

## 7 ZUSAMMENFASSUNG

Bei der Aufrechterhaltung der Homöostase im Organismus spielen eine Vielzahl komplexer endokriner Regelmechanismen eine wichtige Rolle. Für die Regulation dieser Mechanismen hat der Hypothalamus bei Vertebraten eine zentrale Funktion als Bindeglied zwischen dem Nerven- und dem endokrinen System.

Im Hypothalamo-neurohypophysären System (HNS) wird bei aviären Spezies das Nonapeptid-Hormon Arginin-Vasotocin (AVT) von neurosekretorischen Nervenzellen synthetisiert und sezerniert. AVT besitzt beim Geflügel (*Gallus domesticus*) nach der Sekretion in die Blutbahn zum einen eine antidiuretische Wirkung, zum anderen stimuliert AVT auch die Uteruskontraktionen und beeinflusst bei der Henne die Oviposition. Funktionell entspricht AVT somit den Nonapeptiden Arginin-Vasopressin (AVP) und Oxytocin (OT) der Säuger.

In der vorliegenden Arbeit wurden Legehybriden beider Geschlechter und unterschiedlichen Alters gewählt, um die AVT-Genexpression in Axonen des HNS, im BNST und im Reproduktionstrakt mittels verschiedener molekularbiologischer Methoden zu untersuchen.

Es ist erstmalig gezeigt worden, daß AVT-mRNA nicht nur im Cytoplasma hypothalamischer Nervenzellen, sondern auch extrasomal in neuronalen Fortsätzen magnozellularer Neurone des Nucleus paraventricularis (PVN) und Nucleus supraopticus (SON) lokalisiert ist. Auch in distalen Bereichen des HNS, in der Eminentia mediana und der Neurohypophyse konnten geringe Mengen von AVT-mRNA nachgewiesen werden. Die Ergebnisse dieser Untersuchung deuten darauf hin, daß AVT-mRNA in Dendriten und Axonen des HNS axonal aus dem Hypothalamus transportiert wurde.

Mittels Northern-Analyse wurde im Gehirn ein deutlicher Geschlechtsdimorphismus im AVT-mRNA-Gehalt nachgewiesen. Die Konzentration von AVT-mRNA war im Gehirn des Hahnes etwa doppelt so hoch wie bei der Henne. Ferner konnte gezeigt werden, daß dieser Geschlechtsdimorphismus nicht aus einer unterschiedlichen AVT-Genexpression in den hypothalamischen Kerngebieten des PVN, SON und Nucleus suprachiasmaticus resultiert.

Mit Hilfe der *In situ* Hybridisierung wurde erstmals in der vorliegenden Arbeit beim Hahn die Lokalisation von AVT-Transkripten in Neuronen des BNST nachgewiesen. Ein deutlicher Geschlechtsdimorphismus liegt weiterhin in der AVT-Genexpression im BNST adulter Tiere vor. In Neuronen des BNST adulter Hennen waren keine AVT-spezifischen Hybridisierungssignale sichtbar. Dieser Geschlechtsdimorphismus lag auch in Neuronen einer

Zellgruppe im Bereich des dorsalen Diencephalon vor. Auch nach der physiologischen Stimulation des AVT-Systems durch Entzug des Trinkwassers für 48 Stunden und zum Zeitpunkt der Oviposition wurde bei der Henne das AVT-Gen in Neuronen des BNST nicht exprimiert.

In einer anschließenden ontogenetischen Studie wurde weiterhin untersucht, in welchem Stadium der Embryogenese oder postnatalen Entwicklung der Geschlechtsdimorphismus der AVT-Genexpression im BNST apparent wird. Während der Embryonalentwicklung konnte sowohl bei männlichen als auch bei weiblichen Tieren 15 Tage nach Beginn der Inkubation (E15) im BNST die AVT-Genexpression gleichermaßen nachgewiesen werden. Erst im Alter von E21 waren sowohl bei männlichen als auch bei weiblichen Embryonen im DD AVT-spezifische Hybridisierungssignale sichtbar. Beim Hahn und bei der Henne entwickelte sich die AVT-Genexpression in den Neuronen des BNST bis zu einem Alter von 10 Wochen gleich. Im Alter von 16 Wochen entsprach beim Hahn die Verteilung von AVT-mRNA im BNST der adulter Hähne, während bei der Henne im BNST nur sehr wenige Neurone mit schwachen Hybridisierungssignalen nachweisbar waren. Der Geschlechtsdimorphismus der AVT-Genexpression im BNST bildet sich beim Geflügel nicht während der Embryogenese, sondern erst im Zeitraum der Pubertät aus. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, daß AVT an der Regulation geschlechtsspezifischer Verhaltensmuster beteiligt ist.

In Granulosa- und Thekazellen präovulatorischer Follikel, sowie im Ovar, im Myo- und Endometrium des Uterus legerer Hennen konnten mit Hilfe der RT-PCR vollständige AVT-Transkripte nachgewiesen werden. Im Vergleich zum Hypothalamus ist die AVT-mRNA-Menge in den untersuchten Bereichen des Reproduktionstraktes jedoch sehr gering. Mit Hilfe der RP-HPLC und des AVT-RIA wurde weiterhin gezeigt, daß das AVT-Antiserum neben AVT auch an den AVT-Metaboliten VP(4-9) bindet. Folglich ist die AVT-Immunreaktivität nur ein Teil der gesamten im AVT-RIA gemessenen Immunreaktivität im Reproduktionstrakt und ist somit geringer als aus der Literatur bekannt war. Der Nachweis von AVT-mRNA und AVT-Peptid in Granulosa- und Thekazellen ist ein wichtiger Hinweis darauf, daß auch im Reproduktionstrakt der Henne eine AVT-Synthese stattfindet.

Stephan Barth:

Hypothalamic and extrahypothalamic gene expression of arginine vasotocin in the chicken.

A variety of complex endocrine control mechanisms play a role for the maintenance of homeostasis in the organism. In vertebrates, the central regulatory unit is the hypothalamus as a link between the nervous and the endocrine systems.

Within the hypothalamo-neurohypophyseal-system (HNS) of avian species, the nonapeptide arginine vasotocin (AVT) is synthesized in and secreted by neurosecretory neurons. In chickens AVT has antidiuretic and uterotonic functions. It is therefore equivalent to both arginine vasopressin and oxytocin in mammalian species.

Male and female chickens of a laying strain were used for the present study. Different methods of molecular biology were utilized to examine AVT gene expression within the axonal compartment of the HNS in neurons of the bed nucleus of the stria terminalis (BNST) and in the female reproductive tract.

Present results demonstrated that AVT-mRNA was not restricted to the cytoplasm of magnocellular neurons of the paraventricular and supraoptic nuclei, rather small amounts of transcripts were located in extrasomal compartments of the neurons. An interpretation of this finding is, that AVT-mRNA, which is apparently located in dendrites and axons, is transported from cytoplasm into these extrasomal compartments.

By use of northern analysis, a clear sexual dimorphism in whole brain AVT-mRNA content was observed. In brains of cockerels, the concentration of AVT-mRNA is twice as high compared to hens. Furthermore, the sexual dimorphism was not based upon a sex difference in AVT gene expressing neurons in the hypothalamic PVN, SON and suprachiasmatic nucleus.

The present results of *in situ* hybridization show, that AVT-transcripts were located within neurons of the nucleus of the stria terminalis (BNST) in cockerels. Furthermore, in adult chickens a clear sexual dimorphism was observed in AVT gene expression in the BNST. In hens, no AVT specific hybridization signals were detectable in the BNST. In addition, a similar sexually dimorphic gene expression was apparent within a neuronal cell cluster in the dorsal diencephalic region (DD). Neither osmotic stimulation of the AVT system (water

deprivation for 48 h) nor oviposition up-regulated the expression of the AVT gene in the BNST of hens.

In the following ontogenetic study, first appearance of the sexually dimorphic gene expression was examined during embryogenesis and postnatal development. At day 15 of embryogenesis (E15), the same intensity of AVT gene expression was detectable in both males and females. Furthermore, in the DD first AVT specific hybridization signals were apparent at E21. Until the age of ten weeks, AVT gene expression was comparable in chickens of both sexes. At the age of 16 weeks, in cockerels the pattern of AVT gene expressing neurons was nearly identical to adults, however in hens, the number of AVT positive neurons dramatically decreased with a remarkable loss in intensity of specific hybridization signals above neurons. In summary, the observed sexual dimorphism in AVT gene expression in adults occurred not during embryogenesis, but at the time of sexual maturation. Therefore the sexual dimorphism in AVT gene expression might be related to the control of a sex specific behavior.

Results of the RT-PCR clearly indicate full length AVT transcripts in granulosa and thecal cell layers of preovulatory follicles, in the ovary and uterine myo- and endometrium of the reproductive tract. When compared to the amount of hypothalamic AVT mRNA, the content in the reproductive system was very low.

By use of RP-HPLC and AVT-RIA, binding of the AVT antibody was observed not only to AVT, but also to the AVT metabolite VT(4-9). Therefore, the AVT immunoreactivity is only part of the total assayable immunoreactivity in the reproductive system and is lower than values found in the literature. The detection of both AVT mRNA and AVT peptide in granulosa and thecal cell layers points to a possible AVT synthesis within different compartments of the hen's reproductive tract.