die ca. 15 erstellten Gesamtpräparate aus dem Bereich des distalen Anteils eines Saccus endolymphaticus erstellt. In Abbildung 11 findet sich die spezifische Markierung entlang von Kapillargefäßstrukturen. Eine Markierung im Bereich der Epithelzellen des Saccus und Ductus endolymphaticus war nicht erkennbar. Somit konnte, bezogen auf das Epithel des Saccus und Ductus endolymphaticus, keine Expression des V1a-Rezeptors nachgewiesen werden. Die oberflächlich liegenden Kapillargefäßstrukturen sind im DIC-Bild erkennbar. Die Abbildung mit der DAPI-Färbung läßt die Kerne der Endothelzellen erkennen, die perlschnurartig aneinandergereiht sind.



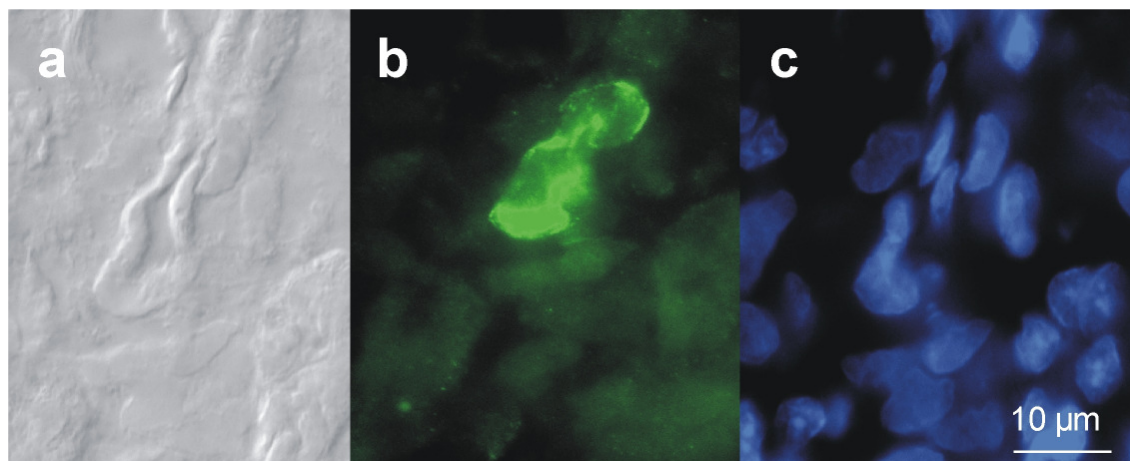
**Abbildung 11:** Repräsentativer Bildausschnitt des Häutchenpräparates des Saccus und Ductus endolymphaticus mit V1a-Rezeptor-Primärantikörperfärbung. V1a-Rezeptor-spezifische immunhistochemische Färbung aus dem intermediären Teil des Saccus endolymphaticus, in dem sich das Kapillargefäßnetz sehr dicht darstellte. (a) In der Differential-Interferenz-Kontrastierung sind die oberflächlich liegenden Kapillargefäßstrukturen erkennbar. (b) Die Immunfluoreszenzfärbung folgte den Kapillarendothelzellen, welche in der (c) DAPI-Markierung an den bohnenförmigen Zellkernen erkennbar sind, die perlschnurartig aneinandergereiht sind.

In Abbildung 12 wurden die drei verschiedenen Darstellungsweisen des Häutchenpräparates, welches mit Immunfluoreszenzmethoden gefärbt worden war, übereinanderprojiziert. Im linken unteren Bildabschnitt wurde die nahezu unversehrte Oberflächenstruktur des Präparates dargestellt. In der linksseitigen Bildmitte wurden einige Kapillarendothelzellen mit einem blau gefärbten Zellkern und einer, der Zellmembran folgenden, grünen und für V1a-Rezeptor-spezifischen Markierung erkennbar. So konnte die Spezifität für Kapillarendothelzellen und die membranständige Markierung für den V1a-Rezeptor besonders gut herausgearbeitet werden.



**Abbildung 12:** DIC-Darstellung, V1a-Rezeptor-spezifische immunhistochemische Darstellung (Alexa 488) und die Zellkerngegenfärbung (DAPI) wurden übereinander projiziert. Im linken unteren Bildabschnitt zeigt sich deutlich die unversehrte Oberflächenstruktur des Häutchenpräparates des Saccus endolymphaticus. Die Immunfluoreszenzmarkierung des Fluorophors Alexa 488 zeigt sich grün entlang des Kapillargefäßendothels, dessen Zellkerne nach DAPI-Färbung blau dargestellt sind.

Im Kontrollgewebe Nierenkortex (Abbildung 13) wurde repräsentativ eine Kapillargefäßschlinge angeschnitten, welche sich im DIC-Bild durch ein von Kapillarendothelzellen eingerahmtes Lumen abbildet. Die spezifisch gegen V1a-Rezeptoren gerichtete Fluoreszenzmarkierung der Endothelzellen zeigte sich deutlich im mittleren Bildabschnitt. Die Markierung imponierte eher randständig. Die Endothelzellen wiesen bohnenförmige Zellkerne auf, was im rechten Bildausschnitt, der DAPI-Färbung, deutlich wurde.



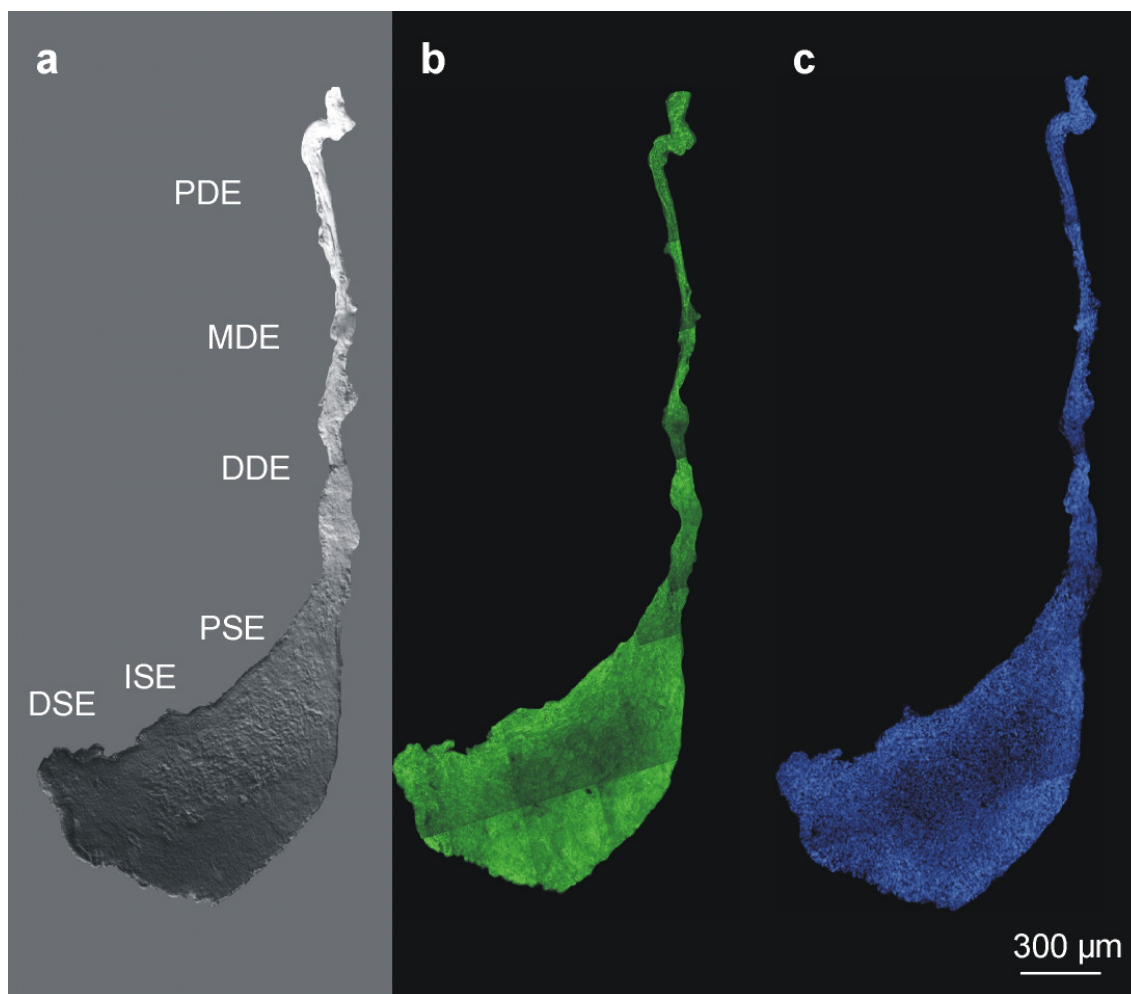
**Abbildung 13:** Bildausschnitt des Nierenkortex mit V1a-Rezeptor-Primärantikörperfärbung. (a) Die Differential-Interferenz-Kontrastierung eines Nierenkortexpräparates stellt Kapillarendothelien dar. In der Bildmitte zeigt sich eine Kapillare, deren Lumen beidseits von Kapillarendothelzellen eingerahmt ist. (b) Die V1a-Rezeptor-spezifische immunohistochemische Färbung der Kapillargefäßschlingen zeigt eine deutliche Markierung entlang der Endothelzellen. Die Fluoreszenzmarkierung erschien vor allem randständig. (c) Die Zellkerngegenfärbung des Nierenkortexpräparates stellt die Kapillarendothelzellkerne als blaue, flache, bohnenförmige Kerne dar.

### 3.1.3 V1b-Rezeptor Nachweis - Immunhistochemie

#### 3.1.3.1 Expression am Präparat und Kontrollgewebe

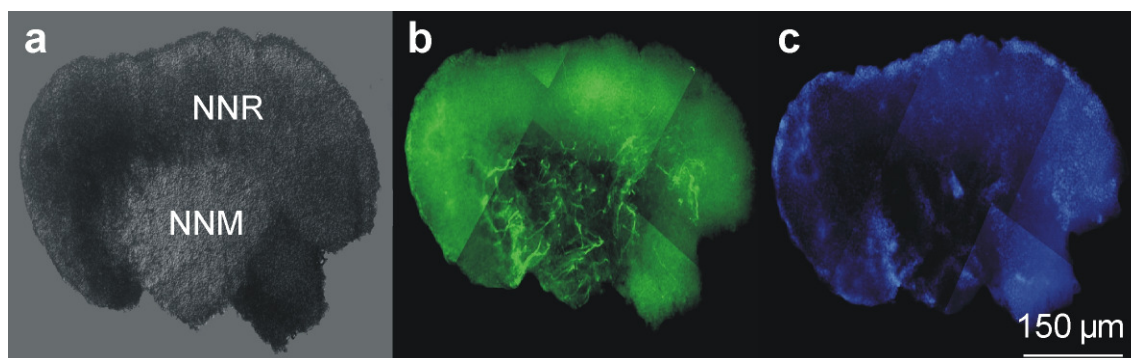
Die Darstellung der Häutchenpräparate erfolgte analog zu den vorhergehenden Abbildungen des Saccus und Ductus endolymphaticus. Auch für den V1b-Rezeptor zeigte sich an ca. 15 Präparaten eine Immunfluoreszenz nach spezifischer Färbung, welche über das gesamte Präparat verteilt war. Im Vergleich zu der gitternetzartigen Verteilung der V2-Rezeptor-spezifischen Markierung in Abbildung 4b erschien die V1b-Rezeptor-spezifische Markierung diffuser über Saccus und Ductus endolymphaticus verteilt. Es fielen jedoch abwechselnd stärker und schwächer markierte Bereiche auf. Negativkontrollen der Häutchenpräparate entsprachen im Ergebnis der Abbildung 5 und wurden nicht gesondert als eigene Abbildung dargestellt.





**Abbildung 14:** Übersichtsdarstellungen des Häutchenpräparates des Ductus und Saccus endolymphaticus der 4 Tage alten Ratte mit V1b-Rezeptor-Primärantikörper. (a) In der DIC-Darstellung zeigt sich eine intakte Oberflächenstruktur des gesamten Häutchenpräparates. (b) Die V1b-Rezeptor-spezifische Markierung zeigt sich über das gesamte Häutchenpräparat des Saccus und Ductus endolymphaticus verteilt. Auffallend sind stärker und schwächer markierte Bereiche, die jedoch nicht einem gitternetzartigen Verteilungsmuster wie bei dem V2-Rezeptor folgen. (c) Die DAPI-Markierung zeigt ein ausgeglichenes verteiltes Muster von blau gefärbten Zellkernen.

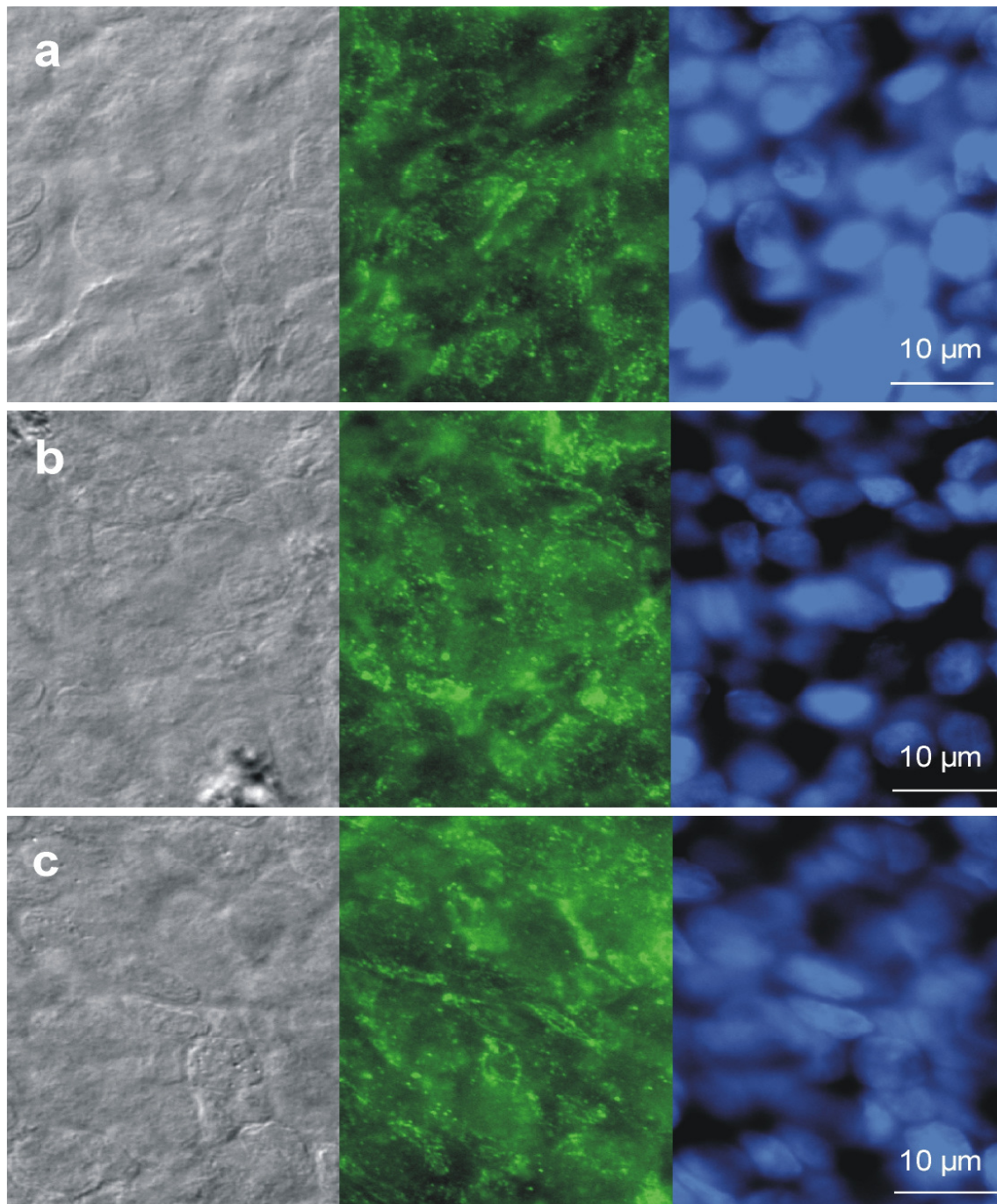
Die Übersichtsaufnahme der Positivkontrolle, ein whole-mount-Präparat einer Nebenniere, wurde ebenfalls aus vielen Einzelaufnahmen zusammengesetzt. Die in Abbildung 15b gezeigten strangförmig-faserartigen Markierungen entsprechen den chromaffinen Zellen. In einer angefertigten Negativkontrolle zeigten sich in dem korrespondierenden Areal keine spezifischen Markierungen. Es fand sich dort eine unspezifische Hintergrund-fluoreszenz-markierung im Bereich der Nebennierenrinde (NNR). Die Mikroskopbilder der Negativkontrolle wurden nicht abgebildet.



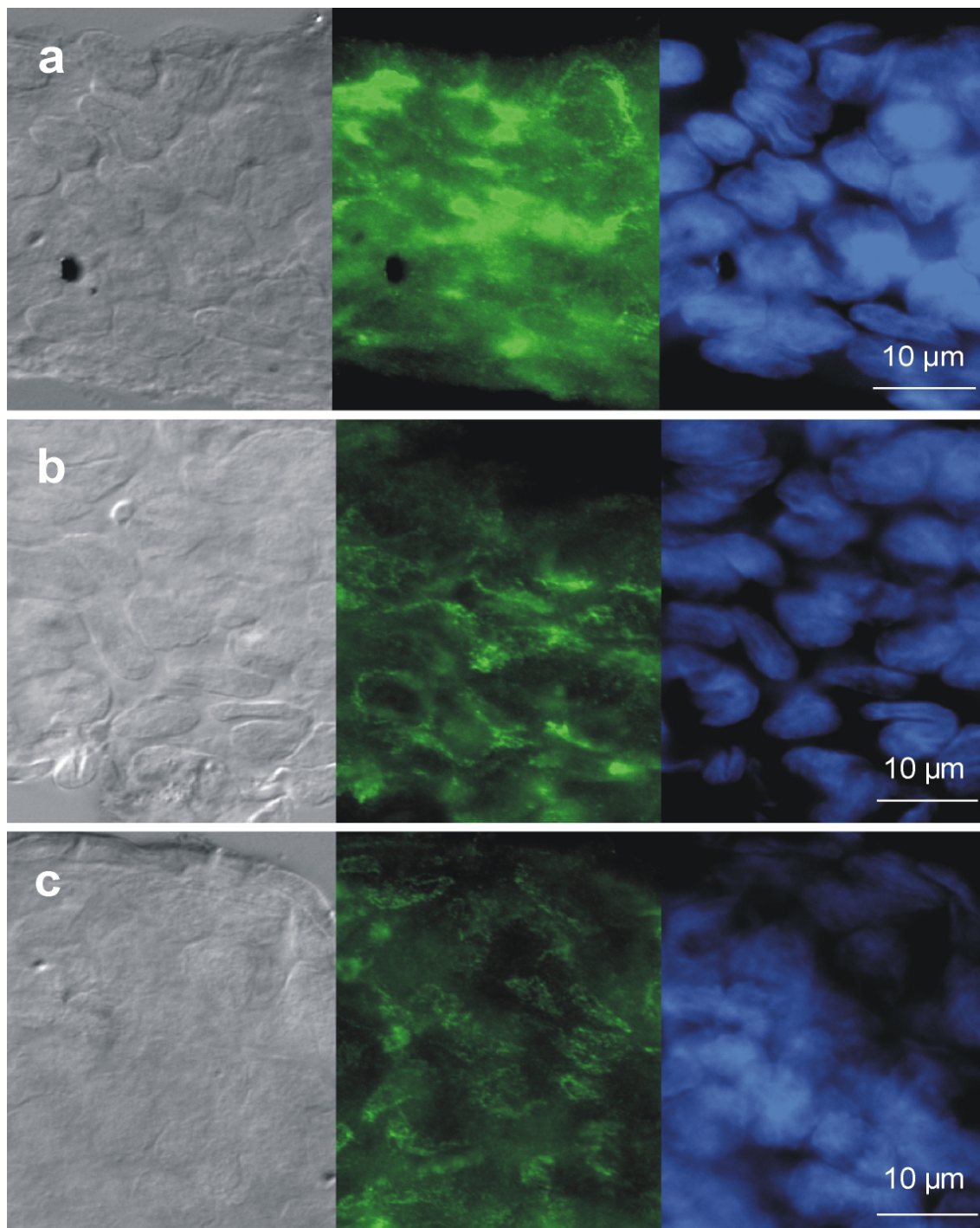
**Abbildung 15:** Übersichtsdarstellung eines Schnittpräparats der Nebenniere der postnatalen Ratte (Tag 4) als Kontrollgewebe mit V1b-Rezeptor Primärantikörper. (a) Die Differential-Interferenz-Kontrastierung erlaubt eine Differenzierung des Präparates in die Nebennierenrinde (NNR) und das Nebennierenmark (NNM), welches sich als heller Kegel in der Mitte des Präparates darstellt. (b) In der V1b-Rezeptor Darstellung ließ sich die spezifische Markierung ins Nebennierenmark lokalisieren. Die Markierung stellt sich faserartig dar, was den strangförmig angeordneten chromaffinen Zellen entspricht. Die Nebennierenrinde zeigt eine deutliche Hintergrundfluoreszenz. (c) In der DAPI-Darstellung zeigt sich im Schnitt ein weitgehend gut erhaltener Zellverband.

### 3.1.3.2 Detaildarstellung der V1b-Rezeptor-Expression

Die Abbildungen 16a-c stellen die Darstellungen von DIC-, DAPI- und V1b-Rezeptor-spezifischen Immunfluoreszenzfärbungen verschiedener Abschnitte des Saccus und Ductus endolymphaticus gegenüber. Sowohl Saccus als auch Ductus endolymphaticus wurden in einen distalen, einen intermediären und einen proximalen Anteil untergliedert. In allen Abschnitten des Saccus endolymphaticus war eine deutliche Immunfluoreszenzmarkierung zu sehen, die jedoch im Vergleich zu der randständigen V2-Rezeptor-spezifischen Markierung auch im Bereich des Zytoplasmas zu finden war. Die innerhalb der Zellmembran befindlichen Markierungen deuteten auf internalisierte, somit im Zytoplasma liegende, Rezeptoren hin, die bei Bedarf über Endosomen wieder in die Zellmembran verbracht werden können. Die verwaschene Fluoreszenzmarkierung im proximalen Anteil des Saccus endolymphaticus konnte auf Überlagerungen durch Durafaserreste zurückgeführt werden.



**Abbildung 16:** Detaildarstellung der V1b-Rezeptor-Expression an Ausschnitten des Häutchenpräparates des Saccus endolymphaticus der postnatalen Ratte. Die Differential-Interferenz-Kontrastierung (linke Bildreihe) des Häutchenpräparates zeigt die Oberflächenstruktur der Zellen. Die V1b-Rezeptor spezifische immunhistochemische Färbung (mittlere Bildreihe) zeigt die einerseits membranständige und andererseits zytoplasmatische Lokalisation des V1b-Rezeptors. Die Zellkerngegenfärbung (DAPI) am Häutchenpräparat des Saccus endolymphaticus zeigt die Lokalisation der einzelnen Zellen anhand der blauen Darstellung der Zellkerne zueinander (rechte Bildreihe). (a) Distaler Anteil des Saccus endolymphaticus, (b) Intermediärer Anteil des Saccus endolymphaticus, (c) Proximaler Anteil des Saccus endolymphaticus.

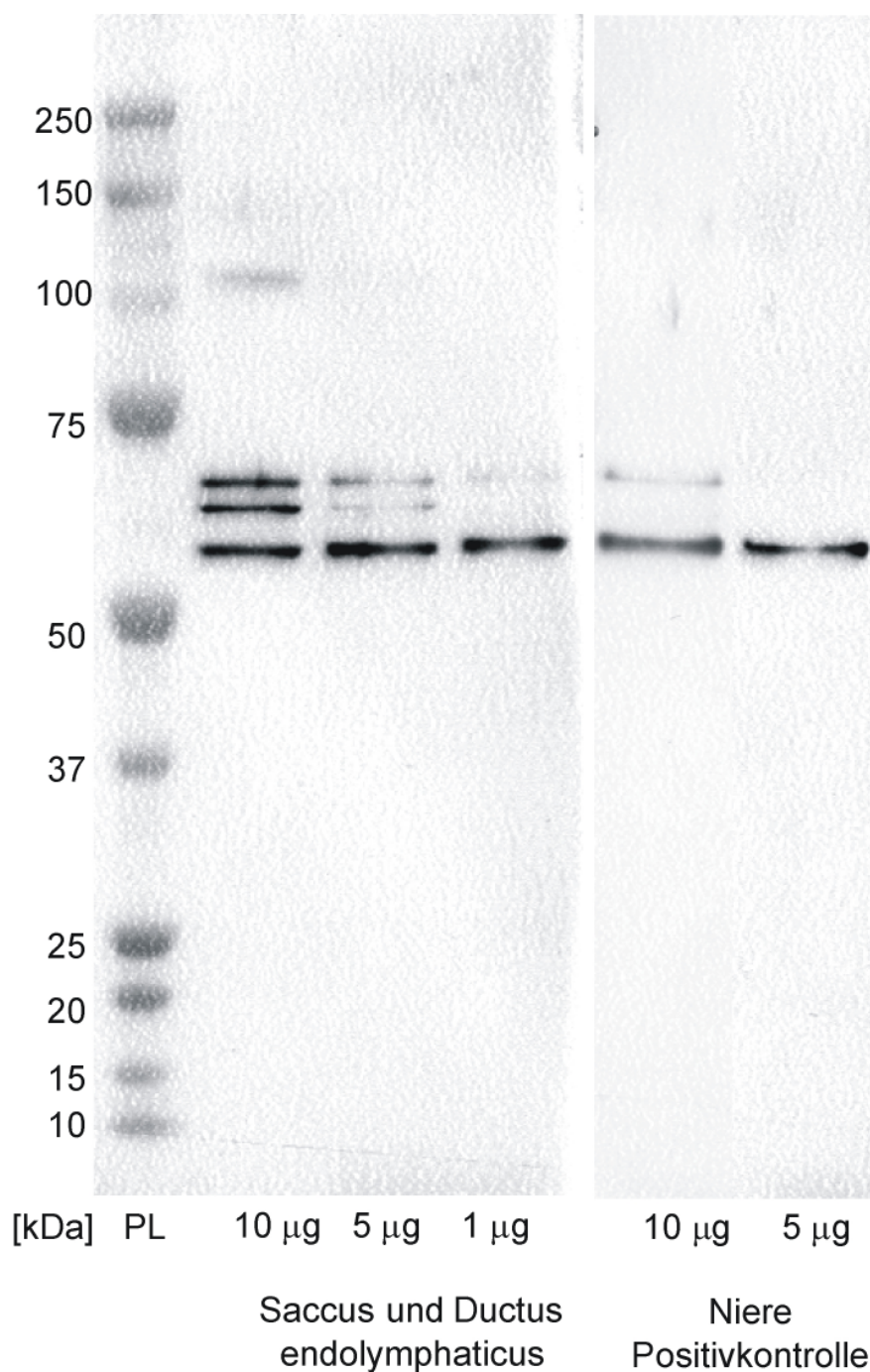


**Abbildung 17:** Detaildarstellung der V1b-R-Expression an Ausschnitten des Häutchenpräparates des Ductus endolymphaticus. Die Differential-Interferenz-Kontrastierung zeigt die Oberflächenstruktur der Zellen, die hier im Vergleich zu den Abbildungen des Saccus endolymphaticus verwaschener erscheint. (linke Bildreihe) Die V1b-Rezeptor-spezifische immunhistochemische Markierung zeigt sich sowohl entlang der Zellmembranen als auch im Zytoplasma gelegen (mittlere Bildreihe) Die Zellkerngegenfärbung (DAPI) am Häutchenpräparat des Ductus endolymphaticus zeigt die Lokalisation der Zellen anhand der blauen Darstellung der jeweiligen Zellkerne. (a) Distaler Anteil des Saccus endolymphaticus, (b) Intermediärer Anteil des Saccus endolymphaticus, (c) Proximaler Anteil des Saccus endolymphaticus.

Im Bereich des gesamten Ductus endolymphaticus (Abbildung 17a-c) erschien die Dichte der Immunfluoreszenzmarkierungen geringer als in den Abbildungen des Saccus endolymphaticus (Abbildung 16a-c). Dieses Ergebnis entspricht den Darstellungen des V2-Rezeptors beim Vergleich des Saccus und Ductus endolymphaticus.

### 3.2 Immunoblot – V2-Rezeptor

Das V2-Rezeptorprotein konnte im Western Blot in den Gewebepreparationen des Saccus und Ductus endolymphaticus nachgewiesen werden. In der Abbildung 19 ist die spezifische Bande bei ca. 60 kDa zu erkennen. Die Banden konnten bei Einsatz einer Proteinmenge aus Gewebepreparationen des Saccus und Ductus endolymphaticus von 10 µg, 5 µg und 1 µg nachgewiesen werden. Bei sinkender Proteinmenge lassen die Markierungen der Mehrfachbanden nach. Der Proteinleiter in der Mitte der Abbildung zeigt die Referenzbanden der Molekulargewichte in der Einheit kDa an. Die Skalierung des verwendeten Proteinleiters ist nicht linear. Das Molekulargewicht von 62 kDa repräsentiert eine glykosilierte Form des Rezeptors, worauf die Ausprägung als Mehrfachbande hinweist. Die Ergebnisse des Kontrollgewebes Niere sind linksseitig des Proteinleiters dargestellt. Hier ist nur eine Doppelbande erkennbar, was auf eine abweichende Form der Glykosylierung des Rezeptorproteins zurückgeführt werden kann. Die Markierungen auf identischer Höhe weisen die Existenz des V2-Rezeptorproteins in den Gewebeproben des Saccus und Ductus endolymphaticus eindeutig nach. Das gezeigte Ergebnis des Western Blot ist repräsentativ für weitere Immunoblot mit Gewebe aus dem Nierenmark und von Saccus und Ductus endolymphaticus. Bei Verwendung einer höheren Proteinkonzentration waren die resultierenden Banden sehr stark ausgeprägt und waren teilweise nicht mehr gegeneinander abgrenzbar.



**Abbildung 18:** Western-Blot mit Darstellung der spezifischen V2-Rezeptorbanden der glykosilierten Form des V2-Rezeptors. Eine spezifische Bande zeigte sich bei einer aufgetragenen Menge von 10 µg und 5 µg einer Gewebepreparation von Saccus und Ductus endolymphaticus sehr deutlich. Bei der Menge von 1 µg erschien nur noch eine sehr schwache Markierung. Die glykosilierte Form des Rezeptors zeigt sich typischerweise in der Ausprägung als Doppelbande/ Mehrfachbande (Nonoguchi et al., 1995). Linksseitig in der Abbildung sind die Banden des Kontrollgewebes Niere als Positivkontrolle dargestellt. Der Proteinleiter (PL) in der Mitte der Abbildung zeigt die Referenzbanden der Molekulargewichte in der Einheit kDa an.

## 4 DISKUSSION

Der Morbus Menière ist eine bis heute nicht kausal erforschte Erkrankung. Demzufolge existiert bisher auch keine kausal begründbare Therapie. Die Symptomtrias mit fluktuierender Tieftonschwerhörigkeit, Tinnitus und rezidivierenden Drehschwindelattacken sowie ein Hydrops des endolymphatischen Systems kennzeichnen diese Erkrankung. Viele Forschungsarbeiten geben Hinweise auf einen Zusammenhang mit einem Volumenregulationssystem im endolymphatischen System, vergleichbar dem in der Niere. Die detaillierte Kenntnis dieses Volumenregulationssystems würde es eventuell erlauben, gezielt ein Medikament zu entwickeln, welches den Hydrops im endolymphatischen System vermindert, um Patienten mit Morbus Menière effektiv therapieren zu können.

### 4.1 V2-Rezeptor

In bisherigen Studien wurde der V2-Rezeptor im Saccus und Ductus endolymphaticus auf mRNA-Ebene mittels RT-PCR nachgewiesen. Nachweisbare mRNA wird jedoch nicht zwingend in ein funktionsfähiges Protein umgesetzt (Furuta et al., 1998). Ziel dieser Arbeit war es, den Nachweis des V2-Rezeptors auf Proteinebene mittels Immunoblot zu führen und die Expression des V2-Rezeptors immunzytochemisch am Häutchenpräparat nachzuweisen. Die Auswahl von vier Tage alten Ratten (postnatal Tag 4) für die hier durchgeführten Gewebepräparationen erfolgte aufgrund von Ergebnissen, die die stärkste Expression der cDNA für den V2-Rezeptor am vierten postnatalen Tag festgestellt hatten (Kumagami et al., 1998). Eine verminderte Expression des V2-Rezeptors im Innenohrgewebe wurde bei adulten Tieren beschrieben (Kumagami et al., 1998). Bei einen Tag alten Ratten konnte keine Expression des V2-Rezeptors festgestellt werden (Kumagami et al., 1998). Eine andere Arbeitsgruppe beschrieb eine stärkere Expression des V2-Rezeptors und des V1a-Rezeptors bei Jungtieren (p0 und p8) im Verhältnis zu adulten Ratten (Furuta et al., 1998). Ein weiterer positiver Aspekt der vier Tage alten Tiere zeigte sich bei der Präparation. Die Darstellung des Saccus und Ductus endolymphaticus mit mikrochirurgischen Instrumenten gelang bei dem sehr jun-

gen und somit weichen Knochen besser. Dura und Bindegewebsfasern sind bei adulten Tieren nicht ohne erhebliche Zerstörung des Gewebes des Saccus und Ductus endolymphaticus zu lösen. Nachteilig war die geringe Größe des Endpräparates, wodurch vor allem die Färbeschritte schwierig durchzuführen waren.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig der Saccus und Ductus endolymphaticus von vier Tage alten Ratten als Gesamtpräparat gewonnen und mittels Immunhistochemie und Immunoblot auf das Vorhandensein von Vasopressin-Rezeptoren untersucht. Die eigenen Ergebnisse wiesen die Expression des V2-Rezeptors im Häutchenpräparat des Saccus und Ductus endolymphaticus mittels Immunhistochemie nach. Im Immunoblot gelang der V2-Rezeptor-Nachweis auf Proteinebene.

#### 4.1.1 V2-Rezeptor - Immunhistochemie

Die Übersichtsabbildungen der Häutchenpräparate der V2-Rezeptor spezifischen Immunfluoreszenzdarstellungen zeigen eine Expression des V2-Rezeptors im gesamten Saccus und Ductus endolymphaticus (Abbildung 4). Dass es sich um eine V2-Rezeptor-spezifische Markierung handelt, belegt einerseits die positive Markierung im Kontrollgewebe (Abbildung 6), andererseits die Negativkontrolle sowohl der Häutchenpräparate (Abbildung 5) als auch die des Nierengewebes (Abbildung 7). Aktuell wurde der V2-Rezeptor in den Epithelzellen im humanen Saccus endolymphaticus beschrieben. Der Nachweis erfolgte ebenfalls mittels Immunhistochemie (Taguchi et al., 2007). Im Sammelrohr der Niere sind V2-Rezeptor-spezifische Markierungen entlang der Zellgrenzen sichtbar (Nonoguchi et al., 1995). Die eigenen Detailaufnahmen des Saccus und Ductus endolymphaticus (Abbildung 9 und 10) lassen dies ebenfalls erkennen. Die gitternetzartige Verteilung der Markierung, die bereits in den Übersichtsdarstellungen zu erkennen ist, kann auf die Lokalisation entlang der Zellmembranen zurückgeführt werden, was der Eigenschaft des V2-Rezeptors als integrales Membranprotein entspricht (Lolait et al., 1992; Di Giovanni et al., 1994; Nonoguchi et al., 1995; Marples et al., 1999). Die membranständige Markierung wird vor allem in den Detailaufnahmen deutlich, wenn man die Lokalisa-



tion des Zellkerns in der DAPI Abbildung mit der Lokalisation der V2-Rezeptor-spezifischen Markierung in Beziehung setzt (Abbildung 6 und 9). Die Markierungen erscheinen in den verschiedenen Anteilen des Saccus und Ductus endolymphaticus unterschiedlich intensiv. Im Bereich des Saccus endolymphaticus sind sie prägnanter. Vorausgesetzt, dass im Saccus und Ductus endolymphaticus ein Volumenregulationssystem existiert, welches über den V2-Rezeptor gesteuert wird, könnte man auf eine Beteiligung des gesamten Gewebes des Saccus und Ductus endolymphaticus an der Volumenregulation schließen. Die prägnantere Markierung im Bereich des Saccus endolymphaticus ließe vermuten, dass dem Saccus endolymphaticus der Hauptanteil der Volumenregulation zukommt. Eine Überlagerung des Gewebes des Ductus endolymphaticus mit Durafaser-Resten ließ sich jedoch aufgrund der äußerst schwierigen Präparation nicht vermeiden, so dass auch eine Abschwächung der Markierung durch diese Überlagerung nicht ausgeschlossen werden kann.

Weiterhin kann man nach den Befunden in Abbildung 8 von einer Beteiligung, sowohl der arachnoideanahen als auch der sinusnah gelegenen Seite des Saccus und Ductus endolymphaticus an der Flüssigkeitsregulation ausgehen, da sich die V2-Rezeptor-spezifische Immunfluoreszenzmarkierung auf beiden Seiten in gleicher Art und Weise und Intensität darstellte. Eine Betrachtung der V2-Rezeptormarkierung auf der arachnoideanahen und sinusnahen Seite getrennt voneinander ist bisher in keiner der publizierten Untersuchungen erfolgt. In den Detailaufnahmen fallen Zellen auf, deren membranständige Markierung im Verhältnis zu benachbarten Zellen stärker ausfällt. Dies ist vor allem in den Abschnitten des Saccus endolymphaticus gut zu beobachten (Abbildung 9). Histomorphologischen Erkenntnissen folgend, gibt es ultrastrukturelle Ähnlichkeiten zwischen dem Epithel des Saccus und Ductus endolymphaticus und dem Epithel renaler Sammelrohre (Dahlmann und von Düring, 1995). Die Ribosomenreichen-Zellen (RRZ) sind histomorphologisch den Hauptzellen der Sammelrohre ähnlich. Der Zelltyp der RRZ findet sich im Saccus und Ductus endolymphaticus insgesamt betrachtet am häufigsten (Dahlmann und von Düring, 1995), was der Markierung eines engmaschigen Gitternetzes in den eige-

nen Ergebnissen gleichen kann. Der Ductus endolymphaticus, mit vorwiegend RRZ (Dahlmann und von Düring, 1995), weist in den eigenen Ergebnissen jedoch eine schwächere Markierung auf. Im intermediären Abschnitt des Saccus endolymphaticus wurde ein Anteil von 20-25 % Mitochondrienreiche-Zellen (MRZ) beschrieben (Dahlmann und von Düring, 1995). Bezogen auf die Häufigkeit der stärker markierten Zellen in den eigenen Auswertungen, könnten diese den RRZ entsprechen. Dies würde durch Ergebnisse bestätigt, bei welchen durch ADH eine erhöhte Translokation von AQP-2 in die Zellmembran in den Hauptzellen der Sammelrohre nachgewiesen werden konnte (Nielsen et al., 1995), welche histomorphologisch den RRZ entsprechen.

Untersuchungen zum erhöhten Membranturnover nach ADH-Gabe, im Sinne eines erhöhten Einbaus von AQP-2 in die Zellmembran von RRZ, würden diese Annahme ebenfalls bestätigen (Kumagami et al., 1998). Für die eigenen Ergebnisse bedeutet dies, dass man, ein Volumenregulationssystem mit ADH, V2-Rezeptor und AQP-2 vorausgesetzt, den V2-Rezeptor in den RRZ lokalisiert hätte. Auf ein selektives Vorhandensein der spezifischen Markierung in RRZ oder MRZ konnte aufgrund der lichtmikroskopischen Abbildungen jedoch nicht eindeutig geschlossen werden.

Subzellulär betrachtet, konnte der V2-Rezeptor in den Hauptzellen des Sammelrohres in die basolaterale Membran lokalisiert werden (Fushimi et al., 1993). Eine weitere Veröffentlichung wies den Rezeptor sowohl in der basolateralen als auch in der luminalen Membran nach, wobei ein negatives Feedback des luminal gelegenen Systems auf das basolaterale System ausgeübt wird (Nonoguchi, 1995). Aus den eigenen Ergebnissen kann bezüglich der subzellulären Lokalisation des V2-Rezeptors keine Aussage getroffen werden. Hier müssen elektronenmikroskopische Untersuchungen angeschlossen werden.

Aktuell konnte der V2-Rezeptor mittels Immunhistochemie im Saccus und Ductus endolymphaticus der Ratte (Nishimura et al., 2008) und des Menschen nachgewiesen werden (Taguchi et al., 2007). Hier muss jedoch auf die Unterschiede des V2-Rezeptors zwischen den Spezies Ratte und Mensch hingewiesen werden (Guillon et al., 2006). In aktuellen Untersuchungen in der Arbeitsgruppe Löwenheim konnte gezeigt werden, dass bei Ratten AQP2 in

unstimulierten RRZ vesikulär gebunden vorliegt. Eine 45 minütige Stimulation mit 1 mM ADH führte zu einer erhöhten AQP2-Expression in der basolateralen Membran der RRZ. Dieser Effekt war mit dem V2-Rezeptor-Antagonist H9400 blockierbar (Hirt et al, 2007).

Andere Studien bestätigen eine verminderte Expression von AQP2 mRNA nach Gabe von Lithium oder einem anderen ADH-Antagonisten (OPC-31260) (Takeda et al., 2003; Fukushima et al., 2005). Es gelang auch nachzuweisen, dass sowohl durch systemische Applikation von OPC-31260 als auch durch Applikation über die Rundfenstermembran der Cochlea, einem endolymphatischen Hydrops, entgegengewirkt werden kann (Takeda et al., 2006). Die systemische Applikation hatte gegenüber der lokalen Applikation über die Rundfenstermembran den Nachteil von toxischen Effekten auf die Cochlea. So kann indirekt, durch einen V2-Rezeptor-Antagonisten, die Existenz des V2-Rezeptors, eingebunden in ein Volumenregulationssystem, bestätigt werden. Im Hinblick auf eine klinische Relevanz des V2-Rezeptors, als Angriffsstelle für Medikamente zur Behandlung des Morbus Menière, könnte seine ubiquitäre Präsenz im Saccus und Ductus endolymphaticus sowohl auf der sinusnahen als auch auf der arachnoideanahen Seite von Bedeutung für verschiedene Applikationsformen und Dosierungen sein.

#### 4.1.2 V2-Rezeptor - Immunoblot

Das Molekulargewicht des V2-Rezeptors liegt bei 40,5 kDa (Lolait et al., 1992). Der V2-Rezeptor liegt meistens in einer glykosilierten Form vor, das heißt, dass sein Molekulargewicht aufgrund der Glykosilierung erhöht ist. Immunoblot-Untersuchungen wiesen Banden bei 62 kDa für die glykosilierte Form des Rezeptors nach (Nonoguchi et al., 1995). In der vorliegenden Arbeit konnte mittels des Immunoblot-Verfahrens erstmals der Protein-Nachweis des V2-Rezeptors mit der spezifischen Bande bei 62 kDa aus dem Gewebe des Saccus und Ductus endolymphaticus von vier Tage alten Ratten geführt werden (Abbildung 18). Dieses Ergebnis konnte in mehreren aufeinander folgenden Versuchsreihen reproduziert werden. Das Vorhandensein eines Bausteines auf Proteinebe-

ne des ADH-AQP2-Volumenregulationssystems im Saccus und Ductus konnte in der vorliegenden Arbeit somit nachgewiesen werden.

Dieses Ergebnis bestätigt Untersuchungen, welche cDNA des V2-Rezeptors und des AQP-2 bei vier Tage alten und adulten Ratten nachgewiesen hatten (Kumagami et al., 1998). Getrennte Gewebefractionen von Saccus und Ductus endolymphaticus, von Stria vascularis, des Vestibularorgans und der Reissner-Membran wurden auf die Expression des V2-Rezeptors mittels PCR untersucht (Kumagami und Löwenheim et al., 1998). Die Expression der V2-Rezeptor mRNA war im Saccus und Ductus endolymphaticus bei vier Tage alten Ratten und adulten Tieren am stärksten, wohingegen bei einem Tag alten Tieren im Saccus und Ductus endolymphaticus sowie in den übrigen Geweben nur eine äußerst schwache Expression erkennbar wurde. Im Widerspruch zu den Resultaten von Kumagami und Löwenheim standen die Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Furuta. Sie wiesen in der Cochlea von neugeborenen Ratten mRNA des V2-Rezeptors nach. Bei adulten Tieren gelang dieser Nachweis jedoch nicht (Furuta et al., 1998).

Ein Jahr später, als sich die Experimente auf den Saccus endolymphaticus beschränkten, wurde mittels PCR keine V2-Rezeptor mRNA nachgewiesen (Furuta et al., 1999). Ein Teil der Erklärung für diese Diskrepanz könnte im Entwicklungsstadium der Tiere liegen. Beide genannten Arbeitsgruppen beschrieben eine geringere Expression des V2-Rezeptors bei adulten Tieren, was auf eine Rolle des V2-Rezeptors in der Entwicklungsphase der Tiere hindeuten würde (Furuta et al., 1998). V2-Rezeptor mRNA wurde bei adulten Ratten jedoch in Innenohrgewebe einschließlich Cochlea, Vestibulum und Bogengängen nachgewiesen (Kitano et al., 1997).

Aktuell konnte mittels RT-PCR der V2-Rezeptor im Saccus endolymphaticus von Ratten nachgewiesen werden (Nishimura et al., 2008). Als Hauptgrund der unterschiedlichen Ergebnisse wurde gesehen, dass die untersuchten Fraktionen mehrere verschiedene Gewebe, wie Bindegewebe, Blutgefäße, Knochengewebe und Epithelzellen, enthielten (Furuta et al., 1999). Für unser Versuchsvorhaben wurde aus diesem Grund bei der aufwendigen Präparation des Saccus und Ductus endolymphaticus auf höchstmögliche Präzision geachtet. Durafasern

und Knochengewebe wurden bestmöglich entfernt. Im Hinblick auf die spezifische Untersuchung nur eines Zielgewebes können die weiteren Experimente sicherlich noch weiter verbessert werden.

#### 4.1.3 Der V2-Rezeptor als Bestandteil des Volumenregulationssystems

Setzt man voraus, dass der V2-Rezeptor im Saccus und Ductus endolymphaticus fester Bestandteil eines Volumenregulationssystems ist, wie es in der Niere bekannt ist, muss man auch die Ergebnisse für die übrigen Bestandteile dieses Systems betrachten. Korrespondierend zu den Nachweisen des V2-Rezeptors in der Niere (Nonoguchi et al., 1995), wurde AQP2-mRNA im Saccus und Ductus endolymphaticus nachgewiesen (Kumagami und Loewenheim et al., 1998; Beitz et al., 1999), während es in der Cochlea von adulten Tieren nicht nachgewiesen werden konnte (Takumi et al., 1998; Beitz et al., 1999).

Im Saccus endolymphaticus des Meerschweinchens konnte AQP-2 immunhistochemisch nicht gefunden werden (Zhong und Liu, 2003). AQP-2 konnte im menschlichen Saccus endolymphaticus sowohl als mRNA als auch als Protein nachgewiesen werden (Couloigner et al., 2004). Immunhistochemisch zeigte sich der AQP-2-Wasserkanal vorwiegend zytoplasmatisch lokalisiert, also in Vesikeln vorliegend (Couloigner et al., 2004). In einer anderen Studie wird ein Volumenregulationssystem in Strukturen der Cochlea, die im Kontakt zum Endolymphraum stehen, diskutiert (Mhatre et al., 2002).

Hier sind weiterführende Studien auf subzellulärer Ebene notwendig, die den Rezeptor und den zugehörigen Wasserkanal zeitgleich in denselben Zellen betrachten, um die physiologischen Zusammenhänge besser zu erschließen.

Funktionell betrachtet, wurde durch ADH Stimulation in Hauptzellen des Sammelrohres der Niere eine Translokation von AQP-2 in die apikale Membran beobachtet (Katsura et al., 1995). Es wurde auch eine erhöhte AQP2-mRNA-Expression durch vorherige ADH-Injektionen bei adulten Ratten sowohl in der Cochlea als auch im Saccus endolymphaticus nachgewiesen (Sawada et al., 2002). Dies ist auch in der Niere bereits bekannt (Terashima et al., 1998).

In kultivierten Zellen des Saccus endolymphaticus fand sich ein inhibitorischer Effekt von ADH auf den Membranumsatz (Kumagami et al., 1998). Bemerkenswert war, dass der inhibitorische Effekt von ADH durch Zugabe eines V2-Rezeptor-Antagonisten aufgehoben werden konnte. Die Arbeitsgruppe um Kitano fand nach einer ADH-Stimulation bei Ratten eine verminderte Expression von V2-Rezeptor mRNA im Innenohrgewebe, welches Cochlea, Vestibularapparat und den Nervus vestibulocochlearis einschloss (Kitano et al., 1999). Diese Erkenntnisse, konträr zum bisher etablierten Schema in der Niere, könnten die Erklärung der Entstehung des endolymphatischen Hydrops sein, wenn man den gegenläufigen Effekt unter der Voraussetzung der umgekehrten Orientierung des gesamten Volumenregulationssystems betrachtet. Die klinische Wirksamkeit eines V2-Antagonisten beim endolymphatischen Hydrops des Morbus Menière könnte unter diesen Voraussetzungen sinnvoll erscheinen.

#### 4.2 V1-Rezeptoren

Der Nachweis der V1a- und V1b-Rezeptoren wurde nur mittels Immunhistochemie im Saccus und Ductus endolymphaticus und den Kontrollgeweben geführt (Abbildung 11-17). Auf einen Nachweis der V1a- und V1b-Rezeptoren auf Proteinebene wurde verzichtet, da die Untersuchungen des V1a- und V1b-Rezeptors bisher nicht im Mittelpunkt des Interesses für die Morbus Menière-Forschung standen und der Protein-Nachweis mittels Western-Blot sehr aufwändig und kostspielig ist.

##### 4.2.1 V1a-Rezeptor - Immunhistochemie

Die Arbeitsgruppe um Furuta wies V1a-Rezeptor mRNA in der Cochlea nach (Furuta et al., 1998). Ein Jahr später gelang der Nachweis von V1a-Rezeptor mRNA im Saccus endolymphaticus. Der Nachweis des V1a-Rezeptors in einer in-situ-Hybridisierung gelang nicht (Furuta et al., 1999). In den eigenen Ergebnissen konnte keine spezifische V1a-Rezeptor-Markierung in den Zellen des Saccus und Ductus endolymphaticus nachgewiesen werden.

Die Markierungen in der vorliegenden Arbeit waren eindeutig gefäßspezifisch (Abbildung 11 und 12) und spiegeln die Ergebnisse von Briner wider, der V1a-Rezeptoren in Kapillarendothelzellen nachwies (Briner et al., 1992). Die Erklärung für einen Nachweis der V1a-Rezeptor mRNA sowohl in der Cochlea als auch im Saccus endolymphaticus (Furuta et al., 1998 und 1999) kann an den Bestandteilen von Kapillarendothelien in den verwendeten Gewebeproben liegen.

Die makroskopischen Ergebnisse von Dahmann und von Düring zur Gefäßversorgung des Saccus und Ductus endolymphaticus konnten anhand der Gesamtübersichten der Häutchenpräparate weitgehend nachvollzogen werden (Dahmann und von Düring, 1995).

Eine Gesamtübersicht von Saccus und Ductus endolymphaticus, wie bei dem V2-Rezeptor, konnte als Abbildung nicht erstellt werden, da die Fluoreszenzmarkierung unter der Mikroskopbeleuchtung sehr schnell ausbleicht. Die repräsentative Ausschnittaufnahme zeigt jedoch ein deutlich ausgeprägtes Kapillarnetz im intermediären Abschnitt des Saccus endolymphaticus (Abbildung 11). Im Ductus endolymphaticus konnten aus der Immunhistochemie keine exakten Parallelen zu makroskopischen Beschreibungen gezogen werden, welche im intermediären Abschnitt eine Reduzierung des Kapillarnetzes angaben (Dahmann und von Düring, 1995). Die verwaschene Darstellung und die starke Hintergrundfluoreszenz lagen an dem präparatorisch bedingten Faseranteil um den sehr schmalen Ductus endolymphaticus.

Einige Studien beschreiben einen negativ rückwirkenden Effekt auf den V2-Rezeptor über den V1a-Rezeptor, ausgelöst durch ADH. Diese Erkenntnisse bezogen sich nicht auf Gewebe des Saccus und Ductus endolymphaticus, sondern meist auf Nierengewebe, wo der V1a-Rezeptor in dieselben Zellen wie der V2-Rezeptor lokalisiert werden konnte (Nonoguchi et al., 1995; Tashima et al., 2001; Izumi et al., 2007). In den eigenen Ergebnissen konnte der V1a-Rezeptor lediglich im Bereich der Kapillarendothelien lokalisiert werden, was auch Angaben in der Literatur entspricht (Briner et al., 1992; Thibonnier et al., 1994). Durch weiterführende Studien muss die Rolle von V1a-Rezeptoren im Bereich des endolymphatischen Systems geklärt werden. Außerdem muss der Frage

nachgegangen werden, ob ein Zusammenhang zwischen dem V1a-Rezeptor und dem V2-Rezeptor und der Volumenregulation besteht.

#### 4.2.2 V1b-Rezeptor - Immunhistochemie

Immunhistochemische Färbungen für den V1b-Rezeptor wurden hier erstmals an Gewebe des Saccus und Ductus endolymphaticus durchgeführt. Die Immunhistochemie ergab ein positives Ergebnis mit einer relativ homogenen Verteilung über Saccus und Ductus endolymphaticus. Die detaillierten Abbildungen (Abbildung 16 und 17) weisen nicht eindeutig auf ein membranständiges Rezeptorprotein hin, wie bei dem V2-Rezeptor. Ein verstärkt intrazellulär vorgehaltener Rezeptorbestand, der bei Bedarf in die Zellmembran eingebaut werden kann, wurde in unseren Beobachtungen, aufgrund der Lokalisation der Markierungen, ebenfalls in Betracht gezogen. Aufgrund der punktförmigen, diffus intrazellulär verstreuten Markierungen könnte man auch eine unspezifische Färbung von intra- oder extrazellulären Epitopen vermuten.

Die Arbeitsgruppe um Furuta hatte V1b-Rezeptor cDNA mittels PCR in der Cochlea von Ratten nicht nachweisen können (Furuta et al., 1998). Hier sind weitere Untersuchungen bezüglich der exakten Lokalisation und einer eventuellen Bedeutung des V1b-Rezeptors für das endolymphatische System nötig.



## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Der Morbus Menière, benannt nach Prosper Menière, mit der Symptomtrias von fluktuierender Tieftonschwerhörigkeit, dem Tinnitus und den rezidivierenden Drehschwindelattacken ist seit ca. 150 Jahren bekannt. Eine kausale Therapie der Erkrankung existiert trotz vielschichtiger Forschung bis heute nicht, da die genauen Ursachen nicht geklärt werden konnten. Der endolymphatische Hydrops stellt das histopathologische Korrelat des Morbus Menière dar und bildet den Mittelpunkt der Forschungsarbeiten. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten die Hauptbestandteile des Volumenregulationssystems, wie es in der Niere existiert, auch im Saccus und Ductus endolymphaticus nachweisen. Die mittels Immunhistochemie oder PCR erzielten Ergebnisse waren jedoch teilweise widersprüchlich. So war es Ziel der vorliegenden Arbeit, Vasopressin Rezeptoren an Häutchenpräparaten des Saccus und Ductus endolymphaticus der Ratte nachzuweisen.

Der V2-Rezeptor konnte mittels Immunhistochemie im gesamten Saccus und Ductus endolymphaticus nachgewiesen werden. Der V1a-Rezeptor fand sich immunhistochemisch nicht in den Epithelzellen, sondern in den Kapillarendothelien des Saccus und Ductus endolymphaticus. Eine Interaktion des V1a- und des V2-Rezeptors wird somit nicht für wahrscheinlich gehalten. Beim V1b-Rezeptor konnte erstmals im Saccus und Ductus endolymphaticus ein immunhistochemischer Nachweis erzielt werden, welcher in weiteren Untersuchungen noch genauer eingeordnet werden muss. Der erstmalig geführte V2-Rezeptor-Nachweis im Immunoblot ist die entscheidende Grundlage für die Erklärung der Wirksamkeit der neuesten Therapieansätze des Morbus Menière. Bislang kann man sich anhand von Behandlungsalgorithmen mit den verschiedensten konservativen, medikamentösen und chirurgischen Therapien bei akutem und chronischem Morbus Menière behelfen (Coelho et al., 2008). Nur durch weitere intensive Grundlagenforschung in der Pathogenese des Morbus Menière kann eine Therapie, die bisher die Erkrankung nur kontrollieren konnte, zu einer heilenden Therapie werden.

## 6 ANHANG

## 6.1 Literaturverzeichnis

Beitz E., Kumagami H., Krippeit-Drews P., Ruppertsberg J. P. und Schultz J. E. (1999): Expression pattern of aquaporin water channels in the inner ear of the rat. *Hear Res* **132**, 76-84.

Bottrill I., Wills A., Mitchell L. (2003): Intratympanic gentamicin for unilateral Menière's disease: results of therapy. *Clin. Otolaryngol* **28**, 133-141.

Bradford M. M. (1976): A rapid and sensitive method of quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.

Briner V., Williams B., Tsai P., Schrier R.W. (1992): Demonstration of processing and recycling of biologically active V1 vasopressin receptors in vascular smooth muscle. *Proc Natl Acad Sci* **89**, 2854-2858.

Camilleri A.E., Howarth K.L. (2001): Prognostic value of electrocochleography in patients with unilateral Menière's disease undergoing sacculus surgery. *Clin Otolaryngol* **26** (3), 257-260.

Cawthorne T., Hewlett A. (1954): Menière's disease. *Proc R Soc Med* **47**, 663-670.

Coelho D., Lalwani A. (2008): Medical Management of Menière's Disease. *The Laryngoscope* **118**, 1099-1108.

Committee on Hearing and Equilibrium (1972): Menière's disease: criteria for diagnosis and evaluation of therapy for reporting. *Trans Am Ophthalmol Otolaryngol* **76**, 1462-1464.

Committee on Hearing and Equilibrium (1995): Committee on Hearing and Equilibrium guidelines for the diagnosis and evaluation of therapy in Menière's disease. *Otolaryngol Head Neck Surg* **113**, 181-185.

Costa S., de Sousa L.C.A., de Toledo Piza M.R. (2002): Menière's disease: overview, epidemiology, and natural history. *Clin. Otolaryngol* **35**, 455-495.

Couloigner V., Berrebi D., Teixeira M., Paris R., Florentin A., Bozorg Grayeli A., Cluzeaud F., Sterkers O., Peuchmaur M., Ferrary E. (2004): Aquaporin-2 in the human endolymphatic sac. *Acta Otolaryngol.* **124** (4), 449-53.

Dahlmann A., von Düring M. (1995): The endolymphatic duct and sac of the rat: a histological, ultrastructural und immunocytochemical investigation. *Cell Tissue Res* **282**, 277-289.

DiGiovanni S. R., Nielsen S., Christensen E.I., Knepper M.A. (1994): Regulation of collecting duct water channel expression by vasopressin in Brattleboro rat. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 8984-8988.

Duplay S. (1872): Des maladies de l'oreille interne. *Arch Gen Méd* **1**,711-722.

Dohlmann G.F., Johnsen W.H. (1959): Experiments on the mechanism of Menière's attacks. *Proc Can Otol Soc* **19**, 73.

Feldmann A.M. und Brusilow S.W. (1975): Effects of cholera toxin on cochlear endolymph production: Model for endolymphatic hydrops. *Proc Natl Acad Sci* **73**, 1761-1764.

Firsov D., Mandon B., Morel A., Merot J., Le Maout S., Bellanger A.c., de Roufignac C., Elalouf J.M., Buhler J.M. (1994): Molecular analysis of vasopressin receptors in the rat nephron. Evidence for alternative splicing of the V2 receptor. *Pflugers Arch.* **429**(1):79-89.

Flourens P. (1842): Recherches expérimentales sur les propriétés du système nerveux. Ed.2 Paris.

Fowler E. (1948): Streptomycin treatment of vertigo. *Trans Am Acad Ophthal Otolaryng* **52**, 293.

Fukushima M., Kitahara T., Uno Y., Fuse Y., Doi K., Kubo T. (2002): Effects of intratympanic injection of steroids on changes in rat inner ear aquaporin expression. *Acta Otolaryngol* **122**(6):600-6.

Fukushima K., Takeda T., Kakigi A., Takeda S., Sawada S., Nishioka R., Azuma H., Taguchi T. (2005): Effects of Lithium on Endolymph Homeostasis and Experimentally Induced Hydrops. *ORL* **67**, 282-288.

Furuta H., Luo L., Ryan A., Mori N. (1998): Expression of mRNA encoding vasopressin V1a, vasopressin V2, and ANP-B receptors in the rat cochlea. *Hear Res* **117**, 140-148.

Furuta H., Sato C., Kawaguchi Y., Miyashita T., Mori N. (1999): Expression of mRNAs Encoding Hormone Receptors in the Endolymphatic Sac of the Rat. *Acta Otolaryngol* **119**, 53-57.

Fushimi K., Uchida S., Hara Y. (1993): Cloning and expression of apical membrane water channel of rat kidney collecting tubule. *Nature* **361**, 549-552.

Fushimi K., Sasaki S., Marumo F. (1997): Phosphorylation of serine 256 is required for cAMP-dependent regulatory exocytosis of the aquaporin-2 water channel. *J Biol Chem.* **272**(23):14800-4.

Grazzini E., Lodboerer A. M., Perez-Martin A., Joubert D. und Guillon G. (1996): Molecular and functional characterization of V<sub>1b</sub> vasopressin receptor in rat adrenal medulla. *Endocrinology* **137** (9), 3906-3914.

Green K., Saeed S. (2002): Accurate diagnosis of Menière's disease. *Practitioner* **246**, 26-32.

Gu F. Han H., Zhang L. (2006): Effects of vasopressin on gene expression in rat inner ear. **222**, 70-78.

Guild S. (1927): The circulation of the endolymph. *Am J Anat* **39**, 57-81.

Guillon G, Pena A, Murat B, Derick S, Trueba M, Ventura MA, Szeto HH, Wo N, Stoev S, Cheng LL, Manning M. (2006): Position 4 analogues of [deamino-Cys(1)] arginine vasopressin exhibit striking species differences for human and rat V(2)/V(1b) receptor selectivity. *J Pept Sci.* **12**, 190-198.

Haid C.T., Watermeier D., Wolf S.R., Berg M. (1995): Clinical survey of Menière's disease: 574 cases. *Acta Otolaryngol Suppl* **520**, 251-255.

Hallpike C., Cairns H. (1938): Observations on the pathology of Menière's disease. *J Laryngol Otol* **53**, 624-654.

Hamann K.-F. und Arnold W. (1999): Menière's disease. *Adv Otolaryngol* **55**, 137-168.

Harrison M.S., Naftalin L. (1968): Menière's disease. CC Thomas Springfield Ill.

Helms J. (1985): Die chirurgische Therapie des Morbus Menière. *Arch Otorhinolaryngol Suppl* **1**, 67-118.

Helms J. (1996): Saccotomie, Labyrinthektomie, transtemporale Neurektomie, translabyrinthäre Neurektomie. In: Helms J., Jahrsdoerfer R.A.: Kopf- und Halschirurgie, Band 2 Ohr, 2. Auflage, 1996. Thieme; Stuttgart, New York: p. 278-300.

Hirt B., Gleiser C., Taguchi D., Müller M., Löwenheim H. (2007): Funktionelle Testung der zellulären Wasserpermeabilität des endolymphatischen Sackes. Meeting Abstract 79. Jahreshauptvers. Dt. Gesellsch. HNO-Heilkunde.

Innamorati G., Lolait S. J. und Birnbaumer M. (1996): Sequence identity between the rat and human vasopressin V<sub>1a</sub> receptors. *Biochem J* **314**, 709-711.

Izumi Y, Nakayama Y, Mori T, Miyazaki H, Inoue H, Kohda Y, Inoue T, Nonoguchi H, Tomita K. (2007): Downregulation of vasopressin V2 receptor promoter activity via V1a receptor pathway. *Am J Physiol Renal Physiol.* **292**(5), 1418-1426.

Jahnke K. (1994): Stadiengerechte Therapie der Menièreschen Krankheit. Deutsches Ärzteblatt **7**, 340-344.

Jard S. (1998): Vasopressin receptors. A historical survey. Adv Exp Med Biol. **449**:1-13.

Katsura T., Verbavatz J.M., Farinas J., Ma T., Ausiello D.A., Verkmann A.S., Brown D. (1995): Constitutive and regulated membrane expression of aquaporin 1 and 2 water channels in stably transfected LLC-PK1 epithelial cells. Proc Natl Acad Sci USA **92**, 7271-7216.

Kimura R. S. und Schuknecht H. F. (1965): Membranous hydrops in the inner ear of the guinea pig after obliteration of the endolymphatic sac. Pract Oto-Rhino-Laryngol **27** (6), 343-354.

Kimura R. S. (1982): Animal models of endolymphatic hydrops. Am J Otolaryngol **3** (6), 447-451.

Kitahara M. (1991): Bilateral aspects of Menière's disease. Menière's disease with bilateral fluctuant hearing loss. Acta Otolaryngol Suppl **485**, 74-77.

Kitano H., Takeda T., Suzuki M., Kitanishi T., Yazawa Y., Kitajima K., Kimura H. und Tooyama I. (1997): Vasopression and oxytocin receptor mRNAs are expressed in the rat inner ear. NeuroReport **8**, 2289-2292.

Kitano H., Suzuki M., Kitanishi T., Yazawa Y., Kitajima K., Isono T., Takeda T., Kimura H., Tooyama I. (1999): Regulation of inner ear fluid in the rat by vasopressin. Neuro Report **10**, 1205-1207.

Klockhoff I., Lindblom U. (1966): Endolymphatic hydrops revealed by glycerol test. Preliminary report. Acta Otolaryngol **61**, (5), 459-462.

Koch T. und Zenner H.P. (1988): Adenylate cyclase and G-proteins as a signal transfer system in the guinea pig inner ear. Arch Otorhinolaryngol **245**, 82-87.

Kumagami H., Loewenheim H., Beitz E., Wild K., Schwartz H., Yamashita K., Schultz J., Paysan J., Zenner H. P. und Ruppertsberg J. P. (1998): The effect of anti-diuretic hormone on the endolymphatic sac of the inner ear. Eur J Physiol **436**, 970-975.

Lang F. (1998): Schwerhörigkeit. In: Silbernagl S, Lang F: Taschenatlas der Pathophysiologie, Thieme; Stuttgart, New York, 328.

LaRouere M.J. (1996): Surgical treatment of Menière's disease. Otolaryngologic Clinics of North America **29**, 311-322.

Lawrence M. und McCabe B. (1959): Inner ear mechanics and deafness, special considerations of Menière's syndrome. J Am Med Assoc **171**, 1927-1932.

Lehnhardt E., Janssen T. (2001): Physiologie und Pathophysiologie des Innenohres. In: Lehnhardt E, Laszig R: Praxis der Audiometrie, 8. Auflage, Thieme; Stuttgart, New York, 41-52.

Lindsay J.R. und von Schulthess G. (1958): An unusual case of labyrinthine hydrops. *Acta Otolaryngol* **49**, 315-324.

Lohuis P. J. F. M., Klis S. F. L., Klop M. C., van Emst M. G. und Smoorenburg G. F. (1999): Signs of endolymphatic hydrops after perilymphatic perfusion of the guinea pig cochlea with cholera toxin; a pharmacological model of acute endolymphatic hydrops. *Hear Res* **137**; 103-113.

Lolait S., O'Carroll A.-M., McBride O., König M., Morel A. und Brownstein M. (1992): Cloning and characterization of a vasopressin V<sub>2</sub> receptor and possible link to nephrogenic diabetes insipidus. *Nature* **357**, 336-339.

Lolait S., O'Carroll A.-M., Mahan L. C., Felder C. C., Button D. C., Mezey E. und Brownstein M. J. (1995): Extrahypophysäre Expression des Ratte V<sub>1b</sub> Vasopressinrezeptor Gens. *Neurobiol* **92**, 6783-6787.

Lundquist P.G. (1965): The endolymphatic duct and sac in the guinea pig: an electron microscopic and experimental investigation. *Acta Otolaryngol Suppl.* **201**, 1-108.

Lutz E.G. (1974): Lithium carbonate for Menière's disease. *J Med New Jersey* **71**, 502.

Mancini F., Catalani M., Carru M., Monti B. (2002): History of Menière's disease and its clinical presentation. *Otolaryngol Clin N AM* **35**, 565-580.

Marples D., Frokiaer J., Nielsen S. (1999): Long-term regulation of aquaporins in the kidney. *Am J Physiol* **276**, 331-339.

Mhatre A. N., Jero J., Chiappini I., Bolasco G., Barbara M. und Lalwani A. K. (2002): Aquaporin-2 Expression in the mammalian cochlea and investigation of its role in Menière's disease. *Hear Res* **170**, 59-69.

Menière P. (1861): Mémoire sur des lésions de l'oreille interne donnant lieu à des symptômes de congestion cérébrale apoplectiforme. *Gaz Méd Paris* **38**, 597-601.

Morel A., O'Carroll A.-M., Brownstein M. J. und Lolait S. J. (1992): Molecular cloning and expression of a rat V<sub>1a</sub> arginine vasopressin receptor. *Nature* **356**, 523-526.

Morgenstern C. (1983): Pathogenesis of experimental endolymphatic hydrops. *Acta Otolaryngol suppl* **406**, 56-58.

Morgenstern C. (1985): Pathophysiologie, Klinik und konservative Therapie der Menière'schen Erkrankung. *Arch Otorhinolaryngol suppl* **247**, 1-66.

Morgenstern C. (1994): M. Menière. In: Naumann H., Helms J., Herberhold C., Kastenbauer E. (Hrsg.): *Oto-Rhino-Laryngologie in Klinik und Praxis*, G. Thieme-Verlag Stuttgart New York, 768-775.

Naito T. (1959): Clinical and pathological studies on Menière's disease. *Poc 60<sup>th</sup> Annu Meet Jpn ORL Soc*, 1-65.

Nielsen S. und Agre P. (1995): The aquaporin family of water channels in kidney. *Kidney International* **48**, 1057-1068.

Nielsen S., Chou C.-L., Christensen E. I., Kishore B. K. und Knepper M. A. (1995): Vasopressin increases water permeability of kidney collecting duct by inducing translocation of aquaporin-CD water channels to plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci* **92**, 1013-1017.

Nishimura M., Kakigi A., Takeda T., Takeda S., Doi K. (2008): Expression of aquaporins, vasopressin type 2 receptor, and Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup>cotransporters in the rat endolymphatic sac. *Acta Otolaryngol.* **7**, 1-7

Niyazov D.M., Andrews J.C., Strelloff D., Sinha S., Lufkin R. (2001): Diagnosis of endolymphatic hydrops in vivo with magnetic resonance imaging. *Otol Neurotol* **22**, 6, 813-817.

Nonoguchi H., Owada A., Kobayashi N., Takayama M., Terada Y., Koike J., Ujiiie K., Marumo F., Sakai T. und Tomita K. (1995): Immunohistochemical localization of vasopressin receptor along the nephron and functional role of luminal V<sub>2</sub> receptor in terminal inner medullary collectin ducts. *J Clin Invest* **96**, 1768-1778.

Ostrowski N. L., Scott Young III W., Knepper M. A. und Lolait S. (1993): Expression of vasopressin V<sub>1a</sub> and V<sub>2</sub> receptor messenger ribonucleic acid in the liver and kidney of embryonic, developing and adult rats. *Endocrinology* **133** (3), 1849-1859.

Paparella M.M. (1985): The cause (multifactorial inheritance) and pathogenesis (endolymphatic malabsorption) of Menière's disease and its symptoms (mechanical and chemical). *Acta Otolaryngol (Stockh)* **99**, 445-451.

Paparella M.M., Costa S., Fox R., Yoo T.H. (1991): Menière's disease and other labyrinthine diseases. In: Paparella M.M., Shumrick D.A., Gluckmann J., Meyerhoff W.L., editors. *Otolaryngology*, vol. II: otology. 3rd edition, Philadelphia: W B Saunders, 1689-1714.

Paparella M.M. (1994): The natural course of Menière's disease. In: Filipo R., Barbara M., editors. Proceedings of the Third international Symposium on Menière's Disease, Amsterdam: Kugler, 9-20.

Plontke S. K. (2007): Aktuelle Aspekte zum Morbus Menière. HNO **55**, 12-14.

Politzer A. (1867): Über Läsion des Labyrinthes. Arch Ohrenheil, **2**, 88-99.

Portmann G. (1921): Recherches sur la physiologie du sac et du canal endolymphatiques : valeur fonctionnelle de l'organe endolymphatique des Sèlaciens. C R Soc Biol **85**, 1070-1077.

Portmann G. (1927): Vertigo: surgical treatment by opening the saccus endolymphaticus. Arch Otolaryngol, **6**, 309.

Saito M., Sugimoto T., Tahara A., Kawashima H. (1995): Molecular cloning and characterization of rat V1b vasopressin receptor: evidence for its expression in extra-pituitary tissues. Biochem Biophys Res Commun. **26**;212(3):751-7.

Sajjadi H., Paparella M.M., Williams T. (1998): Endolymphatic Sac Enhancement Surgery in Elderly Patients with Menière's Disease. Ear Nose Throat J, **77**, (12), 975-982.

Sawada S., Takeda T., Kitano H., Takeuchi S., Kakigi A. und Azuma H. (2002): Aquaporin-2 regulation by vasopressin in the rat inner ear. NeuroReport **13** (9), 1127-1129.

Schaaf H. (2007): Morbus Menière. Springer Verlag, Heidelberg.

Schuknecht H.F. (1957): Ablation therapy in the management of Menière's disease. Acta Otolaryngol (Stockh), **132** (suppl), 1-42.

Schuknecht H.F. (1981): Menière's disease: pathogenesis, diagnosis and treatment. NY Thieme, 10-15.

Schuknecht H.F. und Igarashi M. (1986): Pathophysiology of Menière's disease. NY Thieme, 46-54.

Schuknecht H.F. (1993): Pathology of the ear. ed 2. Philadelphia. Lea & Febiger.

Schüle R., Rutz C., Rosenthal W. (1996): Membrane targeting and determination of transmembrane topology of the human vasopressin V2 receptor. **271**(46):28844-52.



Sennaroglu L., Sennaroglu G., Gursel B., Dini F.M. (2001): Intratympanic dexamethasone, intratympanic gentamicin, and endolymphatic sac surgery for intractable vertigo in Menière's disease. *Otolaryngol Head Neck Surg* **125**, (5), 537-543.

Stahle J., Stahle C., Kaufmann-Arenberg I. (1978): Incidence of Menière's disease. *Arch Otolaryngol.*, **104** (2), 99-102.

Taguchi D., Takeda T., Kakigi A., Takumida M., Nishioka R., Kitano H. (2007): Expressions of Aquaporin-2, Vasopressin Type 2 Receptor, Transient Receptor Potential Channel Vanilloid (TRPV)1, and TRPV4 in the Human Endolymphatic Sac. *Laryngoscope* **117**, 695-698.

Takeda T., Kakigi A. und Saito H. (1995): Antidiuretic hormone (ADH) and endolymphatic hydrops. *Acta Otolaryngol Suppl* **519**, 219-222.

Takeda T., Takeda S., Kitano H., Okada T. und Kakigi A. (2000): Endolymphatic hydrops induced by chronic administration of vasopressin. *Hear Res* **140**, 1-6.

Takeda T., Sawada S., Takeda S., Kitano H., Suzuki M., Kakigi A., Takeuchi S. (2003): The effects of V2-antagonists (OPC-31260) on endolymphatic hydrops. *Hear Res* **182**, 9-18.

Takeda T., Takeda S., Kakigi A., Okada T., Nishioka R., Taguchi D. (2006): A comparison of dehydration effects of V2-antagonist (OPC-31260) on the inner ear between systemic and round window applications. *Hear Res* **218**, 89-97.

Takumi Y., Nagelhus E. A., Eidet J., Matsubara A., Usami S., Shinkawa H., Nielsen S. und Ottersen O. P. (1998): Select types of supporting cell in the inner ear express aquaporin-4 water channel protein. *EJN* **10** (12), 3584-3595.

Tashima Y., Kohda Y., Nonoguchi H., Ikebe M., Machida K., Star R. A. und Tomita K. (2001): Intranephron localization and regulation of the V<sub>1a</sub> vasopressin receptor during chronic metabolic acidosis and dehydration in rats. *Eur J Physiol* **442**, 652-661.

Terashima Y, Kondo K, Mizuno Y, Iwasaki Y, Oiso Y. (1998): Influence of acute elevation of plasma AVP level on rat vasopressin V2 receptor and aquaporin-2 mRNA expression. *J Mol Endocrinol.* **20**(2), 281-285.

Thai-Van H., Bounaix M.J., Fraysse B. (2001): Menière's disease: pathophysiology and treatment. *Drugs*, **61**, (8), 1089-1102.

Thibonnier M., Auzan C., Madhun Z., Wilkins P., Berti-Mattera L. und Clauser E. (1994): Molecular cloning, sequencing and functional expression of a cDNA encoding the human V<sub>1a</sub> vasopressin receptor. *J Biol Chem* **269** (5), 3304-3310.

Thibonnier M., Coles P., Conarty D. M., Plesnicher C. L. und Shohsm M. **(2000)**: A molecular model of agonist and nonpeptide antagonist binding to the human V<sub>1</sub> vascular vasopressin receptor. *JPET* **294** (1), 195-203.

Thomsen J., Bretlau P., Tos M., Johnsen N.J. **(1983)**: Placebo effect in surgery for Meniere's disease: three-year follow-up. *Otolaryngol Head Neck Surg*, **91**, 183-186.

Thomsen J., Sass K., Odkvist L., Arlinger S. **(2005)**: Local overpressure treatment in patients with Meniere's disease: a clinical, randomized, multicenter, double-blind, placebo-controlled study. *Otol Neurotol* **26**, 68-73.

Woodworth B.A., Fitzpatrick P.C., Gianoli G.J. **(2000)**: Menière's Disease. *La State Med Soc*, **152**, 314-319.

Yamakawa K. **(1938)**: Über die pathologischen Veränderungen bei einem Menière-Kranken. *J Otolaryngol Soc Jpn* **4**, 2310-2312.

Zenner B. und Zenner H. P. **(1979)**: Vasopressin and isoproterenol activate adenylate cyclase in the guinea pig inner ear. *Arch Otorhinolaryngol* **222**, 275-283.

Zhong S., Liu Z. **(2003)**: Expression of aquaporins in the cochlea and endolymphatic sac of guinea pig. *J Otorhinolaryngol Relat Spec* **65**, 284-289.

## 6.2 Abkürzungsverzeichnis

AAO	American Academy of Otolaryngology
AC	Adenylatzyklasekomplex
ADH	Antidiuretisches Hormon
AQP-2	Aquaporin-2
ATP	Adenosintriphosphat
BERA	Brainstem Evoked Response Audiometry
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindol, dihydrochlorid
DIC	Differential-Interferenz-Kontrastierung
DE	Ductus endolymphaticus
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECL	Enhanced Chemiluminescence
Gs	G-Protein
MRZ	Mitochondrienreiche Zelle
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PKA	Proteinkinase A
PLC	Phospholipase C
RNA	Ribonukleinsäure
RRZ	Ribosomenreiche Zelle
RT-PCR	Reverse Transkriptase – Polymerasekettenreaktion
SE	Saccus endolymphaticus
V	Vasopressin
V1a-R	Vasopressin 1a-Rezeptor
V1b-R	Vasopressin 1b-Rezeptor
V2-R	Vasopressin2-Rezeptor

### 6.3 Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank Prof. Dr. med. Maassen, der sich zur Betreuung dieser Arbeit bereit erklärt hat und mir die thematische Basis für diese Arbeit zur Verfügung gestellt hat.

Herrn PD Dr. med. Löwenheim danke ich herzlich für die Möglichkeit, die Experimente in seinem Labor durchzuführen und für die immer neuen wissenschaftlichen Impulse.

Herzlichst danke ich Herrn PD Dr. Müller, dessen unerschöpfliche Geduld und stetige Motivation bei der Bildbearbeitung und der Fertigstellung der Arbeit einen entscheidenden Anteil hatten.

Hilfreiche technische Unterstützung während der experimentellen Phase der Arbeit bot Dr. med. Hirt. Er stand auch stets für wissenschaftliche Diskussionen zur Verfügung.

Weiterhin danke ich allen Mitarbeitern der HNO-Klinik der Universität Tübingen, die zu einer guten Zusammenarbeit und einem guten Arbeitsklima während meiner Zeit in Tübingen beigetragen haben.

Bei meiner Familie, meinem Freund Andreas und allen meinen Freunden bedanke ich mich für den uneingeschränkten Rückhalt und die fortwährende Motivation.