

6 ZUSAMMENFASSUNG

1. Vögel besitzen die neurohypophysären Hormone Vasotocin und Mesotocin, die Analoga der Hormone Vasopressin und Oxytocin des Mammaliens. Die Hormone werden im Hypothalamus synthetisiert und reifen während des axonalen Transportes zur Neurohypophyse. Vasotocin reguliert den Wasserhaushalt und könnte eine Rolle bei der Eiablage spielen. Die Funktion des Mesotocins ist noch nicht geklärt. Zwei Hormonfamilien, die sich in ihrem strukturellen Aufbau sehr ähnlich sind können unterschieden werden: a) Vasopressinähnliche und b) Oxytocinähnliche.

2. Mit einem synthetisch hergestellten Vasotocin-Oligonukleotid wurde eine hypothalamische cDNA-Bibliothek vom Huhn gescreent, wobei das Oligomer sowohl mit Vasotocin als auch mit Mesotocin hybridisieren konnte, da es die Sequenz des Vasotocinhormons kodierte und dieses sich nur in einer Aminosäure vom Mesotocin unterscheidet. Drei positive Klone konnten als Vasotocin-cDNA identifiziert werden.

3. Eine vasotocinspezifische Sonde wurde aus dem 3'-Ende der Vasotocin-cDNA kloniert. Mit ihr sollte eine Differenzierung der Hormone Vasotocin und Mesotocin möglich sein.

4. Nach dem Screenen einer Genbibliothek vom Huhn mit der vasotocinspezifischen Sonde konnten 19 positive Klone als Vasotocingene identifiziert werden.

5. Weitere 4 Vasotocin-Klone konnten durch Screenen der Genbibliothek mit dem Vasotocin-Oligonukleotid isoliert werden.

6. Das Vasotocingen wurde durch detaillierte Restriktionsanalyse kartiert und in kleineren Genfragmenten subkloniert und sequenziert.

7. Mesotocin konnte trotz intensiven Screenings der cDNA- und Genbibliothek des Huhns in keinem Versuch nachgewiesen werden.

8. Eine Northern-Blot-Analyse ergab nach Hybridisierung mit der vasotocinspezifischen cDNA-Sonde ein positives Signal bei ca. 700 b im Hypothalamus von adulten Legehennen. Die Mesotocin-mRNA konnte nicht dargestellt werden.

9. Die Sequenzanalyse der Vasotocin-cDNAs ergab eine fast vollständige Übereinstimmung mit der Aminosäuresequenz des MSEL-Neurophysins des Huhns, die von LEVY et al., 1987 veröffentlicht wurde. Die Vasotocin-cDNA-Sequenz wurde am 03.12.1990 unter der

Nr. x55130 in der EMBL-Bank aufgenommen und zeigte die gleiche strukturelle Organisation, wie sie von anderen analogen Hormonen anderer Spezies bekannt ist. Weiterhin konnten das Fehlen eines Spaltsignals, ähnlich wie bei der Gans (Michel et al., 1990) und das Vorhandensein einer n-Glykosylierungsstelle aus der Sequenz entnommen werden. Bei einem Vergleich des Vasotocinvorläufers des Huhns mit den Pressorhormonen anderer Spezies (Rind, Kröte, Gans) konnte eine Gesamthomologie in der Reihenfolge Huhn = Gans \geq Kröte \geq Rind gezeigt werden.

10. Beim Vergleich des Genaufbaus vom Vasotocingen des Huhns mit dem anderer Spezies fiel auf, daß ausschließlich beim Huhn das Intron I kleiner ist als das Intron II und, verglichen mit Äquivalenten anderer Spezies, kleiner ist als diese. Durch die Subklonierung des Vasotocinpromotorbereichs können Studien über die Physiologie der transkriptionellen Regulation des Vasotocingens durchgeführt werden.

Danja Hamann

Cloning and (molecular) analysis of the cDNA and gene of the neurohypophysial hormone arginine vasotocin from the chicken

7 SUMMARY

1. Birds have the neurohypophysial hormones vasotocin and mesotocin which are the analogues to the mammalian hormones vasopressin and oxytocin respectively. The hormones are synthesized in the hypothalamus and mature during axonal transport to the neurohypophysis. Vasotocin has an osmoregulatory function and may play a role in oviposition. The function of mesotocin is still unknown. There are two structurally similar hormone families - the vasopressic and oxytocic.

2. A vasotocin-specific oligonucleotide was used to screen a chicken hypothalamic cDNA library. Since vasotocin and mesotocin differ only in one amino acid, the oligonucleotide was expected to be able to hybridize with both hormones. 3 positive clones were identified as vasotocin cDNA.

3. A vasotocin-specific probe was cloned from the 3' end of the vasotocin cDNA and should be able to differentiate between vasotocin and mesotocin.

4. The vasotocin-specific probe was used to screen a chicken genomic library. 19 clones were identified as vasotocin genes.

5. Further screening of the library with the oligonucleotide provided 4 more clones, all of which were also identified as vasotocin genes.

6. The vasotocin gene was mapped by restriction analysis and smaller gene fragments were subcloned and sequenced.

7. Despite intensive screening of cDNA and genomic libraries, sequences corresponding to the mesotocin gene could not be identified.

8. A 700 b positive signal could be shown after hybridizing a northern blot with the vasotocin-specific probe. Mesotocin could not be shown.

9. Vasotocin cDNA sequence analysis indicated a nearly complete agreement with MSEL-neurophysin amino acid sequence shown for the chicken by LEVY et al. 1987. The vasotocin cDNA sequence has been

deposited in the EMBL library under the number x55130. The structural organisation of the vasotocin precursor is similar to that known for other species. The lack of a cleavage signal between neurophysin and glycopeptide, similar to the goose (MICHEL et al. 1990), and the presence of an n-glycosylation signal was deduced from the elucidated sequence. Comparison of the chicken vasotocin precursor with other members of the vasopressin family revealed a homology in the following order of similarity: chicken = goose \geq toad \geq bovine.

10. Comparing the chicken vasotocin gene structure to the vasopressin family gene structure from other species, it was observed that in chicken the intron I was smaller than the intron II and considerably smaller than the equivalent intron I in the other species. By subcloning the vasotocin gene promoter it is now possible to study the transcriptional regulating elements.