

# Untersuchung der Vasotocin- und Galanin-Expression nach osmotischer Stimulation im Hühnergehirn

Von der naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades  
Doktorin der Naturwissenschaften  
– Dr. rer. nat. –

genehmigte Dissertation

von  
Dipl-Biol. Sandra Kriegelstein  
geboren am 06.06.1976 in Bad-Soden-Salmünster

Hannover 2008

Wissenschaftliche Betreuung: Prof. Dr. Dr. Nahid Parvizi  
Dir & Prof. Dr. Roland Grossmann

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. Nahid Parvizi
2. Gutachter: Prof. Dr. Elke Zimmermann und  
Prof. Dr. Stefan Steinlechner

Tag der mündlichen Prüfung: 05.12.2008

Mit freundlicher Unterstützung des Friedrich Loeffler Institutes (FLI) für Nutztiergenetik,  
Mariensee.

erstellt am

**Friedrich-Loeffler-Institut**  
**Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit**  
**(FLI)**

**Institut für Nutztiergenetik**  
**Mariensee**

*Abteilung*  
*Funktionelle Genetik und Bioregulation*

All jenen, die mir Mut gaben,  
zu sein, wer ich bin.

Meinen Eltern,  
meinen Großeltern,  
Juliane Plitzner  
und Ute Beermann.



Die Neugier steht immer an erster Stelle  
eines Problems, das gelöst werden will.

**GALILEO GALILEI**



## Abstract (deutsch)

Das aus neun Aminosäuren bestehende Neuropeptid Arginin-Vasotocin (AVT) des Vogels wird in neurosekretorischen Neuronen des Hypothalamus synthetisiert und axonal in die Neurohypophyse transportiert, um von dort in das Blut sezerniert zu werden. Wie sein Säuger-Analog Arginin-Vasopressin reguliert AVT beim Huhn (*Gallus gallus*) die Homöostase des Wasserhaushaltes. Zudem übernimmt es regulatorische Funktion bei der Oviposition, die im Säuger bei Geburt und Laktation dem Oxytocin zugeschrieben werden. Neben AVT kann auch Galanin in magnozellulären Neuronen des SON unter unterschiedlichen physiologischen Bedingungen nachgewiesen werden

Ziel dieser Arbeit war es, die Auswirkungen einer osmotischen Stimulation durch Wasserentzug auf die Genexpression der beiden Neuropeptide AVT und Galanin zu klären. Um die Tiere osmotisch zu stimulieren, wurden sie einem 48stündigen Wasserentzug (Dehydrierung) ausgesetzt. Die Ergebnisse zeigen eine verminderte AVT- und Galanin-Immunoreaktivität im SON nach 48 Stunden Dehydrierung in beiden Geschlechtern. Sowohl männlichen als auch weibliche Kontrolltiere zeigen eine Kolo-kalisation des Galanin mit AVT, die nach osmotischer Stimulation abnimmt. Zur genaueren Betrachtung wurde der SON in fünf morphologisch differenzierbare Regionen unterteilt. Hierbei konnte im SON pars externalis (SONe) ein Geschlechtsdimorphismus im stimulierten System beobachtet werden. Mittels *realtime* PCR wurde im weiblichen Hypothalamus eine Aufregulation sowohl der Galanin-Expression als auch der Expression des Galanin Rezeptors Subtyp 1 nachgewiesen werden. Da die Galanin-Rezeptoren Subtyp 1 und 2 des Huhns bisher auf Transkripte-bene noch nicht beschrieben sind, sie zudem bei der Ratte nachweislich nicht nur im ZNS, sondern auch in peripheren Geweben expremiert werden, wurden ihr Vorkommen mittels *realtime* PCR in unterschiedlichen Geweben des Huhns untersucht. Der Galanin Rezeptor Subtyp 1 kann in Hypothalamus, Hypophyse, Hoden, Leber, Niere und Nebenhoden nachgewiesen werden, Galanin Rezeptor Subtyp zwei zusätzlich in Ovar, Muskel und Follikel.

Nachdem bei der Wachtel eine zweite Transkriptvariante des Galanin-Vorläuferhormons nachgewiesen wurde, sollte festgestellt werden, ob auch das Huhn über eine solche Transkriptvariante verfügt. Die Ergebnisse bestätigen, dass beim Huhn ebenfalls eine zweite Transkriptvariante (Gal-TV2) des Galanin-Precursors existiert.

## Abstract (englisch)

The avian neuropeptide arginine-vasotocin (AVT) consists of nine amino acids and is synthesized in neurosecretory neurons of the hypothalamus. By axonal transport it reaches the neuronal lobe of the pituitary gland to be secreted in the blood. Similar to its mammalian analogue arginine-vasopressin (AVP) AVT regulates homeostasis of water balance. Furthermore, it acts as regulator of reproduction, especially oviposition-control.

Galanin is another neuropeptide proven in magnocellular neurons of SON under different physiological conditions.

Aim of this study was to analyze effects of osmotic stimulation by water deprivation on expression of AVT and Galanin. Osmotic stimulation was performed by dehydration for 48 hours. After 48 hours of dehydration a decrease of AVT-immunoreactivity (in hens) as well as a decrease of Galanin-immunoreactivity involving a reduced co-localization of these peptides (in both sexes) within the SON was apparent compared to controls (normohydrated animals of both sexes). A sexdimorphism was evident in the SON pars externalis (SONe) in the osmotically stimulated animals. By *realtime* PCR experiments a significant up regulation of galanin as well as of its receptor subtype 1 and a small upregulation of AVT-expression in female chicken was found. This study shows for the first time expression of galanin receptors on transcriptional level in chicken: *realtime* PCR shows galanin receptor subtype 1 being expressed in hypothalamus, pituitary gland, liver, kidney, testis und epididymis and subtype 2 being expressed in ovary, muscle and follicles. These results are in accordance with findings in the rat, where both galanin receptor subtypes (1 and 2) are located not only in the CNS but also in other tissues. Likewise results in quail and goldfish concerning a splicing variant of Galanin mRNA a second transcriptional variant of the galanin precursor (GAL-TV2) exists in chicken. Both transcript variants, galanin (GAL-TV1) as well as GAL-TV2 were detectable in the following tissues: hypothalamus, pituitary gland, ovary, kidney and epididymis, except the testis, where only GAL-TV1 was found.

# Schlagworte

## Deutsch:

Vasotocin

Galanin

Nucleus supraopticus

## Englisch:

vasotocin

galanin

supraoptic nucleus

# Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis .....	8
1	Einleitung .....	10
2	Literaturübersicht .....	12
<b>2.1</b>	<b>Hypothalamo-Neurohypophysäres System (HNS) .....</b>	<b>12</b>
2.1.1	Historischer Überblick .....	12
2.1.2	Anatomie des Hypothalamo-Neurohypophysären Systems .....	13
2.1.3	Magnozelluläre Neurone .....	15
<b>2.2</b>	<b>Neurohypophysäre Hormone .....</b>	<b>17</b>
2.2.1	Evolution neurohypophysärer Hormone .....	17
2.2.2	Genstruktur neurohypophysärer Hormone .....	18
2.2.3	Genregulation neurohypophysärer Hormone .....	19
2.2.3.1	Transkription .....	20
2.2.3.2	Proteinbiosynthese .....	22
2.2.4	Axonaler und dendritischer Transport .....	22
2.2.5	Funktion des AVT/AVP-Systems .....	24
2.2.5.1	Osmotische Stimulation .....	24
2.2.6	Coexpression mit anderen Peptiden .....	26
<b>2.3</b>	<b>Galanin .....</b>	<b>26</b>
2.3.1	Peptidaufbau .....	26
2.3.2	Biologische Halbwertszeit des Galanin .....	28
2.3.3	Genstruktur .....	28
2.3.4	Verteilung Galanin-immunreaktiver Neurone im Diencephalon .....	29
2.3.5	Funktion .....	30
2.3.6	Galanin-Rezeptoren .....	30
2.3.6.1	Galanin-Rezeptor 1 (GalR1) .....	31
2.3.6.2	Galanin-Rezeptor 2 (GalR2) .....	31
2.3.6.3	Galanin-Rezeptor 3 (GalR3) .....	32
2.3.7	Physiologische Stimulation des hypothalamischen Galanin-Systems .....	32
2.3.8	Regulation des Galanin-Systems in magnozellularen Neuronen .....	32
2.3.9	Elektrophysiologische Effekte auf supraoptische Neurone .....	33
3	Fragestellung .....	35
4	Material und Methoden .....	37
<b>4.1</b>	<b>Material .....</b>	<b>37</b>
4.1.1	Geräte .....	37
4.1.2	Chemikalien und Software .....	37
4.1.3	Verwendete Vektoren .....	37
4.1.4	Restriktionsenzyme .....	38
4.1.5	Primer .....	39
4.1.6	Verwendeter Bakterienstamm .....	40
4.1.7	Verwendetes Nährmedium .....	41
4.1.8	Versuchstiere .....	41
<b>4.2</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>42</b>
4.2.1	Probenentnahme .....	42
4.2.2	Elektrolytbestimmung mittels Blutgasanalyse und Osmolalitätsbestimmung .....	43
4.2.3	Radioimmunoassay .....	43
4.2.3.1	Plasma-Extraktion .....	44
4.2.3.2	AVT-Radioimmunoassay .....	44
4.2.4	Gesamt-RNA Extraktion .....	45
4.2.5	Photometrische Konzentrationsbestimmung .....	46
4.2.6	Agarosegelelektrophorese .....	47
4.2.6.1	Agarosegel zur Auftrennung doppelsträngiger DNA .....	47

4.2.6.2	Formamid-Agarosegel zur Auftrennung einzelsträngiger RNA .....	48
4.2.7	Northern Blotting .....	48
4.2.7.1	RNA-Transfer und Fixierung .....	49
4.2.7.1.1	Transfer (Kapillarblotting) .....	49
4.2.7.1.2	Fixierung .....	50
4.2.7.2	Hybridisierung mit radioaktiv Markierten Sonden .....	50
4.2.7.2.1	Markierung genspezifischer Sonden mit <sup>32</sup> P mittels <i>Random Priming</i> .....	50
4.2.7.2.2	Hybridisierung mit genspezifischen Sonden .....	53
4.2.7.3	Entfernung der ungebundenen bzw. unspezifisch gebundenen Sonden .....	54
4.2.7.4	Detektion der gebundenen Sonde und Analyse .....	55
4.2.8	cDNA-Synthese (reverse Transkription) .....	56
4.2.9	Primer-Konstruktion .....	57
4.2.10	Polymerasen-Kettenreaktion (PCR) .....	58
4.2.10.1	Gradienten-PCR .....	59
4.2.10.2	realtime-PCR .....	61
4.2.11	Klonierung .....	63
4.2.11.1	Ligation .....	64
4.2.11.2	Transformation .....	65
4.2.11.3	Bakterienkulturen .....	65
4.2.11.4	Mini-Plasmid-Präparation .....	66
4.2.11.5	Restriktionsverdau .....	66
4.2.11.6	Sequenzierung .....	67
4.2.12	Immunhistochemie .....	67
4.2.12.1	Herstellung von Gewebeschnitten .....	67
4.2.12.2	Immunhistochemischer Nachweis von AVT und Galanin .....	68
4.2.12.3	Konfokale Laser-Raster-Mikroskopie .....	72
4.2.13	Statistische Auswertung .....	73
5	Ergebnisse .....	75
<b>5.1</b>	<b>Veränderung der Blutparameter nach Dehydrierung .....</b>	<b>75</b>
<b>5.2</b>	<b>Einfluss der Dehydrierung auf Ovulation/Oviposition der Henne .....</b>	<b>77</b>
<b>5.3</b>	<b>Transkriptebene .....</b>	<b>78</b>
5.3.1	Einfluss der Dehydrierung auf mRNA Expression im Hypothalamus .....	78
5.3.1.1	realtime PCR .....	78
5.3.1.2	Northern Blot Analyse .....	79
5.3.2	Nachweis der Galanin Rezeptoren in unterschiedlichen Geweben .....	82
5.4.3	Galanin mRNA: Nachweis einer zweiten Spleißvariante .....	83
5.4.3.1	Einzelnachweis von Galanin- und Gal-TV2-mRNA in unterschiedlichen Geweben .....	86
5.4.3.2	Einfluss der Dehydrierung auf Galanin- und Gal-TV2-mRNA im Hypothalamus .....	87
<b>5.5</b>	<b>Nachweis von AVT- und Galanin-immunoreaktiven Neuronen im SON .....</b>	<b>89</b>
5.5.1	Verteilung .....	89
5.5.2	Vergleich der Peptidverteilung im SON zwischen normo- und dehydrierten Hennen .....	90
5.5.3	Vergleich der Peptidverteilung zwischen normo- und dehydrierten Hähnen .....	98
5.5.4	Vergleich der Peptidverteilung zwischen den Geschlechtern .....	105
6	Diskussion .....	108
<b>6.1</b>	<b>Regulation der AVT- und Galanin-Genexpression nach osmotischer Stimulation .....</b>	<b>109</b>
6.1.1	Veränderung der Blutparameter .....	109
6.1.2	Veränderung der AVT- und Galanin-Immunoreaktivität in magnozellularen Neuronen des SON .....	111
6.1.3	Veränderung der AVT- und Galanin-Genexpression im Hypothalamus .....	116
<b>6.2</b>	<b>Einfluss der Dehydrierung auf Ovulation/Ovipositionszyklus der Henne .....</b>	<b>121</b>
<b>6.3</b>	<b>Nachweis der Galanin-Rezeptoren Typ 1 und Typ 2 in unterschiedlichen Geweben .....</b>	<b>122</b>
<b>6.4</b>	<b>Zusätzliche Transkriptvariante des Galanin beim Huhn (Gallus gallus) .....</b>	<b>123</b>
6.4.1	Nachweis der beiden Galanin-Transkriptvarianten in verschiedenen Geweben .....	125
6.4.2	Veränderung des mRNA-Gehaltes der Galanin-Transkriptvarianten nach osmotischer Stimulation .....	127
7	Zusammenfassung .....	129

8	Summary .....	131
9	Literaturverzeichnis.....	133
10	Abbildungs-/Tabellenverzeichnis.....	154
11	Anhang .....	158
<b>11.1</b>	<b>Geräte .....</b>	<b>158</b>
<b>11.2</b>	<b>Chemikalien .....</b>	<b>160</b>
<b>11.3</b>	<b>Referenz der Sequenzdaten .....</b>	<b>161</b>
<b>11.4</b>	<b>Plasmawerte der Einzeltiere.....</b>	<b>162</b>
11.4.1	Hähne.....	162
10.4.2	Hennen.....	163
<b>11.5</b>	<b>Northern Blot Auswertung .....</b>	<b>164</b>
<b>11.6</b>	<b>Realtime PCR – Crossing Points (CPs) .....</b>	<b>165</b>
11.6.1	Hähne.....	165
11.6.2	Hennen.....	165
<b>11.7</b>	<b>Intensitätsbestimmung – Laser-Raster-Mikroskopie.....</b>	<b>166</b>
11.7.1	Hähne.....	166
11.7.1.1	Bereich SON2.....	166
11.7.1.2	Bereich SON2-3.....	167
11.7.1.3	Bereich SON3.....	168
11.7.1.4	Bereich SONE.....	169
11.7.2	Hennen.....	170
11.7.2.1	Bereich SON2.....	170
11.7.2.2	Bereich SON2-3.....	171
11.7.2.3	Bereich SON3.....	172
11.7.2.4	Bereich SONE.....	173



## Abkürzungsverzeichnis

<sup>32</sup> P	Radioaktives Phosphor-Isotop 32	LDCV	Large dense core vesicle
A555	Alexa Fluor 555	LSM	Laser-Raster-Mikroskopie
Abb.	Abbildung	LVP	Lysin-Vasopressin
AK	Antikörper	M	Molar
Amp	Ampicillin	mosm	Milliosmol
AS	Aminosäure	mRNA	messenger RNA
AVP	Arginin-Vasopressin	MT	Mesotocin
AVT	Arginin- Vasotocin	NaCl	Natriumchlorid
Bidest.	Bidestiliert	NB	Northern Blot
bp	Basenpaare	NGS	Normales Ziegen Serum
cDNA	complementäre DNA	OD	Optische Dichte
CO	Kontrolle (normohydriert)	OT	Oxytocin
CP	<i>crossing point</i>	PBS	Phosphate buffered saline
cpm	Counts pro Minute	PCR	Polymerasenkettenreaktion
dCTP	Desoxycytosintriphosphat	PFA	Paraformaldehyd
ddH <sub>2</sub> O	doppelt deionisiertes Wasser	pg	Pikogramm
DEPC	Diethylpyrocarbonat	RNA	Ribonukleinsäure
DH	Dehydriert	RNase	Ribonuklease
DIG	Digoxigenin	rpm	Umdrehungen pro Minute
DMF	Dimethylformamid	rRNA	ribosomale RNA
DNA	Desoxyribonukleinsäure	RT-	Reverse Transkription -
		PCR	Polymerasenkettenreaktion
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat	SDS	Sodiumdodecylsulfat
ER	Endoplasmatisches Retikulum	SSC	Salz-Natrium-Citrat-Puffer
EtOH	Ethanol	Strp	Streptomycin
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat	tRNA	transfer RNA
GAL	Galanin	TV	Transkriptvariante
GalR1/R2	Galanin Rezeptor Subtyp 1/2	U	Weiss Unit
IHC	Immunhistochemie	UV	Ultraviolettes Licht
IPTG	Isopropyl β-D-Thiogalactopyranosid	v/v	Volumen pro Volumen
-ir	Immunoreaktiv bzw. Immunoreaktivität	v/w	Volumen pro Gewicht (weight)
Kb	Kilobasen	vgl.	Vergleiche
		µm	Mikrometer

### Abkürzungen anatomischer Begriffe

AN	Nucleus arcuatus	PVN	Nucleus paraventricularis
BST	Bed nucleus of the stria terminalis	SON	Nucleus supraopticus
HNS	Hypothalamo- Neurohypophysäres System	SONe	Nucleus supraopticus pars externalis
MCN	Magnozelluläre Neurone	SONp	<i>principal</i> Nucleus supraopticus
ME	Eminentia mediana	SONr	Nucleus supraopticus retrochiasmaticus
Mfb	Medial forbrain bundle	SONvm	Nucleus supraopticus pars ventromediales
MPA	Medial preoptic area	TSM	Tractus septomesencephalicus

### Abkürzung für Aminosäuren

Aminosäure	3-letter-code	1-letter-code	Aminosäure	3-letter-code	1-letter-code
Alanin	Ala	A	Leucin	Leu	L
Arginin	Arg	R	Lysin	Lys	K
Asparagin	Asn	N	Methionin	Met	M
Asparaginsäure	Asp	D	Phenylalanin	Phe	F
Cystein	Cys	C	Prolin	Pro	P
Glutamin	Gln	Q	Serin	Ser	S
Glutaminsäure	Glu	E	Threonin	Thr	T
Glycin	Gly	G	Tryptophan	Trp	W
Histidin	His	H	Tyrosin	Tyr	Y
Isoleucin	Ile	I	Valin	Val	V

### Abkürzungen für Nukleotidbasen:

A	Adenosin	T	Thymin
C	Cytosin	G	Guanin



## 1 Einleitung

Arginin-Vasotocin (AVT) ist ein aus neun Aminosäuren bestehendes Neuropeptid. Entsprechend seinem Säuger-Analog Arginin-Vasopressin reguliert AVT den Wasserhaushalt beim Vogel. Gleichzeitig übernimmt es regulatorische Funktion bei der Oviposition, die beim Säuger bei Geburt und Laktation dem Oxytocin zugeschrieben wird. AVT wird in magnozellulären Neuronen des Hypothalamus gebildet, entlang des Hypophysenstiels axonal transportiert, in Vesikeln des Hypophysenhinterlappens gespeichert und bei gesteigertem Bedarf vermehrt direkt in das Blut abgegeben.

Verschiedene Untersuchungen beim Säuger haben gezeigt, dass sowohl in Vasopressin als auch Oxytocin produzierenden Neuronen das Neuropeptid Galanin nachgewiesen werden kann. Interessant ist, dass sich die Kollokalisierung beider Peptide unter verschiedenen physiologischen Stimuli verändert. Während bei weiblichen Ratten Vasopressin und Galanin unter normalen physiologischen Bedingungen coexprimiert werden, kann eine gemeinsame Expression von Oxytocin und Galanin nur bei laktierenden Ratten gezeigt werden (LANDRY et al., 1997). Brattleboro-Ratten (Diabetes insipidus) weisen eine deutlich erhöhte Galanin-Produktion in den magnozellulären vasopressinergen Neuronen des Hypothalamus auf verglichen mit normalen Ratten (MAHATA et al., 1992).

Da das Vasotocin des Huhns sowohl die reproduktive Funktion des Oxytocins als auch die osmoregulatorische Funktion des Vasopressins übernimmt, stellt sich die Frage, inwieweit sich die Vasotocin-Expression im Zusammenhang mit der Galanin-Expression unter reproduktiven bzw. osmotischen Stimuli verändert. KLEIN und GROSSMANN (2008) konnten bei adulten Legehennen zeigen, dass die Galanin-Synthese in den magnozellulären Neuronen des Nucleus supraopticus (SON) kurz nach der Oviposition signifikant ansteigt, während das kurz vor der Oviposition vermehrt synthetisierte AVT im weiteren Zeitverlauf auf basale Level zurückkehrt. CABUK (2007) konnte in dehydrierten Hähnen eine Kollokalisierung der beiden Neuropeptide AVT und Galanin in magnozellulären Neuronen des SON nachweisen.

Das Neuropeptid Galanin wirkt über spezifische Rezeptoren. Beim Säuger wurden bisher drei Subtypen des Galanin-Rezeptors gefunden (HABERT-ORTOLI et al., 1994; WANG et al., 1997 a, b; IISMAA und SHINE, 1999; BRANCHEK et al., 2000). Ein besonderes Augenmerk im osmotisch aufregulierten System gilt dem ersten Subtyp des Galanin-Rezeptors (GalR1), der

hauptsächlich im Gehirn exprimiert wird. BURAZIN et al. (2001) wiesen in der männlichen Ratte nach 4 Tagen Dehydrierung bzw. 4 Tagen *saltloading* (2% NaCl im Trinkwasser) einen Anstieg der GalR1 mRNA in den magnozellulären Neuronen des SON nach, während Laktation hingegen zu einer Verminderung der GalR1-Genexpression (LANDRY et al.,1998) im Hypothalamus der Ratte führt. Für das Huhn gibt es bisher keinerlei Daten über die Expression der Galanin-Rezeptoren auf Transkriptebene.

Ziel dieser Arbeit ist es die Veränderung der Genexpression der beiden Neuropeptide AVT und Galanin des Huhns durch osmotische Stimulation sowohl auf Protein- als auch auf Transkriptebene zu untersuchen. Hierbei soll auch erstmals die Expression der Galanin-Rezeptoren (Subtyp 1 und 2) im Hypothalamus beider Geschlechter in die Untersuchungen mit einbezogen werden.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 *Hypothalamo-Neurohypophysäres System (HNS)*

#### 2.1.1 Historischer Überblick

Das hypothalamo-neurohypophysäre Hormonsystem gehört zu den am besten beschriebenen Systemen innerhalb der Neuroendokrinologie. Die wissenschaftliche Aufklärung begann bereits im späten 19. Jahrhundert und wurde seitdem kontinuierlich fortgesetzt. CAJAL beschrieb 1894 als erster eine neuronale Verbindung zwischen dem Hypothalamus und der Neurohypophyse. In den folgenden Jahren wurden Untersuchungen zu vasopressorischen und antidiuretischen Wirkungen und zu wehenauslösenden und den Milchfluss anregenden Wirkungen gemacht, die allesamt der Neurohypophyse zugeordnet werden konnten (DUDLEY, 1919 und 1923; KAMM, 1928; HEMINGWAY und PETERSON, 1929; HELLER, 1939). Die morphologische Struktur der Neurohypophyse, die im Gegensatz zur Adenohypophyse nicht aus Drüsengewebe besteht, sondern aus neuronalem Gewebe, veranlasste SCHARRER 1937 dazu ein Konzept zur Hormonproduktion und deren Freisetzung aus Neuronen zu postulieren, das er selbst als Konzept der Neurosekretion bezeichnete. Doch erst 1951, als es schließlich BARGMANN und SCHARRER gelang mit Hilfe der Gomori-Färbung hormonproduzierende Neurone im Hypothalamus nachzuweisen, fand das Konzept der Neurosekretion breiten Anklang. Kurz darauf gelang es DU VIGNEAUD (1953) die chemische Struktur der beiden Peptide aufzuklären, die für die bereits beschriebenen physiologischen Wirkungen verantwortlich zeichneten. Für seine Beschreibung der Nonapeptide Vasopressin und Oxytocin erhielt er 1955 den Nobel-Preis. Zur selben Zeit wurde ein weiteres, diesmal größeres Peptid entdeckt, welchem biologische Aktivitäten im Neurohypophysenextrakt zuzuschreiben waren. Das nach seinem Entdecker als VAN DYKE-Protein benannte Hormon wurde schließlich als Trägerprotein des Nonapeptids identifiziert, das heutige Neurophysin. SACHS und TAKABATAKE beschrieben 1964 das Vorläuferhormon des Vasopressins, das nicht nur Vasopressin, sondern auch Neurophysin und ein Glykopeptid beinhaltet. 1996 gelang es ROSE et al. schließlich die kristalline Struktur des Oxytocin-Neurophysin-Komplexes darzustellen. DE WIED (1963) war es, der neben der Wirkung auf den Wasserhaushalt, für Vasopressin auch eine Beteiligung an der Regulation des Verhaltens nachweisen konnte. Seine Idee, Vasopressin und seine endokrin inaktiven Derivate könnten im Gehirn selbst

agieren, führte schließlich zu seinem Neuropeptid-Konzept. Es umfasst die peptiderge neuronale Kommunikation und die Modulation der Gehirnaktivität (DE WIED, 1969). Mittlerweile gibt es zahlreiche Studien zur Wirkung der Nonapeptide auf Verhaltensstrukturen, z.B. Angstverhalten bei Ratten (APPENRODT et al. 1998, Erhardt et al., 2008) oder Monogamie bzw. Polygamie und Sozialverhalten bei Wühlmäusen (YOUNG et al., 1998 und 2001). Man weiß heute auch, dass jedes biologisch aktive Peptid in Form eines Vorläufer-Peptids (*precursor*) synthetisiert wird. Seit der Sequenzierung der genomischen DNA konnten zahlreiche Fragen zur Genstruktur der Nonapeptide und der Regulation ihrer Transkription beantwortet werden (GAINER, 1983; SCHMALE et al., 1983; IVELL und RICHTER, 1984).

### **2.1.2 Anatomie des Hypothalamo-Neurohypophysären Systems**

Als Hypothalamus bezeichnet man die basalen Teile des Zwischenhirns (Diencephalon). Er ist das oberste Regulationszentrum des vegetativen Nervensystems. 1928 entdeckte ERNST SCHARRER im Hypothalamus von Fischen sekretorische Neurone, die das Grundelement neurohormonaler Systeme bilden. Ihr wichtigstes morphologisches Merkmal sind neurosekretorische Granula, die sich in ihrer Größe (100-400nm) deutlich von den kleineren Transmittervesikeln (Mikrovesikel) typischer Neurone unterscheiden. Nicht nur aufgrund ihrer Größe, sondern auch wegen ihrer höheren Elektronendichte werden diese Granula als *large dense core vesicle (LDCV)* bezeichnet. In ihnen verpackt befinden sich Peptide (Neuropeptide), die bei Bedarf in den extrazellulären Raum, oder bei Kontakt mit einem Blutgefäß direkt ins Blut sezerniert werden können. Neurosekretorische Zellen finden sich meist gruppenweise in so genannten Kerngebieten zusammen. Besonders gut abgegrenzt sind die paarigen Kerngebiete Nucleus supraopticus (SON) und Nucleus paraventricularis (PVN). Charakteristisch für diese Kerngebiete sind magnozellige Neurone (MCNs) mit einem Durchmesser von 20-40µm.

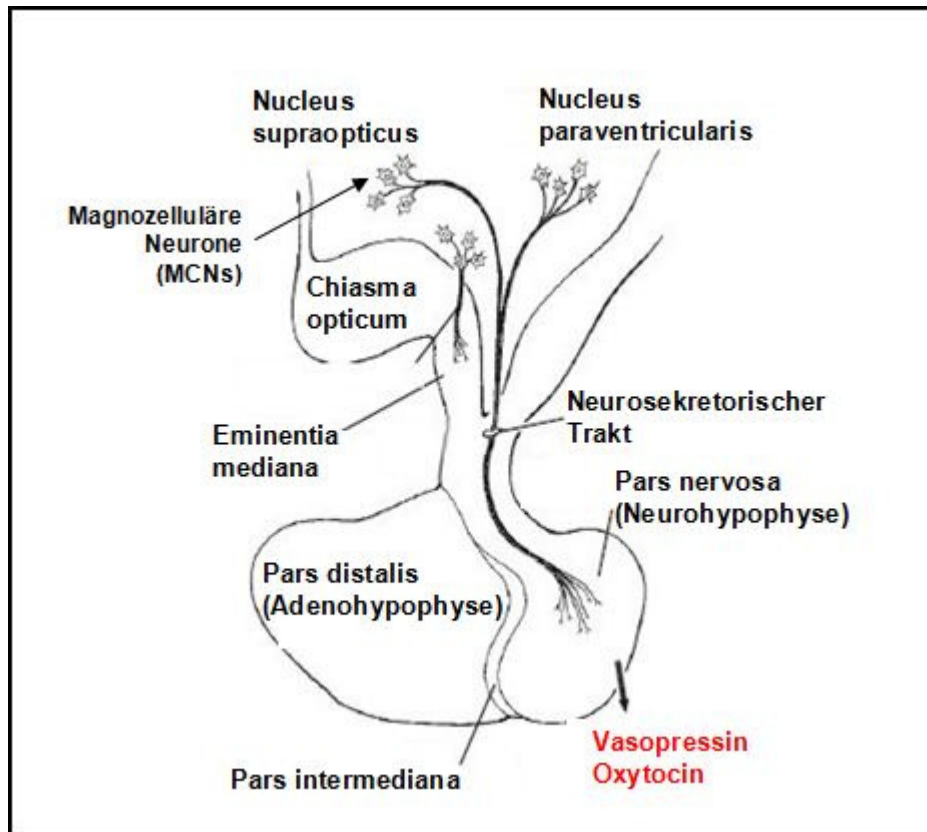
Der Nucleus supraopticus (SON) liegt im ventrolateralen Bereich des vorderen Hypothalamus. RAMON Y CAJAL (1911) beschrieb als Erster die neuronale Gruppe am ventralen Zwischenhirnboden der Ratte und nannte ihn „Nucleus perichiasmaticus“. Auf LOO (1931) geht schließlich der noch heute verwendete Name „Nucleus supraopticus“ zurück. Der SON der Ratte wird klassischerweise in zwei Kernbereiche unterteilt: den *principal* SON (SONp), der mit CAJALS beschriebenem Nucleus perichiasmaticus übereinstimmt (NAUTA und HAYMARKER, 1969), und dem retrochiasmatischen SON (SONr). Der SONp der Ratte

beginnt mit Auftreten des optischen Chiasmus und bildet schließlich ein deutlich abgegrenztes Kerngebiet lateral des optischen Traktes. Je weiter die laterale Ausdehnung des optischen Traktes, desto weiter wandert auch der dicht gepackte SONp in lateraler Richtung. Der optische Trakt zieht sich am ventralen Zwischenhirnboden nach lateral zurück und gibt Raum für den SONr, dessen geringere Zahl an magnozellularen Neuronen ein schmales Band entlang des ventralen Zwischenhirnbodens bilden. Während sich im SONp sowohl Oxytocin- als auch Vasopressin-synthetisierende Neurone befinden, können im SONr hauptsächlich Vasopressin-synthetisierende Neurone detektiert werden (RHODES et al., 1981). Im Gegensatz dazu wird der SON des Huhns durch den Tractus septomesencephalicus (TSM) in zwei Bereiche unterteilt: den SON ventromedialis (SONvm) und den SON externalis (SONe). Der SONvm beginnt mit wenigen Zellen am ventralen Boden des Zwischenhirns ventral des TSM. Während der TSM sich lateral weiter zurückzieht, dehnt sich der SONvm sowohl in dorsaler, als auch lateraler Richtung (medial zum dritten Ventrikel hin) aus. Sein prominentester Part befindet sich etwa 700-900µm nach Beginn des SON. Der optische Trakt tritt beim Huhn erst kaudal des SON auf (KÜNZEL und MASSON 1988).

Im PVN existiert, neben dem magnozellularen hypothalamischen System, dessen Projektionen zum Großteil in der Neurohypophyse enden, ein System mit Neuronen geringerer Größe, welche als parvozellulär bezeichnet werden. Dieses parvozelluläre System des PVN kann in drei Untereinheiten eingeteilt werden. Eine Gruppe der neurosekretorischen parvozellulären Neurone projiziert mit ihren Axonen in die externe Zone des Hypophysenstiels. Sie sezernieren Releasing und Inhibiting Faktoren in den portalen Kapillarkreislauf und regulieren darüber die Freisetzung von Hormonen aus der Adenohypophyse. Eine zweite Gruppe parvozellulärer Neurone projiziert zu autonomen Kerngebieten in Hirnstamm und Medulla und innerviert hier parasymphatische und sympathische präganglionäre Zellen. Eine dritte parvozelluläre Untereinheit projiziert in das limbische System. All diese parvozellulären Neurone exprimieren Neurotransmitter wie u.a. Cholezystokinin (CCK), Substanz P, Neurotensin, Galanin und Enkephalin (BARAKTA et al., 2006; HELMREICH et al., 1999). Für parvozelluläre PVN Neurone ist ferner bekannt, dass diese unter bestimmten physiologischen Verhältnissen, wie z. B. Fieber oder Dehydrierung aber auch Stress und Adrenalectomie, vermehrt AVP exprimieren (SAWCHENKO et al. 1987, ALBECK et al. 1994, WOTJAK et al. 1996, HERMAN et al., 1990; HELMREICH et al., 1999, PITTMAN und WILKINSON, 1992; YANG et al., 2007).



Die Freisetzung der Neuropeptide Vasotocin und Oxytocin erfolgt nicht nur axonal, sondern zudem an Dendriten und Perikarya des SON und PVN (LUDWIG, 1998; NEUMANN et al., 1996, WOTJAK et al., 1996).



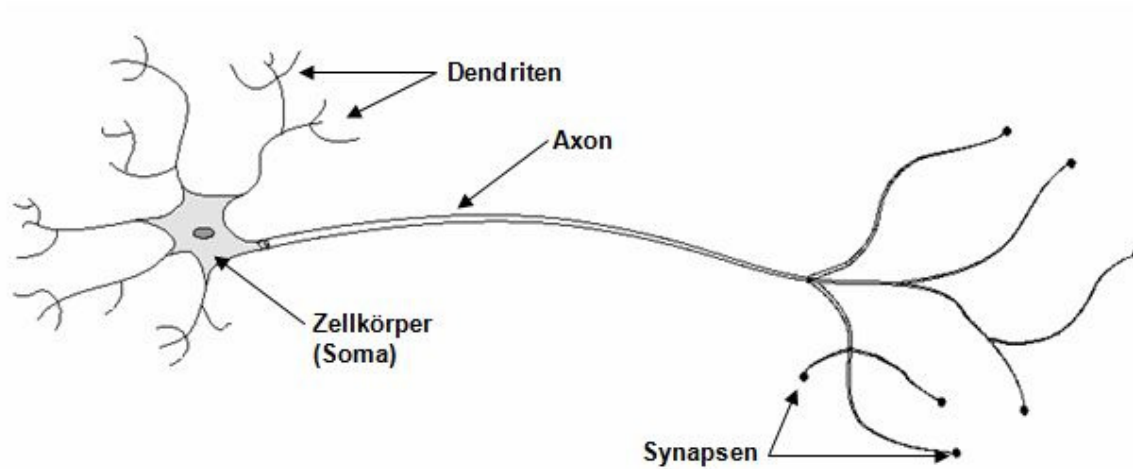
**Abb. 2-1:** Schematische Darstellung des Hypothalamo-Neurohypophysären Systems beim Menschen modifiziert nach ECKERT (1986)

Durch immunhistochemische Nachweisverfahren (RHODES et al., 1981) und Injektionen retrograder Indikatoren (SHERLOCK et al., 1975) in die Neurohypophyse wurden weitere, dem MCN-System des Hypothalamus zugehörige Zellgruppen in der präoptischen Region, dem lateralen Hypothalamus, in einer Region nahe der Anterior commissur, dem perifornicalen Nucleus und dem Nucleus circularis beschrieben.

### 2.1.3 Magnozelluläre Neurone

Nervenzellen bestehen aus einem Zellkörper (Soma), der den Nucleus und weitere Zellorganellen beinhaltet. Vom Soma gehen kurze, stark verzweigte Fortsätze (Dendriten) aus, die Informationen von anderen Zellen empfangen und ein Axon, welches in der Regel länger als die Dendriten ist und vom Neuron ausgehende Informationen zu anderen Zellen weiterleitet. Axone besitzen spezialisierte Endigungen, die Synapsen (Endterminalen), an

denen die Signalübertragung auf andere Zellen mittels Abgabe chemischer Botenstoffe stattfindet.



**Abb. 2-2:** Schematischer Aufbau einer Nervenzelle modifiziert nach HINTON (1992)

Die MCN des SON haben ovale Zellkörper mit 1-3 auffälligen Dendriten, die sich Richtung ventralem Boden des Zwischenhirns ausstrecken (ARMSTRONG et al, 1982), bzw. dorsal gerichtet sind (OLDFIELD et al, 1985). Die MCN des PVN unterschieden sich morphologisch nicht von denen des SON. Ihre Dendriten erstrecken sich jedoch medial durch die parvozelluläre Untereinheit des Nukleus in Richtung des dritten Ventrikels.

Trotz einer Einbettung in ein feines Astrocytennetzwerk, stehen Soma und Dendriten einzelner MCN teilweise in direktem Kontakt zu anderen MCN. Bei gesteigertem Hormonbedarf, kann eine Veränderung in der Architektur des SON beobachtet werden: Zellkörper und Dendriten der MCNs treten vermehrt in direkten Kontakt zueinander (synaptische Plastizität), was die Kommunikation innerhalb des Kerngebietes deutlich erhöht (THEODOSIS und POULAIN, 1992, HATTON und YANG, 1996). Theodosius (1985) wies im SON eine durch Oxytocininjektion ausgelöste elektrische Aktivität der Oxytocin-Neurone nach, die - sowohl in Frequenz als auch in Amplitude - der Aktivitätsrate (*firing rate*) dieser Neurone während der Laktation (kurz vor dem Milchausstoß) entspricht. Desweiteren konnte sie sowohl in prä- als auch postsynaptischen Elementen der magnozellularen Neurone des SON Oxytocin nachweisen.

Die Axone der MCN beider Kerngebiete ziehen durch den Hypophysenstiel direkt in die Neurohypophyse. Dort stehen die Endterminalen der Axone mit Blutgefäßen in Verbindung, in welche die Hormonabgabe erfolgt.

## **2.2 Neurohypophysäre Hormone**

### **2.2.1 Evolution neurohypophysärer Hormone**

Bei den Hormonen, die DU VIGNEAUD (1953) chemisch klassifizierte, handelt es sich um die zwei Säugerhormone Arginin-Vasopressin (AVP) und Oxytocin (OT), bestehend aus neun Aminosäuren, deren Zusammensetzung sich zwischen Spezies bzw. Familien lediglich in ein bis zwei Aminosäuren unterscheidet. Durch Vergleich des ersten Auftretens der verschiedenen Nonapeptide in einzelnen Spezies mit phylogenetischen Daten, konnte ein gemeinsamer Ursprung beider Nonapeptidlinien in einem Urpeptid postuliert werden (ACHER 1970). Man nimmt an, dass es sich bei diesem Urpeptid um Vasotocin handelt, welches bei Cyclostomen nachgewiesen wurde (ACHER 1996). Durch Genduplikation mit anschließender Punktmutation ist bei Knochenfischen ein zweites Hormon entstanden: Isotocin (IT). Beim Übergang zu Amphibien, Reptilien und Vögeln trat im IT eine Aminosäure-Mutation an Position 8 auf, wo jetzt Isoleucin statt Arginin stand. Das neue Peptid wird als Mesotocin (MT) bezeichnet. Bei Säugetieren schließlich erfolgte sowohl in der AVT- als auch in der MT-Hormonfamilie eine Punktmutation (ACHER 1993). Aus AVT entstand Arginin-Vasopressin und aus MT entstand Oxytocin (Leucin an Position 8). Beim Schwein findet sich Lysin-Vasopressin (LVP) mit Lysin statt Arginin an der Position 8 des Säuger-Vasopressins. Die Mutationen in den zwei Nonapeptidgenen betreffen innerhalb der Vasotocin-Linie immer die Aminosäuren 2, 3 und 8, innerhalb der Mesotocin-Linie hingegen die Aminosäuren 4 und 8.

Eine Sonderstellung nehmen die Beuteltiere Australiens und Amerikas ein. Während in australischen Beuteltieren (Känguru, Riesenkänguru) als oxytocinerges Hormon in der Regel nur MT gefunden wurde, kann man in amerikanischen Beuteltieren MT und OT (Nord-Amerikanisches Opossum) oder nur OT (Süd-Amerikanisches Opossum) finden (ROUILLÉ et al. 1985). Bei Beuteldachsen wurden sowohl die vasoaktiven Peptide AVP und LVP als auch die uterotonisch wirksamen MT und OT identifiziert (ROUILLÉ et al. 1988). Das Auftreten von zwei Nonapeptiden gleicher Linie innerhalb einer Spezies wurde durch eine zweite Genduplikation erklärt (ACHER 1985).

<b>Vasopressin/Oxytocin Familie</b>		
<b><u>Vertebraten Vasopressin-Familie</u></b>		
<b>Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Arg-Gly-NH<sub>2</sub></b>	Arginin-Vasopressin (AVP)	Säugetiere Schweine, Flusspferde,
<b>Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Lys-Gly-NH<sub>2</sub></b>	Lysipressin (LVP)	Warzenschweine, einige Beuteltiere
<b>Cys-Phe-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Arg-Gly-NH<sub>2</sub></b>	Phenypressin	einige Beuteltiere
<b>Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Arg-Gly-NH<sub>2</sub></b>	Vasotocin	Vögel, Fische, Amphibien, Reptilien
<b><u>Vertebraten Oxytocin-Familie</u></b>		
<b>Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly-NH<sub>2</sub></b>	Oxytocin	Säugetiere Beuteltiere, Vögel,
<b>Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Ile-Gly-NH<sub>2</sub></b>	Mesotocin	Reptilien, Amphibien, Lungenfische
<b>Cys-Tyr-Ile-Ser-Asn-Cys-Pro-Ile-Gly-NH<sub>2</sub></b>	Isotocin	Knochenfische
<b>Cys-Tyr-Ile-N/Q-Asn-Cys-Pro-L/V-Gly-NH<sub>2</sub></b>	<i>Various tocins</i>	Haie
<b><u>Invertebraten Vasopressin/Oxytocin-Familie</u></b>		
<b>Cys-Leu-Ile-Thr-Asn-Cys-Pro-Arg-Gly-NH<sub>2</sub></b>	Diuretisches Hormon	Heuschrecken
<b>Cys-Phe-Val-Arg-Asn-Cys-Pro-Thr-Gly-NH<sub>2</sub></b>	Annetocin	Regenwürmer Kegelschnecken,
<b>Cys-Phe-Ile-Arg-Asn-Cys-Pro-Lys-Gly-NH<sub>2</sub></b>	Lys-Connopressin	Teichschnecken, Blutegel
<b>Cys-Ile-Ile-Arg-Asn-Cys-Pro-Arg-Gly-NH<sub>2</sub></b>	Arg-Connopressin	Kegelschnecken
<b>Cys-Tyr-Phe-Arg-Asn-Cys-Pro-Ile-Gly-NH<sub>2</sub></b>	Cephalotocin	Octopus
<b>Cys-Phe-Trp-Thr-Ser-Cys-Pro-Ile-Gly-NH<sub>2</sub></b>	Octopressin	Octopus

**Abb. 2-3:** Nonapeptide der Vasopressin-Linie und Oxytocin-Linie modifiziert nach CALDWELL und YOUNG (2006)

## 2.2.2 Genstruktur neurohypophysärer Hormone

Die Nonapeptide werden wie die meisten sekretorischen Proteine in Form längerer Vorläufer-Hormone (Preprohormone) synthetisiert. Die Preprohormone bestehen aus einem Signalpeptid, gefolgt von dem Nonapeptid und einem Neurophysin und im Falle des AVP einem zusätzlichen Glykopeptid. Ihre genomische Sequenz besteht aus drei Exons, die durch zwei Introns unterbrochen werden. Exon A codiert für das Signalpeptid, das Nonapeptid und die ersten neun Aminosäuren (AS) des Neurophysins. Der zentrale Teil des Neurophysins liegt auf Exon B (AS 10-77), das Ende des Neurophysins auf Exon C (AS 78-95). Die Preprohormone der Vasotocin-Linie tragen zusätzlich noch ein Glykopeptid, das sich auf Exon C dem Neurophysin anschließt. Die meisten Sequenzunterschiede zwischen den Spezies findet man in Exon C, während Exon B die größte Homologie im Vergleich aufweist. Dem Neurophysin selbst konnte keine biologische Aktivität nachgewiesen werden, stattdessen fungiert es als Trägermolekül des Nonapeptids. Es soll vor enzymatischem Abbau des Nonapeptids schützen (LEGROS und GEENEN, 1996) und funktionell für das Prozessieren und

vesikuläres Verpacken desselben sein (DE BREE, 2000). Dem Glykopeptid konnte noch keine Funktion zugeschrieben werden. BARRAT et. al (2004) vermutet jedoch eine Stabilisierung des AVP-Präkursors, der in Abwesenheit des Glykopeptids instabiler zu sein scheint, als sein Oxytocin-Gegenspieler.

Das Trägermolekül Neurophysin unterscheidet sich zwischen den beiden Nonapeptid-Familien in den Aminosäuren der Position 2, 3, 6 und 7. Darauf beziehend bezeichnet man das Neurophysin I der Mesotocin/Oxytocin-Linie auch als VLDV, das Neurophysin II der Vasotocin/Vasopressin-Linie als MSEL (*one letter code* der beteiligten Aminosäuren). Innerhalb einer Spezies unterscheiden sich die beiden Neurophysine in ungefähr 20% der Aminosäuren, während der gleiche Typ des Neurophysins zwischen Spezies und sogar Familien um weniger als 5% variiert (ACHER, 1980).

CHAUVET et al. (1988) konnten eine Besonderheit des Vasotocin-Vorläuferhormons bei Gänsen zeigen. Während bei seinem Säugeranalog das Glykopeptid bei der Prozessierung vom Neurophysin getrennt wird, fehlt bei Vögeln diese zusätzliche Schnittstelle, Neurophysin II und Glykopeptid bilden ein sog. großes MSEL. Einen weiteren Unterschied konnte HAMMANN et al. (1992) auf genomischer Ebene feststellen. Im Vergleich zu bereits sequenzierten AVP-Genen weicht das Intron I des Hühner AVT-Gens deutlich ab. Es ist kleiner als das Intron II und damit auch kleiner als seine Äquivalente in anderen Spezies.

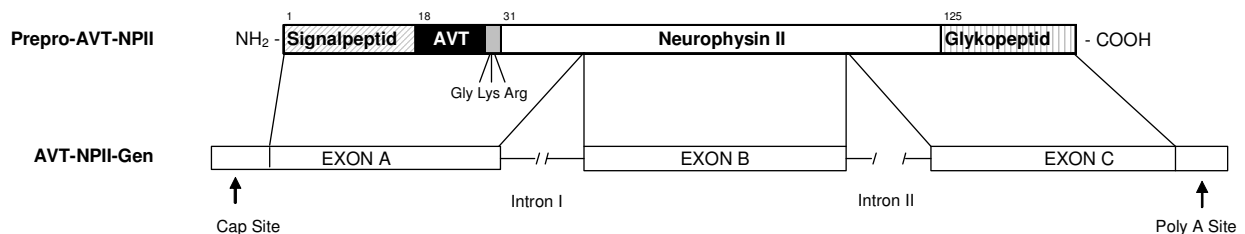


Abb. 2-4: Genstruktur des Vasotocin-Neurophysin II-Gens modifiziert nach HAMANN et al. (1992)

### 2.2.3 Genregulation neurohypophysärer Hormone

Die Expression eines Gens verläuft in mehreren Stufen, von denen jede kontrolliert werden kann. Der komplette Mechanismus besteht aus der Transkription, der Prozessierung der primären mRNA, anschließender Translation der genetischen Information in Aminosäuresequenzen bis hin zur Prozessierung des Peptids (Proteinbiosynthese).

### 2.2.3.1 Transkription

Unter Transkription versteht man das Umschreiben genetischer Information, die in Form von genomischer DNA im Zellkern (Nukleus) lokalisiert ist, in mobile *messenger*-RNA (mRNA). Zur Regulation der Transkription bedarf es einer Reihe von Vorgängen, die spezifisch an der Umsetzung von extrazellulären Veränderungen in definierte intrazelluläre Aktionen beteiligt sind.

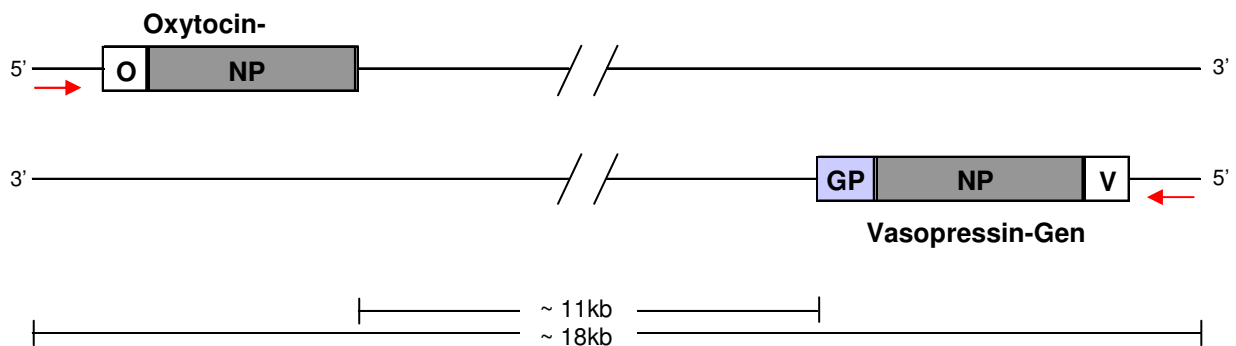
Die meisten proteincodierenden Eukaryotengene besitzen Promotorregionen mit einer TATA-Box (Hogness-Box), die etwa 25 Basenpaare vor Beginn der proteincodierenden Sequenz liegt. Häufig befindet sich auch eine CAAT enthaltende Konsensussequenz ca. 75 Basenpaare vor Transkriptionsbeginn. Diese Promotorstellen binden spezifisch die RNA-Polymerase und bestimmen den Transkriptionsstart. Die Promotorregionen der Nonapeptide Vasopressin und Oxytocin enthalten jedoch keine CAAT, sondern atypische TATA Boxen (GAINER und WRAY, 1994). HO und MURPHY (2002) vermuten eine Beteiligung der atypischen TATA Box im Vasopressingen (CATA) in zellspezifischer und physiologischer Regulation.

Eukaryotische Zellkerne enthalten drei RNA-Polymerasetypen (Typ I, II und III), wovon die RNA-Polymerase II die Mehrheit von Genen transkribiert, einschließlich aller proteincodierenden Gene. Die RNA-Polymerase II benötigt sog. allgemeine Transkriptionsfaktoren. Diese Faktoren (Proteine) helfen, die RNA-Polymerase richtig an den Promotor zu binden und den DNA-Doppelstrang zu trennen, um eine Transkription zu ermöglichen. Die Proteine heißen „allgemein“, weil sie an alle, von der RNA-Polymerase II angesteuerten Promotoren binden. Zusammen mit den Transkriptionsfaktoren bildet die RNA-Polymerase II einen Transkriptions-Initiationskomplex. Sobald die Polymerase mit der Elongation des RNA-Transkripts begonnen hat, lösen sich die meisten allgemeinen Transkriptionsfaktoren von der DNA, um für die Bildung eines neuen Transkriptions-Initiationskomplexes mit einer neuen RNA-Polymerase II zur Verfügung zu stehen.

Die Transkription eines Gens wird zusätzlich von regulatorischen Sequenzen beeinflusst (*Enhancer/Suppressor* Sequenzen). Diese liegen entweder am 5' oder 3' Ende eines Gens und können bis zu mehreren Kilobasen vom Transkriptionsstart bzw. -ende entfernt sein. Hierbei handelt es sich um genspezifische Bindungsstellen, deren Bindungspartner die Transkription des Gens verstärken bzw. inhibieren können (MITCHEL und TJIAN 1989). Ein Beispiel hierfür sind die Hormonantwortelemente (*hormon response elements, HRE*). Dabei handelt es sich um spezifische DNA-Sequenzen, die eine Bindungsstelle für Hormonrezeptoren (z.B: Steroidrezeptoren) darstellen. Steroidhormone wie Östradiol, Progesteron, Testosteron und Cortisol überwinden die Zellmembran und binden im Cytoplasma an spezifische

Steroidrezeptoren. Die Hormon-Rezeptor-Komplexe gelangen über die Kernmembranporen in den Nukleus, wo sie an die HREs der DNA binden. Dort induzieren oder reprimieren die die Transkription eines Gens. PAK et al. (2007) konnten eine Stimulation der AVP-Promotor-Aktivität durch  $5\alpha$ -dihydrotestosterone (DHT) und seinem Metabolit  $5\alpha$ -androstane- $3\beta$ , $17\beta$ -diol mittels Östrogen-Rezeptor beta (ER $\beta$ ) in humanen neuronalen Zellen nachweisen.

Die beiden Gene der Nonapeptide liegen auf demselben Chromosom nur 11 Kilobasenpaare (Ratte) voneinander entfernt. Sie sind auf gegenüberliegenden DNA-Strängen so orientiert, dass sich ihre regulatorischen Bereiche des Transkriptionsstarts direkt gegenüberliegen (MOHR et al, 1988).



**Abb. 2-5:** Lage der Nonapeptidgene bei der Ratte modifiziert nach RICHTER (1988)

In eukaryotischen Zellen wird die neu entstehende RNA-Kette bereits während der Transkription modifiziert. Sie erhält am 5' Ende eine Kappe (*Cap*), die zur Stabilität der mRNA beitragen sollen, da sie deren 5' Ende vor Phosphatasen und Nukleasen schützt, desweiteren wirkt sie translationsverstärkend. An das 3' Ende einer *messenger*RNA (mRNA) wird ein Polyadenylatschwanz (etwa 250 A-Reste) angefügt. Die Funktion des Poly-A-Schwanzes ist nicht restlos geklärt. Zum einen kann eine mRNA ohne Poly-A-Schwanz zwar aus dem Zellkern transportiert werden, scheint aber als Matrize für die folgende Translation weit weniger effektiv als eine polyadenylierte mRNA. Zum anderen scheint die Lebensdauer einer mRNA abhängig von der Länge ihres Poly-A-Schwanzes (Abbau durch Nukleasen). CARRAZANA et al. (1988) konnten beim AVP der Ratte eine Verlängerung des Poly-A-Schwanzes von ca. 250bp auf ca. 400bp nach Dehydrierung zeigen. Diese Verlängerung ist eine akute Reaktion auf den osmotischen Stimulus (CARTER und MURPHY, 1991) und wird unabhängig von der gesteigerten mRNA-Bildung gesteuert (CARTER und MURPHY, 1989b). Die nach der Transkription entstandene prä-mRNA enthält noch Intronsequenzen, die in der Regel von Spleißosomen herausgeschnitten werden. Diese bestehen aus Ribonukleoproteinen

(snRNAs) und befinden sich häufig an den Kernporen, welche die mRNA passiert, um ins Cytoplasma zu gelangen. Intronsequenzen beginnen stets mit den Basen GU und enden mit den Basen AG. Zudem besitzen sie eine Verzweigungsstelle (*branch site*), die etwa 20-50 Basenpaare *upstream* der 3'-Spleißstelle liegt. Obwohl die Länge eines Introns zwischen 50 und 10000 Nukleotiden variieren kann, bedarf es ausschließlich dieser drei Sequenzabschnitte, um den Ort des Spleißens zu bestimmen.

### 2.2.3.2 Proteinbiosynthese

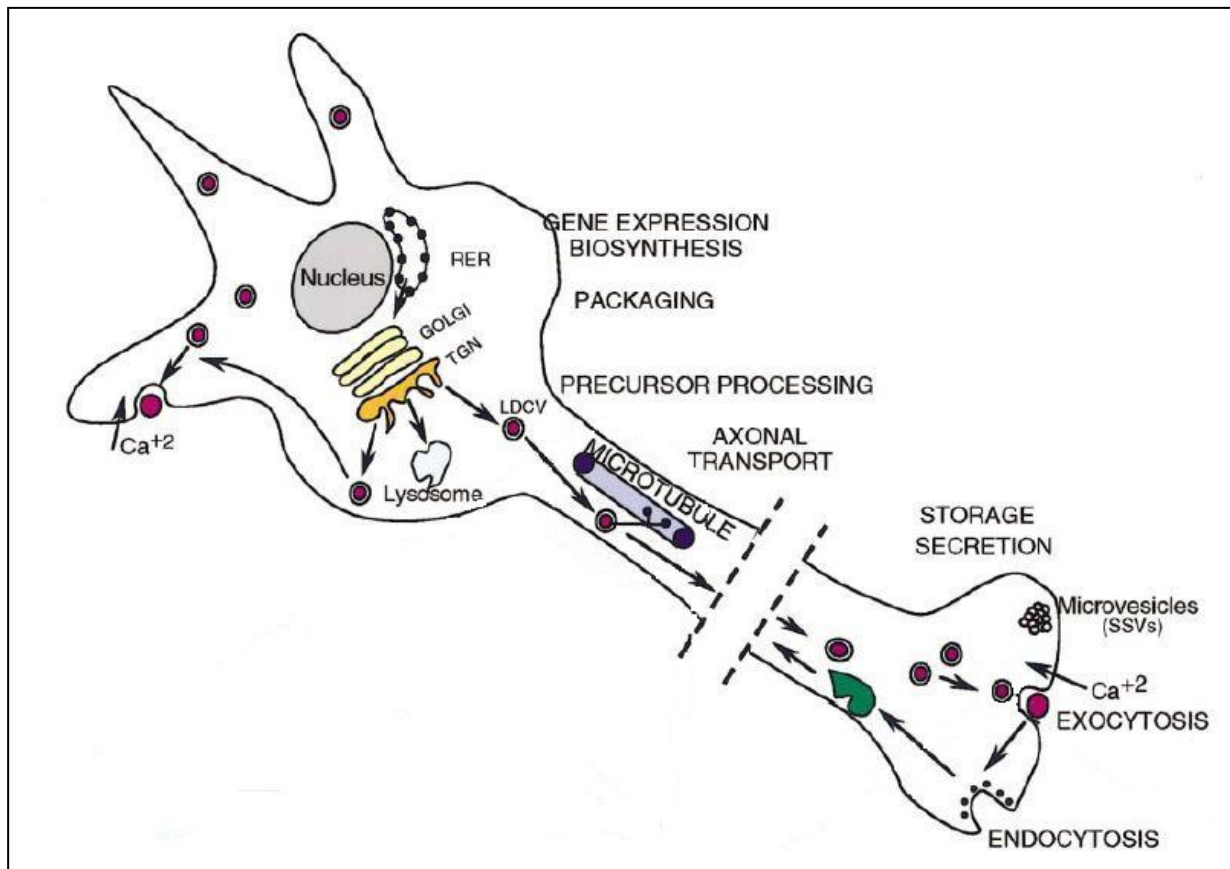
Die in das Cytoplasma transportierte mRNA dient nun als Matrize der Proteinbiosynthese. An Ribosomen des rauen Endoplasmatischen Reticulums (ER) wird die genetische Information mittels *transfer*-RNA (tRNA) in eine Aminosäuresequenz translatiert. Während des Transportes durch das ER hin zum Golgi-Apparat beginnt bereits die Prozessierung des entstandenen Polypeptids: Faltung der Polypeptidkette, Abspaltung einzelner Peptide und Schwefelbrückenbildung. Im Golgi-Apparat werden die synthetisierten Peptide schließlich in LDCV verpackt, die sich von der Membran der Golgi-Tubuli abschnüren und die Peptide zum Zielort transportieren. Noch in den Vesikeln findet die endgültige Prozessierung zum biologisch aktiven Peptid statt (BURBACH et al., 2001).

### 2.2.4 Axonaler und dendritischer Transport

Die LDCV dienen nicht nur der endgültigen Prozessierung der Nonapeptide, sondern auch ihrem axonalen und dendritischen Transport, der Langzeitspeicherung und schließlich der Sekretion der biologisch aktiven Peptide. Sie werden vom Zellkörper ausgehend entlang mikrotubulärer Strukturen vermutlich mit Hilfe eines molekularen Motors durch das Axon bis hin zu der Synapse transportiert. Direkte Messungen des LDCV-Transports geben eine Transportgeschwindigkeit von ungefähr 140mm/Tag an (CASTEL et al, 1984). Die meisten LDCV der MCN des hypothalamo-neurohypophysären Systems befinden sich in den Endterminalen in der Neurohypophyse, wo sie bis zur Sekretion der in ihnen enthaltenen Peptide gespeichert werden. Auslöser ist ein elektrischer Impuls, der zu einem Einstrom von Kalzium-Ionen in die Synapse führt. Die LDCV verschmelzen daraufhin mit der synaptischen Membran (Exocytose) und sezernieren ihren Inhalt in das Kapillarsystem. LDCV findet man jedoch nicht nur in den axonalen Endterminalen. Einige können auch im Zellkörper selbst und



in den Dendriten gespeichert werden. Ebenso konnte auch in den Dendriten eine Kalzium-abhängige Sekretion beobachtet werden (LUDWIG, 1998).



**Abb. 2-6:** Schematische Darstellung eines neurosekretorischen Neurons nach BURBACH (2001)

Neben den Peptiden selbst kann auch mRNA axonal transportiert werden. TREMBLEAU et al. (1996) weisen mittels elektronenmikroskopischer Aufnahmen AVP mRNA in der Neurohypophyse nach. Da bisher kein raues Endoplasmatisches Reticulum in den Endterminalen der MCN gefunden werden konnte (MOHR und RICHTER, 2003), welches zur Biosynthese des AVP vor Ort benötigt würde, liegt die Vermutung nahe, umliegende Pituizyten könnten in der Neurohypophyse für diese mRNA Verwendung finden oder gar verantwortlich sein. JANAKY et al. (1998) beschrieben die AVP Synthese und dessen Freisetzung von Neurohypophysenzellen in Zellkultur, während PU et al. (1995) AVP mRNA und AVP-Peptid in Pituizyten nachweisen konnten. BARTH und GROSSMANN (2000) wiesen AVT mRNA in extrasomalen Bereichen magnozeller Neurone nach. MOHR und RICHTER (2003) vermuten jedoch im axonalen Transport der mRNA ein Überbleibsel aus der Neuronenentwicklung. Sie konnten bereits bei 15 Tage alten Ratten-Embryonen AVP mRNA in den Axonen der MCN nachweisen, d.h zu einem Zeitpunkt bevor sich das hypothalamo-neurohypophysäre System vollständig entwickelt hatte. Im adulten HNS scheinen die MCN-

Axone die Fähigkeit der Proteinsynthese jedoch verloren zu haben (MOHR und RICHTER, 2004).

Unstrittig hingegen ist der dendritische Transport der mRNA und das Vorhandensein nötiger Translations-Komponenten (STEWART et al., 2001). Über Dendriten, die mit Dendriten oder Zellkörpern anderer Zellen in Verbindung stehen, entstehen komplexe Netzwerke, in denen die Neurone miteinander kommunizieren und auf Veränderungen reagieren müssen. Die Möglichkeit, vor Ort Proteine zu synthetisieren, die in der Modulation der synaptischen Funktionen eine Rolle spielen, birgt zum einen zeitliche aber auch räumliche Vorteile (SCHUMANN, 1999; STEWARD und SCHUMANN, 2001; STEWARD und WORLAY 2002, MOHR und RICHTER, 2004).

### 2.2.5 Funktion des AVT/AVP-Systems

Das AVT des Vogels ist entsprechend seinem Säuger-Analog ein antidiuretisches Hormon und reguliert den Wasser- und Elektrolythaushalt (SIMON-OPPERMANN et al., 1988; RAMIERI and PANZICA, 1989). Gleichzeitig beeinflusst es die Oviposition (SAITO und KOIKE, 1992) und übernimmt hierbei Funktionen, die beim Säuger dem Oxytocin zugeschrieben werden (Kontraktion der Uterusmuskulatur). Dem eigentlichen OT-Analog Mesotocin konnte hingegen noch keine eindeutige physiologische Funktion nachgewiesen werden. Es gibt jedoch Hinweise, dass MT auf Veränderungen des Blutvolumens reagiert (NOUWEN, 1984). Neben Regulation der Nierenfunktion und der Eiablage, beeinflusst AVT auch die Regulation der Körpertemperatur (HASSINEN et al., 1994) und des Blutdrucks (SZCZEPANSKA-SADOWSKA et al., 1985; SHIMADA et al. 1986; KOIKE et al., 1988). AVT beeinflusst zudem bestimmte Komponenten des Sexualverhaltens: Kopulationsverhalten (KILHSTRÖM and DANNIGE, 1972), Singen (VOORHUIS et al., 1991) und sexuelle Motivation (BERNROIDER and LEUTGEB 1994).

#### 2.2.5.1 Osmotische Stimulation

Die experimentell induzierten osmotischen Stimuli können bezüglich der Form ihrer Applikation und des Charakters ihrer Auswirkungen in drei Typen eingeteilt werden:

1. Als **salt loading** bezeichnete Substitution des Trinkwassers durch hypertonische NaCl Lösung (2% W/V). Sie wird als chronischer hyperosmotischer Stimulus angewendet.

2. **Dehydrierung**, d.h. keine Bereitstellung von Trinkwasser. Sie ist zeitlich begrenzt und wird als hyperosmotischer, hypovolämischer Stimulus eingesetzt.
3. **Intraperitoneale Injektion** einer 1,5M NaCl Lösung. Sie wird als hyperosmotischer, isovolämischer Stimulus angewendet. Da diese Form der Behandlung eine Stressreaktion des Tieres hervorrufen kann, wird die Injektion vorwiegend an narkotisierten Tieren durchgeführt.

Die Reaktion auf osmotische Stimuli wird vornehmlich durch magnozellige Neurone in SON und PVN vermittelt. Sowohl die Menge an synthetisierter AVT mRNA (SAITO u. GROSSMANN, 1998) als auch die Länge ihres poly-A-Schwanzes (KOEHLER, 2000) nimmt zu. Die Adenylierung dient sowohl der Stabilisierung (BREWER und ROSS, 1988) als auch der vermehrten Translation der mRNA (PALATNIK et al., 1984). Bei Ratten konnte neben einem Anstieg des AVP-Transkripts (MEISTER et al., 1990) eine verminderte Immunreaktivität des Peptids im Hypothalamus als Folge der Dehydrierung festgestellt werden (CHOY and WATKINS, 1977; REAUX-LE GOAZIGO et al., 2004). Ebenso scheint die Anzahl AVP-synthetisierender Neurone einem osmotischen Stimulus unterworfen. AMAYA et al. (1999) zeigten im Hypothalamus der Ratte nach osmotischer Stimulation mittels *salt loading* eine vermehrte Anzahl Neurone, die AVP-mRNA enthielten. Nach Rehydrierung verringerte sich die Anzahl der mittels *In Situ*-Hybridisierung nachgewiesenen MCNs wieder auf ein normales Level. REAUX-LE GOAZIGO et al. (2004) verwendeten die Dehydratation als osmotischen Stimulus und wies eine Verminderung sowohl in Anzahl als auch in Peptidgehalt der AVP-haltigen Neurone mittels Immunhistochemie im SON und PVN der Ratte nach. Auch die Größe der AVP-Neurone ändert sich mit osmotischer Stimulation. KALIMO (1975) wies nach Dehydratation eine Vergrößerung der Zellkörper von MCN im SON nach. Hatton et al. (1984) beschrieb zudem einen Rückgang der Gliazell-Kontakte.

Von der Neurohypophyse sezerniert zirkuliert AVT als freies Hormon im Blut. Die Plasma-Konzentration des AVT der Vögel liegt bei 5-30pg/ml (GRAY und SIMON, 1983; STALLONE und BRAUN, 1986a,b; GRAY und ERASMUS, 1988). Seine biologische Halbwertszeit ist mit 1-3 Minuten kurz. Die Veränderungen im AVT-System der Vögel gehen hauptsächlich auf osmotische Stimuli, weniger auf Veränderungen im Blutvolumen zurück. Der Anstieg der Plasmaosmolalität aufgrund von Dehydrierung geht mit einem linearen Anstieg der Plasma-AVT-Konzentration einher (0.3-0.4 pg/ml per mOsm/kg bei der Ente, GRAY und SIMON, 1983; 1.3 pg/ml per mOsm/kg beim Huhn, STALLONE und BRAUN, 1986a,b).

MÜHLBAUER et al. (1992) wiesen bereits nach 19 Stunden Wasserentzug einen Anstieg der AVT-mRNA im Hypothalamus des Huhns nach, während die Plasmaosmolalität kaum vom

basalen Level abwich. Ein osmotischer Stimulus, induziert durch Gabe hypertotonischer NaCl Lösung für fünf Tage, führte jedoch zu einem deutlichen Anstieg der Osmolalität, während sich der AVT-Gehalt des Plasmas kaum veränderte (MÜHLBAUER et al., 1992). Die Dehydrierung zeigt beim Huhn in den ersten 4 Stunden keinen Effekt auf den Plasma-AVT-Gehalt. Dieser kann erst ab ca. 6-8 Stunden nach Einsetzen des Stimulus beobachtet werden und wird begleitet von einem Anstieg der hypophysären AVT-mRNA (SAITO und GROSSMANN, 1998).

### **2.2.6 Coexpression mit anderen Peptiden**

Neben Oxytocin- und Vasopressin-synthetisierenden magnozellulären Neuronen haben GLASGOW et al. (1999) im SON laktierender Ratten auch MCNs nachgewiesen, die beide Nonapeptide zu gleichen Teilen exprimieren. Auch andere Neuropeptide sind im magnozellulären System mit Vasopressin und/oder Oxytocin colokalisiert, darunter u.a.: CRH, Fos-Protein, Galanin und Apelin, (GLASGOW et al., 1999; PIRNIK et al., 2004; GAI et al., 1990; REAUX-LE GOAZIGO et al., 2004). Physiologische Stimuli wie Laktation und osmotische Stimulation, welche die Synthese von Oxytocin und Vasopressin und deren Sezernierung beeinflussen, modulieren auch die hypothalamische Expression von Galanin (LANDRY et al., 1998 ; CISOWSKA-MACIEJEWSKA und CIOSEK, 2005). Neben dem Peptid selbst konnten auch Bindungsstellen (Rezeptoren) für Galanin im SON und PVN der Ratte nachgewiesen werden (LANDRY et al., 1998; BURAZIN et al., 2001), deren Expression ebenfalls durch physiologische Stimuli wie Dehydrierung verändert wird.

## **2.3 Galanin**

### **2.3.1 Peptidaufbau**

Galanin ist ein Peptid bestehend aus 29-30 Aminosäuren. Es wurde erstmals von TATEMOTO et al. (1983) aus dem Dünndarm des Schweins isoliert und erhielt seinen Namen aufgrund der Aminosäuren Glycin (Aminoende) und Alanin (Carboxylende). Auch das Galanin des Schafs und des Huhn wurde aus Dünndarm bzw. Gehirn isoliert und sequenziert (SILLARD et al., 1991; NORBERG et al., 1991). Nachdem RÖKAEUS und BROWNSTEIN (1986) den Galanin-Prekursor des Schweins sequenzieren konnten, wurde die Aminosäuresequenz des Galanin von Kuh, Ratte und Mensch über die Nukleotidsequenz der Prekursor-mRNA translatiert

(RÖKAEUS und CARLQUIST, 1988; VRONTAKIS et al., 1987; KAPLAN et al., 1988; EVANS und SHINE, 1991).

	AS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	
Schaf	NH-	G	W	T	L	N	S	A	G	Y	L	L	G	P	H	A	I	D	N	H	R	S	F	H	D	K	H	G	L	A	-COOH
Schwein	NH-	G	W	T	L	N	S	A	G	Y	L	L	G	P	H	A	I	D	N	H	R	S	F	H	D	K	Y	G	L	A	-COOH
Mensch	NH-	G	W	T	L	N	S	A	G	Y	L	L	G	P	H	A	V	G	N	H	R	S	F	S	D	K	N	G	L	T	-COOH
Rind	NH-	G	W	T	L	N	S	A	G	Y	L	L	G	P	H	A	L	D	S	H	R	S	F	Q	D	K	H	G	L	A	-COOH
Maus	NH-	G	W	T	L	N	S	A	G	Y	L	L	G	P	H	A	I	D	N	H	R	S	F	S	D	K	H	G	L	T	-COOH
Ratte	NH-	G	W	T	L	N	S	A	G	Y	L	L	G	P	H	A	I	D	N	H	R	S	F	S	D	K	H	G	L	T	-COOH
Huhn	NH-	G	W	T	L	N	S	A	G	Y	L	L	G	P	H	A	V	D	N	H	R	S	F	N	D	K	H	G	F	T	-COOH
Wachtel	NH-	G	W	T	L	N	S	A	G	Y	L	L	G	P	H	A	V	D	N	H	R	S	F	N	D	K	H	G	F	T	-COOH
Goldfisch	NH-	G	W	T	L	N	S	A	G	Y	L	L	G	P	H	A	I	D	S	H	R	S	L	G	D	K	H	G	V	A	-COOH

**GALANIN**

Abb. 2-7: Aminosäuren-Sequenzvergleich Galanin

Auch Galanin wird zunächst als Teil eines Vorläuferhormons gebildet, dem prepro-Galanin. Die ersten 23 Aminosäuren (AS) kodieren ein Signalpeptid, das für den Transport des Preprohormons ins Endoplasmatische Reticulum verantwortlich ist (KAPLAN et al., 1988). Es folgen 10 AS, wovon die letzten beiden Lysin und Arginin einer Schnittstelle entsprechen. Im direkten Anschluss befindet sich Galanin, dessen Ende wiederum von Lysin und Arginin flankiert wird. Dem Galanin schließt sich das 59 AS lange *galanin-message-associated peptide* (GMAP) an. Das prepro-Galanin hat eine Gesamtlänge von 123 AS (Schwein, Kuh, Mensch) bzw. 124 AS (Ratte, Maus).

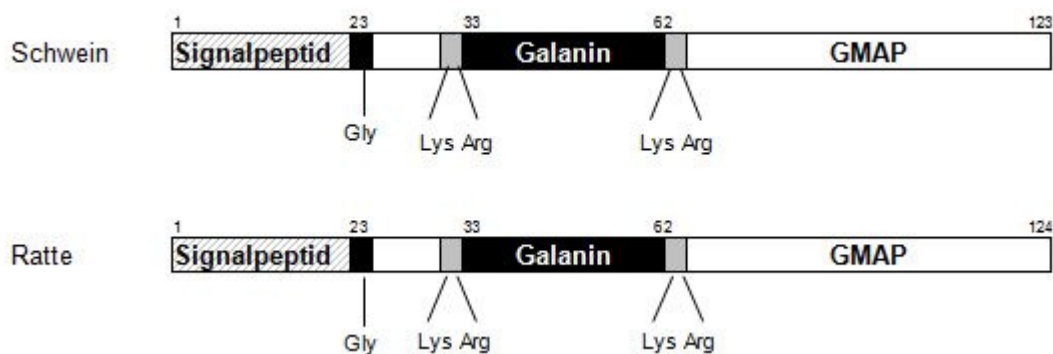


Abb. 2-8: Schematische Darstellung des prepro-Galanin von Schwein und Ratte (modifiziert nach MERCHENTHALER et al., 1993)

### 2.3.2 Biologische Halbwertszeit des Galanin

Die biologische Aktivität des Galanin wird durch enzymatische Abspaltung der N-terminalen Fragmente beendet. Hierdurch entstehen die biologisch inaktiven Galanin-Reste 3-29/30 bzw. 3-16 (AS) (GUNDLACH et al., 2001). Die biologische Halbwertszeit des Peptids beträgt 60 Minuten. Diese lange Dauer der möglichen biologischen Aktivität, lässt parakrine Funktionen des Galanins vermuten (BARTAFAL, 2000).

### 2.3.3 Genstruktur

Mittels Southern und Northern Blot Untersuchungen in unterschiedlichen Geweben wurde ein Einzelgen für Galanin nachgewiesen, dessen mRNA eine Länge von ungefähr 900bp inklusive poly-A-Schwanz aufweist (KAPLAN et al., 1988). Das Galanin-Gen der Ratte hat eine Größe von annähernd 5kb und setzt sich aus 6 Exons und 5 Introns zusammen. Das prepro-Galanin beginnt mit Exon 2 und endet mittig des Exons 6 (KAPLAN et al., 1991). Der Transkriptionsstart befindet sich auf Exon 1.

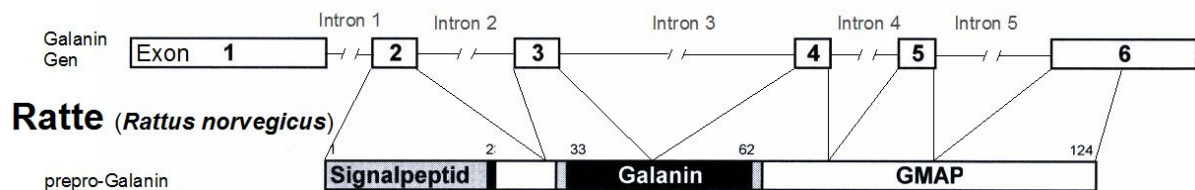


Abb 2-9: Schematische Darstellung des Galanin-Gens der Ratte

KOHCHI und TSUTSUI (2000) haben für die Wachtel ein zweites, um 69bp verlängertes Galanin-Transkript nachgewiesen. Dabei wird die Aminosäure Histidin, an Stelle 14 des Galanins durch Arginin ersetzt. Sie konnten beide Transkriptvarianten in unterschiedlichen Geweben dokumentieren: Gehirn, Leber, Darm, Ovar und Eileiter (Magnum und Uterus). Mittels RT-PCR wurde eine stärkere Galanin-Genexpression in Gehirn, Darm, Ovar und Uterus, verglichen mit Leber und Magnum, nachgewiesen. Die Menge des eigentlichen Galanin-Transkripts (*Transkriptvariante* TV1) ist hierbei um ein dreifaches höher als die der längeren Transkriptvariante (TV2). Eine Northern Blot-Analyse hingegen ergab im Ovar ein deutlich stärkeres Signals für TV2 verglichen mit TV1. Der Galanin-Prekursor des Vogels weist zum Säuger eine Homologie von durchschnittlich 59% auf (Kuh 63%, Mensch 60%, Maus 54%, Schwein 58%, Ratte 62%), die TV2 als Variante nicht miteingerechnet. Auch für

das Huhn sind zwei Transkriptvarianten in der Sequenz-Datenbank des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) veröffentlicht. Hierbei handelt es sich ebenfalls um die TV1 als original Galanin-Transkript und um eine um 72bp verlängerte Variante (TV2). Die AS-Sequenzen der TV2 von Wachtel und Huhn unterscheiden sich ausschließlich um eine zusätzliche AS beim Huhn. Zu dieser zweiten Variante gibt es beim Huhn außer den Sequenzdaten selbst noch keinerlei Untersuchungen.

### 2.3.4 Verteilung Galanin-immunreaktiver Neurone im Diencephalon

In allen bisher untersuchten Spezies ist die Galanin-Immunreaktivität im Hypothalamus am höchsten. In der Ratte lassen sich mehrere Zellgruppen deutlich abgrenzen. Eine sehr auffällige Zellgruppe befindet sich ventrolateral der *medial preoptic area* (MPA) und erstreckt sich von der rostralen Begrenzung des Chiasma opticum zum SON. Eine weitere Zellgruppe liegt im preoptischen Nucleus suprachiasmaticus, eine dritte im preoptischen Nucleus periventricularis. Die vierte Gruppe Galanin-immunoreaktiver (GAL-ir) Neurone erstreckt sich lateral der MPA zum preoptischen Nucleus, dem *medial forebrain bundle* (mfb) und dem anterior hypothalamischen Nucleus (MERCHANTHALER et al., 1993).

Eine große Zahl GAL-ir Perikarya befinden sich im vorderen Hypothalamus, beginnend auf Höhe der Commissura Anterior (CA) bis hin zum PVN. Sowohl die magno- als auch die parvozellulären Bereiche des PVN enthalten GAL-ir Zellen (SWANSON und KUYPERS, 1980), in denen Galanin mit einer großen Zahl anderer Neuropeptide und Neurotransmitter kolokalisiert ist (u.a. CRH, TRH, Oxytocin, Vasopressin). Zudem ist eine hohe Dichte an GAL-ir Fasern zu beobachten. Einige der parvozellulären Untergruppen des PVN projizieren zur Eminentia mediana (ME) (MERCHANTHALER, 1991b) und zum Hirnstamm. Große, vergleichsweise intensiv markierte GAL-ir Zellen findet man im SON und im Nucleus arcuatus (AN), die größte Anzahl GAL-ir markierte Zellen im Nucleus dorsomedialis. Die Mehrzahl jener Zellen projiziert in die externale Zone der ME (NIMI et al, 1990, MERCHANTHALER, 1991). Von dort gelangt das Hormon über den Portalkreislauf in die Adenohypophyse, wo es die Sekretion einzelner Hypophysenhormone beeinflusst. Die GAL-ir Fasern der internalen Zone projizieren zur Neurohypophyse, die das Hormon direkt in den peripheren Blutkreislauf abgibt. Bei Primaten wurden GAL-ir markierte Zellen im ventromedialen Hypothalamus, SON, lateralen Hypothalamus und PVN nachgewiesen (MELANDER und STAINES, 1986; GENTLEMAN et al, 1989). Auch bei der Wachtel sind die

Zwischenhirnregionen, der ventrale Hypothalamus und die ME GAL-ir markierte Regionen (JOZA und MESS, 1993).

### 2.3.5 Funktion

Galanin ist ein Neuropeptid ohne Zugehörigkeit zu einer der bekannten Neuropeptidfamilien. Im Zentralnervensystem moduliert Galanin die Regulation des neuroendokrinen Systems. Seine Wirkung erfolgt über G-Protein gekoppelte Rezeptoren und Ionenkanäle, meistens im Sinne einer Inhibition der Sekretion von Hormonen und Transmittern. So inhibiert es die Freisetzung von Dopamin im Hypothalamus, stimuliert aber die Sekretion von Prolaktin und dem Wachstumshormon (PERUMAL et al., 2003). Galanin ist u.a. kolokalisiert mit GABA (SIMMONS et al., 1995), Serotonin (SUZUKI et al., 2000), Luteinisierendes Hormone-Releasing Hormone (LHRH) (MERCHANTHALER et al., 1990) AVP und Oxytocin (GLASGOW et al., 1999). Seine Expression ist während der Schwangerschaft erhöht, zudem wird es in der Plazenta gebildet (VRONTAKIS et al., 1992 und KLEINE et al., 2001). Neben seiner Wirkung als Modulator reproduktiver Funktionen (LOPEZ et al., 1991, LANDRY et al., 1997) spielt Galanin des Weiteren eine Rolle im Energiestoffwechsel (Nahrungsaufnahme). Ihm wird eine orexigene Wirkung zugesprochen, die sich insbesondere in einer Steigerung der Fettaufnahme auswirkt. Darüber hinaus besitzt Galanin eine hyperglykämische Wirkung, bedingt durch die Hemmung der Glukose gesteuerten Insulinfreisetzung (NILSSON et al., 1989). Ferner scheint Galanin als physiologischer Antagonist der Substanz P zu wirken, da es die Schmerzempfindung vermindert (KURAISHI et al., 1991). Steroide, Nervenwachstumsfaktoren (*nerve growth factor*, NGF) und Nervenschäden haben Einfluss auf die Genexpression von Galanin (DEGERMAN et al., 2002; CORNESS et al., 1998; HWANG et al., 2004).

### 2.3.6 Galanin-Rezeptoren

Galanin vermittelt sowohl im ZNS als auch in peripheren Geweben seine Wirkung durch die Bindung an spezifische Rezeptoren. Zahlreiche pharmakologische Untersuchungen mit Galanin-Analoga, Rezeptor Agonisten und Antagonisten ließen auf mehrere Rezeptor-Subtypen schließen. Mittlerweile sind drei Rezeptor-Subtypen für Galanin kloniert, welche allesamt G Protein-gekoppelt sind (HABERT-ORTOLI et al., 1994; WANG et al., 1997 a, b; IISMAA und SHINE, 1999; BRANCHEK et al., 2000).



### 2.3.6.1 Galanin-Rezeptor 1 (GalR1)

Der erste Galanin Rezeptor-Subtyp wurde aus humanen Tumorzellen (*Bowes melanoma cell line*) isoliert (HABERT-ORTOLI et al., 1994). Der humane GalR1 enthält 349 AS und besitzt sieben hydrophobe transmembrane Domänen. Der GalR1 der Ratte ist 346 AS lang und zu 92% homolog zum humanen GalR1 (BRANCHEK et al., 2000). PARKER et al. (1995) wiesen mittels Northern Blot-Analyse GalR1 mRNA in Gehirn und Rückenmark der Ratte nach. *In situ*-Hybridisierung konnte zeigen, dass die Verteilung der GalR1 mRNA im Gehirn mit der Galanin-Expression und nachgewiesenen <sup>125</sup>I-Galanin-Bindungsstellen übereinstimmt: GalR1 mRNA tritt in Hypothalamus (SON, PVN), Amygdala, ventralem Hippocampus, Thalamus, Hirnstamm und Rückenmark auf (GUSTAFSON et al., 1996). Die Genexpression des GalR1 unterliegt verschiedenen physiologischen Stimuli. Hypothalamische GalR1 mRNA ist im weiblichen Gehirn in größerer Menge vorhanden und unterliegt dem Östrus-Zyklus (FAURE-VIRELIZIER et al., 1998). Laktation führt zu einer Verminderung der GalR1-Genexpression (LANDRY et al., 1998), während *salt-loading* zu einem Anstieg derselben führt (BURAZIN et al., 2001). GalR1 bewirkt eine Membranhypervolarisation durch Öffnung der K<sup>+</sup>-Kanäle, reduziert die Konzentration der Adenylat-Cyclase und stimuliert die MAP-Kinase-Aktivität (HABERT-ORTOLI et al., 1994; SMITH et al., 1997).

### 2.3.6.2 Galanin-Rezeptor 2 (GalR2)

Der zweite Galanin Rezeptor-Subtyp wurde zuerst in der Ratte gefunden. Seine Homologie zum GalR1 der Ratte beträgt nur 40% (Habert-Ortoli et al., 1994; PARKER et al., 1995). GalR2 ist im Gegensatz zu GalR1 nicht nur im Gehirn (Hypothalamus, Hippocampus, Amygdala und *pyriform cortex*), sondern auch in peripheren Geweben (Vas deferens, Prostata, Uterus, Ovar, Lunge, Magen, Darm und Pankreas-Zellen) der Ratte nachzuweisen (STEN SHI et al., 1997; SMITH et al., 1997; Howard et al., 1997). Zudem konnte GalR2 mRNA, aber keine GalR1 mRNA, mittels RT-PCR in der Adenohypophyse der Ratte nachgewiesen werden. GalR2 stimuliert die MAP-Kinase, die Phospholipase C, wodurch nach intrazellulärer Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung und erhöhtem Diacylglycerin wiederum die Proteinkinase C aktiviert wird, und inhibiert die Akkumulation von cAMP. Die weitläufige Verteilung der GalR2 mRNA (STEN SHI et al., 1997; SMITH et al., 1997; HOWARD et al., 1997) legt eine Beteiligung an zahlreichen physiologischen Funktionen nahe: Prolactin-Ausschüttung, GH Ausschüttung, Futteraufnahme, Emotions- und Gedächtnissteuerung, Schmerzempfinden, Zellwachstum,

Regeneration des Nervengewebes, Funktion der Langerhans'schen Inseln, Stoffwechsel und Reproduktion.

### **2.3.6.3 Galanin-Rezeptor 3 (GalR3)**

Auch den dritten Galanin Rezeptor fand man zuerst in der Ratte, wo er aus 320 AS besteht und eine Homologie von 36% zu GalR1 und 55% zu GalR2 aufweist (SMITH et al., 1998; WANG et al., 1997). Der GalR3 des Menschen setzt sich aus 368 AS zusammen und ist zu 90% dem GalR3 der Ratte homolog (KOLAKOWSKI et al., 1998). Über Northern Blot Analyse fand man GalR3 Transkripte zunächst nur im Herzen, der Milz und den Hoden der Ratte (WANG et al., 1997). SMITH et al. (1998) gelang es mit der sensitiven Methode, dem RNase Protection Assay, GalR3 mRNA im Hypothalamus und der Hypophyse, weiteren Regionen des ZNS (Bulbus olfactorius, cerebraler Cortex, Medulla oblongata, Caudate Putamen, Cerebellum und Rückenmark), sowie peripheren Geweben (Leber, Niere, Magen, Hoden, Nebennieren, Lunge, Milz und Pankreas jedoch nicht Herz, Uterus, und Vas deferens) nachzuweisen. GalR3 bewirkt wie GalR1 eine Membranhyperpolarisation durch Öffnung der  $K^+$ -Kanäle, was zu einer Inhibition der Exozytose führt. Das Vorkommen der GalR3 mRNA in unterschiedlichsten Geweben lässt eine Beteiligung an diversen physiologischen Prozessen (Emotionssteuerung, Futteraufnahme, Schmerzempfinden, Steuerung der Hormonabgabe aus der Hypophyse, Stoffwechsel). Aufgrund der hyperpolarisierenden Wirkung vergleichbar mit GalR1 und der Tatsache, dass GalR3 mRNA in der Pankreas detektiert werden konnte (ebenso GalR1), vermuten SMITH et al (1998) für GalR3 neben GalR1 ebenfalls eine Beteiligung am Insulin- und Glucose-Stoffwechsel.

Zu Galanin Rezeptoren beim Huhn (*Gallus gallus*) ist bisher nichts veröffentlicht.

### **2.3.7 Physiologische Stimulation des hypothalamischen Galanin-Systems**

### **2.3.8 Regulation des Galanin-Systems in magnozellulären Neuronen**

Die Regulation des Galanin-Transkripts und –Peptides in SON und PVN wurde unter verschiedenen physiologischen Stimuli untersucht: Hypophysektomie, osmotische Stimulierung mittels *salt loading* (MEISTER et al., 1990), Laktation (ERIKSSON et al., 1996; LANDRY et al., 1997). Ähnliche Studien belegen auch eine Regulation der Galanin Rezeptoren

GalR1 und GalR2 unter diesen physiologischen Bedingungen (LANDRY et al., 1998; BURAZIN et al., 2001). Während einer osmotischen Stimulation mittels *salt loading* steigt die Menge der GalR1 mRNA deutlich an, was durch Rehydrierung reversibel ist (LANDRY et al., 1998). Bei laktierenden Ratten hingegen kann eine geringe Abnahme des GalR1-Transkriptes in den magnozellulären Neuronen des SON nachgewiesen werden (LANDRY et al., 1998). Während dieser Stimuli werden Galanin- und GalR1-mRNA parallel reguliert. GUNDLACH et al. (2001) zeigten zudem im SON der Ratte einen gleichzeitigen Anstieg der GalR1 mRNA und des – Peptides nach vier Tagen *salt loading* (2% NaCl). Der Anstieg sowohl des Galanins als auch des GalR1 in magnozellulären Neuronen des SON während eines osmotischen Stimulus (*salt loading*) lässt für Galanin einen negativen Einfluss auf die Vasopressin-Sekretion vermuten (LANDRY et al., 1998).

Während der Laktation wird bei Ratten eine aus zwei Phasen bestehende Regulierung der Galanin mRNA beobachtet. In der ersten Phase (Tag3-7 der Laktation) ist die Menge nachweisbarer mRNA deutlich vermindert, in der zweiten Phase (nach Tag 14) kehrt die Transkriptmenge zu basalen Levels zurück, während sich die Mengenverhältnisse der Oxytocin mRNA in gegensätzlicher Richtung verändern (ERIKSSON et al., 1996; LANDRY et al., 1997). Die Galanin-Genexpression wird in magnozellulären Neuronen positiv über Östrogene reguliert. Die Verminderung des Galanin-Transkripts während der Laktation könnte somit von der gleichzeitig verminderten Östrogen-Konzentration abhängig sein (ERIKSSON et al., 1996; LANDRY et al., 1997). Ein möglicher inhibitorischer Effekt des Galanins auf die Expression von Neurohormonen kann über eine Abregulation sowohl der Galanin Produktion als auch der somatodendritischen Expression des GalR1-Rezeptors vermindert werden (ERIKSSON et al., 1996; LANDRY et al., 1997).

BURAZIN et al. (2001) konnten im PVN keine Veränderung für die GalR2 Expression nach osmotischem Stimulus (*salt loading*) nachweisen (weder im parvozellulären noch im magnozellulären Teil des PVN).

### **2.3.9 Elektrophysiologische Effekte auf supraoptische Neurone**

PAPAS et al. (1997) haben die Funktion des Galanin als Neuromodulator magnozellulärer neurosekretorischer Zellen im SON hypothalamischer Explantate untersucht. Galanin (1-29) und das N-terminale Fragment Galanin (1-16) bewirken über die Interaktion mit postsynaptischen Rezeptoren eine dosis-abhängige, reversible Membran-Hyperpolarisation. Galanin unterdrückt damit die Feuerungsaktivität sowohl kontinuierlich als auch phasenweise feuernder Neurone. Die beschriebene Wirkung des Galanin auf die Mehrheit der untersuchten

Neurone lässt vermuten, dass sowohl oxytocin- als auch vasopressinhaltige Neurone über endogen ausgeschüttetes Galanin reguliert werden könnten (PAPAS et al., 1997). Demnach könnte der Effekt zentral verabreichten Galanins auf die Oxytocin- (BJÖRKSTRAND et al., 1993) und Vasopressin-Ausschüttung (KONDO et al., 1993) aus der direkten Inhibierung der Aktionspotential-Freisetzung aus den Somata magnozellularer Neurone bestehen. Magnozelluläre Neurone selbst exprimieren Galanin und können physiologisch relevante Konzentrationen an Galanin über Soma und Dendriten ausschütten, um in einem inhibitorischen Feedback-Mechanismus die Freisetzung von Oxytocin und Vasopressin zu regulieren.

### 3 Fragestellung

Die vorangegangene Darstellung bisher veröffentlichter Daten zeigt, dass Galanin im Hypothalamus des Säugers sowohl mit Vasopressin als auch mit Oxytocin koexprimiert wird und seine Expression sich während reproduktiver und osmotischer Stimulation verändert. Auch beim Vogel konnte bereits eine Kolokalisation von Galanin und Vasotocin im Hypothalamus dokumentiert werden. Die Untersuchungen am Huhn beschränken sich bei der Henne jedoch bisher auf einen reproduktiven Stimulus, die Oviposition. Im Gegensatz zum Säuger, wurde beim Huhn bisher kein Subtyp der drei Galanin-Rezeptoren nachgewiesen. Hingegen wurde bei der Wachtel ein zusätzliches Galanin-Produkt mit einem aus 22 Aminosäuren bestehenden Insert gefunden, welches bei Säugern nicht vorkommt.

Daraus ergeben sich folgende Fragestellungen:

- a) Wie wirkt sich eine osmotische Stimulation auf den Peptidgehalt der beiden Neuropeptide Vasotocin und Galanin sowie ihre Kolokalisation im SON des Huhns aus? Zu betrachten sind beide Geschlechter.
- b) Ändert sich die hypothalamische AVT- und Galanin-Genexpression im Hypothalamus des Huhns durch osmotische Stimulation?
- c) Kann eine Genexpression der Galanin-Rezeptor Subtypen 1 und 2 im Hypothalamus adulter Hennen und Hähne nachgewiesen werden? – Wenn ja, verändert sich deren Expression nach physiologischer Stimulation durch Wasserentzug (Dehydrierung)?
- d) Existiert auch beim Huhn ein zusätzliches Galanin-Produkt, das dem der Wachtel ähnelt? – Wenn ja, in welchen Geweben wird dieses zusätzliche Produkt exprimiert und hat osmotische Stimulation einen Einfluss auf dessen Expression?

Ziel dieser Arbeit ist es, die Expression von Vasotocin und Galanin, sowie der Galanin-Rezeptor Subtypen 1 und 2 nach physiologischer Stimulation im Hühnergehirn nachzuweisen. Der osmotische Stimulus wird über eine Dehydratation der Tiere von mindestens 48 Stunden erreicht. Die Expression der beiden Hormone soll zum einen auf Peptidebene, zum anderen auf Transkriptebene dargestellt werden. Zur Darstellung der Kolokalisation zweier Peptide in einem Gehirnschnitt wird die Fluoreszenz-Immunhistochemie als Nachweismethode und die Konfokale-Laser-Scanning-Mikroskopie als quantitatives Auswertungsverfahren eingesetzt. Zum Nachweis der Transkripte soll zusätzlich zur vorhandenen AVT-Sonde eine Galanin-Sonde kloniert und durch Northern Blot-Analyse quantifiziert werden.

Ebenfalls auf mRNA-Ebene soll mittels *realtime* PCR eine eventuelle Regulation des AVT, des Galanin und der Galanin-Rezeptor Subtypen 1 und 2 quantifiziert werden. Neben den Galanin-Rezeptor Subtypen 1 und 2 soll mit Hilfe der PCR und der anschließenden Gelelektrophorese ein zusätzliches Galanin-Produkt in unterschiedlichen Geweben nachgewiesen werden.

Die Kontrolle der osmotischen Stimulation soll durch Elektrolyt-Bestimmung mittels Blutgasanalyse und Osmolalitätsmessung am Dampfdruckosmometer im Blutplasma erfolgen. Die Aktivierung des AVT-Systems aufgrund Dehydratation soll zudem mittels RIA (Bestimmung der AVT-Konzentration im Blutplasma) nachgewiesen werden.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Geräte

Die verwendeten Geräte werden im Anhang aufgelistet.

#### 4.1.2 Chemikalien und Software

Die verwendeten Chemikalien, darunter auch Pufferlösungen und kommerzielle Kits, sowie die zu Auswertungen verwendete Software werden in der jeweiligen Methodenbeschreibung erwähnt bzw. im Anhang aufgelistet (Chemikalien).

#### 4.1.3 Verwendete Vektoren

Der pGEM-T Easy Vektor der Firma Promega besitzt eine MCS (multiple cloning site), die von einem T7- und einem SP6-Promotor flankiert wird. Zur Selektion in Prokaryonten dient das  $\beta$ -Lactamasegen (Ampicillin-Resistenz).

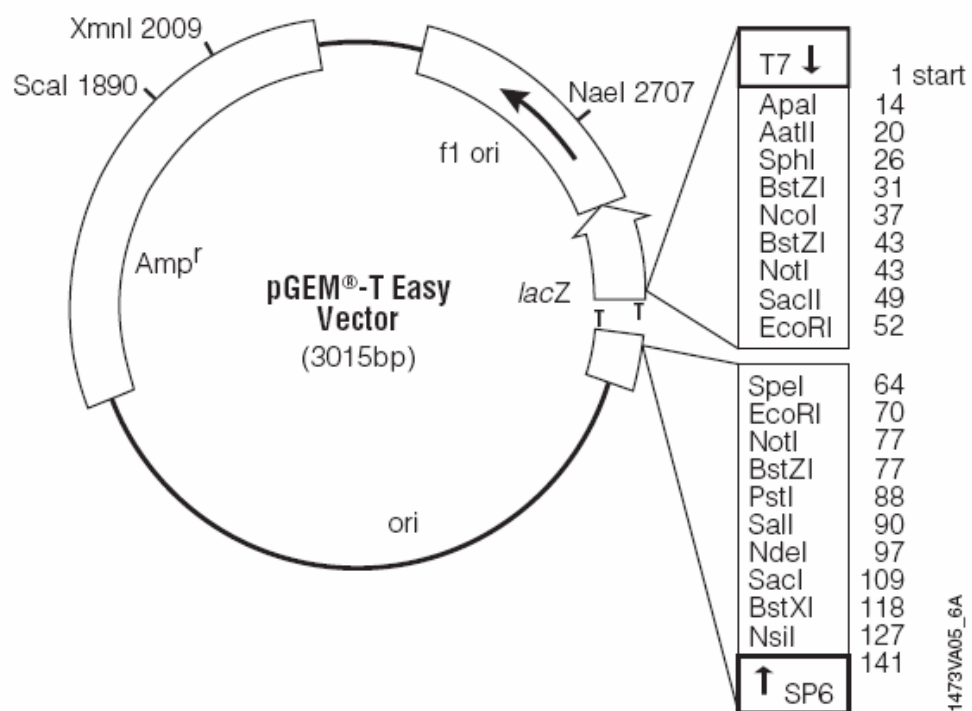


Abb. 4-1: pGEM-Teasy Vektor-Karte und Sequenz-Referenz-Punkte (Promega – Technical Manual)

Die MCS des Vektors *pBluescript* KS plus (*pBSKS+*) der Firma Stratagene wird von einem T7- und einem T3 Promotor flankiert. Bakterien, die diesen Vector tragen, können ebenfalls über ihre Ampicillin-Resistenz selektiert werden.

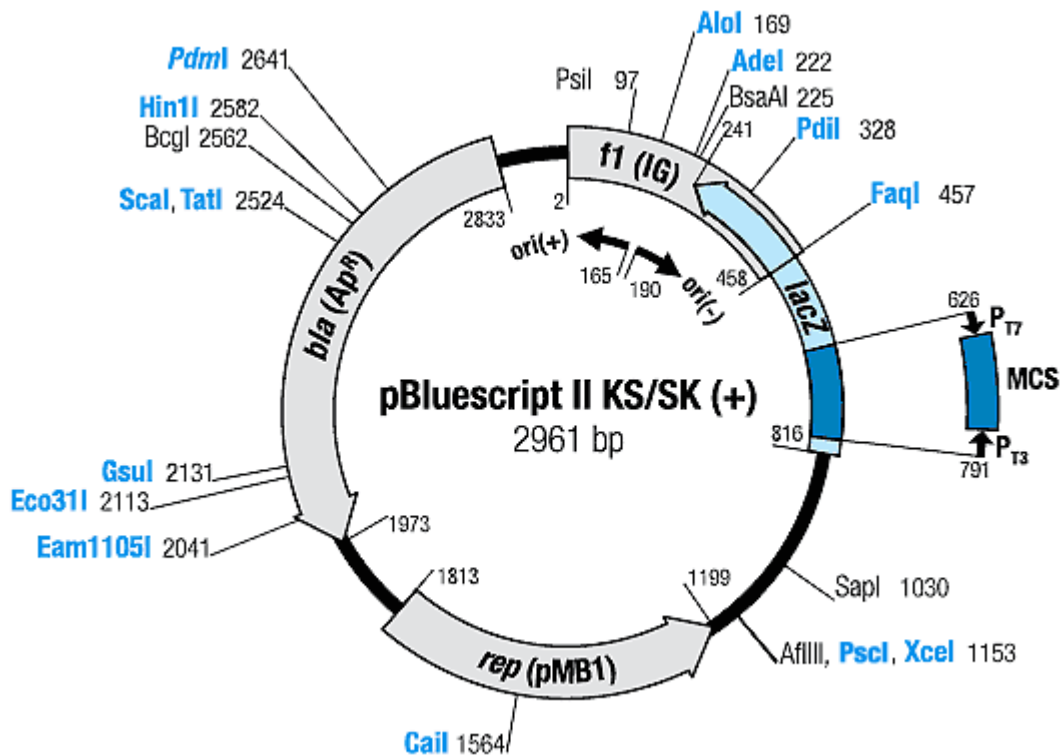


Abb. 4-2: *pBluescript* KS plus Vektor-Karte modifiziert nach Alting-MESS und SHORT (1989)

#### 4.1.4 Restriktionsenzyme

Es wurden folgende Restriktionsenzyme der Firma Roche (Mannheim) verwendet.

Enzym	Restriktionsstelle Spezifische	Aktivität [U/ $\mu$ l]	Reaktionspuffer (10 $\times$ )
ApaI	5' G G G C C <sup>^</sup> C ' 3	10	Puffer A
EcoRI	5' G <sup>^</sup> A A T T C ' 3	10	Puffer H
SacI	5' G A G C T <sup>^</sup> C ' 3	10	Puffer A
PstI	5' C T G C A <sup>^</sup> G ' 3	10	Puffer H
XhoI	5' C <sup>^</sup> T C G A G ' 3	40	Puffer H



## 4.1.5 Primer

### Sequenzierung

Primer	Sequenz	Länge [bp]
SP6	5' ATT TAG GTG ACA CTA TAG AAT AC ' 3	23
T7	5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC GA ' 3	23

### Galanin

Primer	Sequenz	Länge [bp]
ch-gal-1-forward	5' CAG CTC CCT GCG AGA CA ' 3	17
ch-gal-2-forward	5' CCA CTG GCT GAT GAA AAC ATT ' 3	21
ch-gal-3-forward	5' TGC GCA CAG TAA TCG AAT TT ' 3	20
ch-gal-4-forward	5' GAC ATT TCG GCG TCA ACC ' 3	18
ch-gal-5-forward	5' TAC TTG GGC CAC ATG CAG TA ' 3	20
ch-gal-6-forward	5' TGC AAG GGG GAG AGA AGA G ' 3	19
ch-gal-1-reverse	5' ACC AGC ACT GTT CAA AGT CCA ' 3	21
ch-gal-2-reverse	5' AAG TGC TCC CGC CTC TTT A ' 3	19
ch-gal-3-reverse	5' CCA AGC CAA AAT TTT ACA CCA ' 3	21

### Galanin-Rezeptoren

Primer	Sequenz	Länge [bp]
ch-galR1-3-forward	5' TGC TCA TCA CCT GCT GCT AC ' 3	20
ch-galR1-3-reverse	5' TCT GCC CAC ATT GTG ATG AT ' 3	20
ch-galR1-4-forward	5' TGA AAA ACC CAA GGG TTG AG ' 3	20
ch-galR2-a1F-forward	5' GAC AGG TAC TTG GCC ATA CGA T ' 3	21
ch-galR2-1R-reverse	5' GTA AGG GCT CGA GAA AAT GAT G ' 3	21
ch-galR2-3-forward	5' GGT GAA GAA CAC CAC CAA CC ' 3	20
ch-galR2-3-reverse	5' CTT GTG CAA GAG GCA GAT GA ' 3	20

**AVT**

<b>Primer</b>	<b>Sequenz</b>	<b>Länge [bp]</b>
<i>AVT-5-forward</i>	5' CTG GGT GAT ACA GCC TTG CGG CA' 3	23
<i>AVT-6-reverse</i>	5' GGC GTC CAT GGC ACA TGT GTC A ' 3	22

**Referenz-Gene**

<b>Primer</b>	<b>Sequenz</b>	<b>Länge [bp]</b>
<i>ch-βActin215-forward</i>	5' CAA CAC AGT GCT GTC TGG TGG T ' 3	22
<i>ch-βActin-uni- reverse</i>	5' GTC CGG ATT CAT CGT ACT CCT G ' 3	22
<i>ch-TBP-forward</i>	5' ACA CAC CAG CAG TTC AGC AG ' 3	20
<i>ch-TBP-reverse</i>	5' TTC CGG AAC CCC TTT AAA AT ' 3	20
<i>ch-RPII-forward</i>	5' GCC AGT GGT GTC GTA GAG TAC ' 3	21
<i>ch-RPII-reverse</i>	5' AAG GAA TAA TAG ATG CAC ACA ' 3	21
<i>ch-GAPDH-forward</i>	5' AGT CGG AGT CAA CGG ATT TG ' 3	20
<i>ch-GAPDH-reverse</i>	5' ACA GTG CCC TTG AAG TGT CC ' 3	20
<i>ch-18S-forward</i>	5' CTG CCC TAT CAA CTT TCG ' 3	18
<i>ch-18S-reverse</i>	5' GGC CTC GAA AGA GTC CTG TA ' 3	20

**4.1.6 Verwendeter Bakterienstamm**

Alle molekularbiologischen Arbeiten werden in dem *Escherichia coli* Stamm JM 107 durchgeführt. Die Herstellung von thermo-kompetenten Zellen erfolgte nach dem Protokoll von H. INOUE, H. NOJIMA und H. OKAYAMA (Gene 96, 1990, pp23-28).

### 4.1.7 Verwendetes Nährmedium

Das Wachstum der Bakterien erfolgte in Luria-Bertani (LB) Medium, bzw. auf LB-Agar-Platten.

	(w/v)
<u>LB-Medium</u> (pH 7,0):	1 % Pepton
	0,5 % Hefeextrakt
	1,0 % NaCl

	(w/v)
<u>LB-Agar:</u>	1,0 % Pepton
	0,5 % Hefeextrakt
	1,0 % NaCl
	1,5 % Agar

Alle verwendeten Plasmide enthalten das  $\beta$ -Lactamase Gen für die Ampicillinresistenz. Dadurch ist es möglich, über die Zugabe von 50  $\mu\text{g/ml}$  Ampicillin die Selektion transformierter Bakterien zu steuern. Die Medien werden bei 120°C für 30 Minuten autoklaviert. Nach Abkühlen der Medien auf 60°C kann das Antibiotikum zugesetzt werden.

### 4.1.8 Versuchstiere

Für die Versuche wurden adulte (Alter: 37-40 Wochen) Hennen und Hähne (*Gallus gallus*) der Hybrid-Linie Lohmann Selected White Leghorn (LSL) verwendet (Lohman Tierzucht GmbH, Cuxhaven). Die Tiere wurden in Einzelkäfigen gehalten und erhielten Standardfutter und Wasser *ad libitum*. Der Licht-/Dunkelzyklus war aufgeteilt in 12 h Licht und 12 h Dunkelphase (Beginn der Lichtphase um 6 Uhr, Ende um 18 Uhr, inklusive je einer halben Stunde Dämmerungsphase zu Beginn und zum Ende der Lichtphase). Für die Haltung der Tiere und die Durchführung der Tierversuche liegt die Genehmigung der regionalen Tierschutzkommission vor (AZ: 5096-4250213). Alle Untersuchungen wurden am Friedrich-Löffler Institut - Institut für Nutztiergenetik, Mariensee durchgeführt.

Zur osmotischen Stimulierung wurden adulte Hennen und Hähne für 48 Stunden ohne Wasser aber mit Futter *ad libitum* gesetzt. Die Stimulation startete um 15 Uhr am Nachmittag, d.h. 9 Stunden nach Beginn des Lichtzyklus. Zum Nachweis der AVT und Galanin Expression auf Transkriptebene wurden 4 Tiere pro Behandlungsgruppe beider Geschlechter ausgewertet (*realtime* PCR/Northern Blot-Analyse). Je 3 Tiere pro Behandlungsgruppe beider Geschlechter wurden mittels *double-labeling* Fluoreszenz-Immunhistochemie und

anschließender Laser-Raster-Mikroskopie untersucht. Zum Nachweis der beiden Galanin-Rezeptoren Subtyp 1 und 2, sowie der beiden Galanin-Transkriptvarianten wurden adulten, unbehandelten Tieren einzelne Gewebe entsprechend der Dehydrierungs-Versuche nachmittags (15 Uhr) entnommen. Hierbei stammen die Gewebe Hypothalamus, Hypophyse, Ovar (je drei Follikel aller drei Reifestadien), Muskel, Leber, Niere und Follikel (Tertiär-) vom weiblichen Tier, Hoden und Nebenhoden vom männlichen Tier.

## **4.2 Methoden**

### **4.2.1 Probenentnahme**

#### **Untersuchung der Expression auf Transkriptebene**

Zur Gewinnung der Gewebe werden die Tiere einzeln oder in Gruppen bis max. 6 Tiere gleichzeitig aus dem Stall in einen Schlachtraum gebracht und nacheinander mit einem Schlag auf den Kopf betäubt. Daraufhin wird die Halsschlagader durchtrennt und ein Teil des austretenden Blutes in mit Heparin bestückten Probengefäßen aufgefangen. Unmittelbar nach dem Entbluten werden die entsprechenden Gewebe so schnell wie möglich entnommen und auf Trockeneis gefroren. Zur Gewinnung des Hypothalamus wird das Gesamtgehirn zunächst auf eine in Trockeneis gekühlte Petrischale stabilisiert. Um ein Abplatzen des Gewebes zu vermeiden, muss der Hypothalamus jedoch im noch schnittfähigen, d.h. nicht durchgefrorenen Zustand herausgeschnitten werden. Zur Orientierung dienen dabei die folgenden Gehirnstrukturen: rostral der Tractus septomesencephalicus (TSM), dorsal die Commissura anterior (CA) und caudal der XI. Gehirnnerv. Anschließend werden die Proben in Parafilm eingewickelt, in Aluminiumfolie verpackt und bei -80 °C gelagert. Hennen werden zudem auf den Status ihres Ovipositionszyklus kontrolliert. Hierfür werden der Eileiter komplett entfernt und die Position des Eies bestimmt.

#### **Untersuchung der Expression auf Proteinebene**

Um die nachzuweisenden Proteine bereits im Gewebe zu stabilisieren und gleichzeitig Abbauprozesse derselben vorzubeugen, werden die Tiere perfundiert. Als erstes jedoch wird ihnen über die Flügelvene Blut abgenommen, welches versetzt mit Heparin in die anschließende Blutgasanalyse eingeht. Es folgt eine Narkotisierung der Tiere ebenfalls über die Flügelvene mit Narkoren (Merial, 85399 Hallbergmoos, 16% Pentobarbital-Natrium in PBS Lösung; 40-80 mg/kg Körpergewicht intravenös). Die Perfusion erfolgt beidseitig über

die Arteria carotis zunächst mit 150 ml 0,1M PBS (pH 7,4) versetzt mit 0,2% Heparin (Spühlen), gefolgt von 360 ml Zamboni-Fixativ (pH 7,4) bestehend aus 4% Paraformaldehyd und 15% Pikrinsäure in 0,1M PBS (Fixieren). Nach erfolgreicher Fixation *in vivo*, wird das Gehirn entnommen und für weitere 6-8 Stunden im Zamboni-Fixativ nachfixiert. Danach wird es in eine Zuckerlösung bestehend aus 25% Saccharose in 0,1M PBS (pH 7,4) überführt. Sobald im Gewebe der Austausch von Fixativ durch Zuckerlösung abgeschlossen ist, d.h. sobald das Gehirn in der Zuckerlösung abgesunken ist, wird es bis zur Weiterbearbeitung bei -80°C gelagert.

#### **4.2.2 Elektrolytbestimmung mittels Blutgasanalyse und Osmolalitätsbestimmung**

Die Bestimmung des Plasma-Natrium-Gehaltes erfolgt im Blut mittels Blutgasanalyse-System. Für die Untersuchung der Plasma-Osmolalität muss das Blut zunächst für 15 Minuten bei  $3000 \times g$  und 4°C zentrifugiert und das Plasma separiert werden. Anschließend wird die Osmolalität mit Hilfe eines Dampfdruck-Osmometers bestimmt. Ein weiteres Aliquot des so gewonnenen Hühnerplasmas geht zur Bestimmung der AVT-Plasmakonzentration in den im Folgenden beschriebenen Radioimmunoassay (RIA) ein.

#### **4.2.3 AVT-Radioimmunoassay**

Bei einem Radioimmunoassay (RIA) handelt es sich um eine immunochemische Reaktion zwischen Antikörper und Antigen (markiert bzw. unmarkiert), wobei radioaktiv markiertes Antigen mit dem entsprechenden unmarkierten Antigen um die vorhandenen Antikörperbindungsstellen konkurriert.

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete spezifische AVT-Antiserum, dessen Kreuzreaktivität mit Mesotocin (MT) und Angiotensin II (ANG II) unter 1% liegt (MÖHRING et al.1980; GRAY und SIMON 1983), wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Gray, Max-Planck-Institut für physiologische Forschung, Bad Nauheim, zur Verfügung gestellt.

Das AVT wurde vor der Mengenbestimmung aus dem Plasma nach der leicht modifizierten Methode von Husain et al. (1973) extrahiert (s. 4.2.3.1). Die Markierung des Antigens (Tracer) mit  $^{125}\text{J}$  erfolgte mittels Chloramin-T-Methode. Der Assay erfolgte nach der Methode von Gray und Simon (1983). Dabei wurden die Qualitätskriterien von Xu (1991) in Betracht gezogen.

### 4.2.3.1 Plasma-Extraktion

Aliquots der Hühnerplasma-Proben (200µl) werden mit 400µl eiskaltem Aceton (-20°C) versetzt und für zehn Minuten bei 4000 × g, 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues Röhrchen überführt und mit 800µl Pentrolbenzin vermennt. Das Gemisch wird für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erfolgter Phasentrennung wird die obere Phase (Benzin) abgesaugt und die Prozedur wiederholt. Nach erneutem Absaugen der benzinhaltigen Phase werden die Proben in einer Vakuumzentrifuge (SpeedVac, Savant, New York) für zwei Stunden getrocknet. Der AVT-Gehalt der getrockneten Plasmaproben kann nun mittels RIA bestimmt werden.

### 4.2.3.2 Durchführung des Assays

#### Verwendete Lösungen

Tris-Puffer 0,1M	
Tris	12,11g
Neomycinsulfat	2g
Albumin	3g
ddH <sub>2</sub> O	add 1000ml

#### Arbeitsanweisung

1. Inkubation des unmarkierten Peptides mit dem Antiserum für 48 Stunden bei 4°C.
2. Zugabe von 50µl des markierten Tracers [<sup>125</sup>J] (3000-4000 cpm) und weitere Inkubation für 24 Stunden bei 4°C.
3. Kontroll-Proben enthalten entweder nur Tracer (200µl of 0.1 M Tris-HCl, pH 7.4 mit 200µl AVT Antiserum) oder nur Puffer (400µl of 0.1 M Tris-HCl, pH 7.4). – Sie werden in jedem Assay verwendet.
4. Die Trennung des ungebundenen vom gebundenen Tracers erfolgt über eine Zugabe von 800µl EtOH absolut.
5. Proben mixen und anschließend für 20 Minuten bei 3.500×g und 4°C zentrifugieren.
6. Überstand absaugen.
7. Pellets im Gamma-Counter messen.
8. Die Ergebnisse werden mit Hilfe der Software RiaCalc (Pharmacia, LKB, Wallac) analysiert.

Das Detektionslimit des Assays liegt bei 1,5 pg/ml.

#### 4.2.4 Gesamt-RNA Extraktion

Die Isolierung der RNA aus tierischem Gewebe erfolgt nach der Methode von CHOMCZYNSKI und SACCHI (1987). Sie besteht im Wesentlichen aus drei Schritten. Im ersten Schritt muss der Zellverband des Gewebes aufgelöst werden (Homogenisieren) und die Zellen selbst müssen geöffnet werden (Lyse der Zellen mittels GTC). Gleichzeitig immobilisiert das verwendete GTC RNasen und verhindert somit den Abbau der zu isolierenden RNA. Schritt zwei dient der Trennung der RNA von sämtlichen anderen Zellbestandteilen (Phasentrennung durch Phenol und Chloroform). Hierbei wird RNA im Überstand der wässrigen Phase angereichert, während DNA und Protein sich in der organischen Phase absondern. In Schritt drei wird die RNA über eine Isopropanol-Fällung und anschließender Ethanol-Waschung von Salzen und Phenolresten befreit. Die so gereinigte RNA kann quantitativ und qualitativ bestimmt werden.

#### Verwendete Lösungen

<u>Guanidinthiocyanat-Lösung (GTC):</u>	
Guanidinthiocyanat	4 M
Na-Citrat, pH 7,0	25 mM
Na-Lauroylsarcosin (Sarcosyl)	0,5%
β-Mercaptoethanol	0,1 M
Haltbarkeit ohne β-Mercaptopethanol:	3 Monate
Haltbarkeit mit β-Mercaptopethanol:	1 Monat

#### Arbeitsanweisung

1. Homogenisieren der Gewebestücke (Hypothalamus) unter Zugabe von GTC und β-Mercaptoethanol (10ml/g Gewebe; Dauer 25–30’).
2. Zugabe: - Phenol (1ml/ml GTC)
  - Chloroform/Isoamylalkohol(49:1) (0,8ml/ml GTC)
  - 2M NaAcetat, pH 4,0/ml GTC (0,2ml/ml GTC)
 Mischen, 15’ auf Eis inkubieren
3. Zentrifugieren: 45’, 5990 U/min, 4°C, Bremse = 0 (\*)
4. Phasentrennung: 2ml des Überstandes (oberste Phase) abheben und in neues Gefäß überführen, Rest verwerfen
5. Fällung der RNA durch Zugabe von 1 Volumen eiskalten Isopropanol, mischen und über Nacht bei –20°C inkubieren
6. Zentrifugieren: 30’, 5500 U/min, 4°C, Bremse = 9 (\*)
7. RNA pelletiert, Überstand dekantieren

8. Lösen des Pellets durch Zugabe von; - GTC +  $\beta$ -Mercaptoethanol (1ml/g Gewebe)  
- 2M NaAcetat, pH 4,0 (0,1ml/g Gewebe)
9. Inkubation bei RT bis Pellets gelöst (bis zu 1,5h)
10. erneutes Fällern der RNA durch Zugabe von 1 Volumen eiskalten Isopropanol,  
mischen und mindestens 1 Stunde bei  $-20^{\circ}\text{C}$  inkubieren
11. Zentrifugieren: 30', 5500 U/min,  $4^{\circ}\text{C}$ , Bremse = 9 (\*)
12. RNA pelletiert, Überstand dekantieren
13. Waschen des Pellets durch Zugabe von 1ml 75%igem Ethanol
14. Zentrifugieren: 5', 10 000 $\times$ g,  $4^{\circ}\text{C}$  (\*\*)
15. Überstand dekantieren
16. Schritte 13 bis 15 wiederholen
17. erneutes Waschen des Pellets durch Zugabe von 1ml 75%igem Ethanol, diesmal 15'  
auf Eis inkubieren
18. Zentrifugieren: 5', 10 000 $\times$ g,  $4^{\circ}\text{C}$  (\*\*)
19. Überstand dekantieren
20. Pellets lufttrocknen lassen bei RT
21. Pellets lösen durch Zugabe von 200 $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O (RNasefrei)

(\*) Tischzentrifuge: Minifuge T, Heraeus

(\*\*) Tischzentrifuge: 3K30, Sigma

#### 4.2.5 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Zur photometrischen Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren wird die Extinktion der RNA- bzw. DNA-Lösung bei 260nm gemessen. Hierbei entspricht eine Absorption von eins (OD = 1) der Menge von 40 $\mu$ g/ml einzelsträngiger RNA bzw. 50 $\mu$ g/ml doppelsträngiger DNA.

Aussagen über die Reinheit der Nukleinsäurelösung können durch zusätzliche Messung der Extinktion bei 280nm (Verunreinigung durch Proteine) und 230nm (Verunreinigung durch Polisaccharide, Salze, Lösungsmittel) getroffen werden. Dazu werden Verhältnisse (Ratio) zwischen den Wellenlängen berechnet (260/280 und 260/230). Es wurden nur solche Proben weiterverarbeitet, deren Ratio-Werte zwischen 1,8 und 2,2 lagen. Nach einer Phenol-Chloroform-Extraktion gilt es zusätzlich den Messwert bei 270nm zu kontrollieren, da eine Verunreinigung mit Phenol bei dieser Wellenlänge messbar wäre.

Die Konzentrationsbestimmungen von Nukleinsäuren (RNA bzw. DNA) wurden am Photometer NanoDrop der Firma Peqlab durchgeführt.



## 4.2.6 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese wird in der Molekularbiologie eingesetzt, um Nukleinsäuren ihrer Größe nach aufzutrennen. Je nach gewünschter Trennungsschärfe wird Agarose in einer Konzentration von üblicherweise 0,3-2,5% eingesetzt.

Ein beispielsweise 1%iges Agarosegel in TAE-Puffer (Rezeptur s. 4.2.6.1) eignet sich zur Auftrennung doppelsträngiger DNA. Um einzelsträngige RNA der Größe nach aufzutrennen zu können, muss dem Ladepuffer und dem Gel zusätzlich Formamid zugesetzt werden, um die Linearisierung der Einzelstränge zu gewährleisten.

### 4.2.6.1 Agarosegel zur Auftrennung doppelsträngiger DNA

#### Verwendete Lösungen

##### Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE, 1×)

Tris Base	4,84g
Eisessig	1,142ml
0,5M EDTA	2ml
ad ddH <sub>2</sub> O	1l

##### 1%iges Agarosegel

Agarose	1g
ad TAE-Puffer	100ml
Ethidiumbromid	5µl

Ladepuffer (6×) Blue Juice der Firma Roche

#### Arbeitsanweisung

Die Agarose durch Aufkochen in TAE-Puffer lösen. Nach Abkühlen bis auf ca. 60°C Ethidiumbromid zugeben und vorsichtig Schwenken. Das noch flüssige Gemisch in einen Gelschlitten gießen, Kamm für Geltaschen platzieren und das Gel erkalten lassen. Das erhärtete Gel vom Kamm befreien und samt Gelschlitten in die Gelkammer setzen. Kammer mit Laufpuffer (TAE-Puffer) befüllen. Proben mit Ladepuffer (Endkonzentration 1×) versetzen und in die Geltaschen füllen. Start der Elektrophorese bei 60 Volt, Laufzeit 30-45 Minuten.

### 4.2.6.2 Formamid-Agarosegel zur Auftrennung einzelsträngiger RNA

#### Verwendete Lösungen

##### 10x MOPS-Puffer:

3-Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)	0,2 M
Na-Acetat	50 mM
EDTA	1 mM
NaOH ad pH 7,0	
Sterilfiltrieren	
MOPS-Puffer dunkel bei RT aufbewahren	

##### 1,2%iges Formamid-Agarosegel

Agarose	1,2g
ad MOPS-Puffer (1×)	100ml
37% Formamid	1,8ml
Ethidiumbromid	1µl

##### 5x denaturierender RNA-Ladepuffer:

(Qiagen, RNeasy Mini Handbook 2006, modifiziert)

Gesättigte Bromphenolblaulösung	226 µl
500 mM EDTA, pH 8,0	20 µl
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	15 µl
37% Formaldehyd (pH > 4)	180 µl
100% Glycerin	500 µl
Formamid (deionisiert)	771 µl
10x MOPS	1000 µl
Haltbarkeit: 3 Monate bei 4°C	

#### Arbeitsanweisung

Die Agarose durch Aufkochen in MOPS-Puffer lösen. Nach Abkühlen bis auf ca. 60°C Formamid und Ethidiumbromid zugeben und vorsichtig Schwenken. Prozedur des Gelgießens s. 2.2.6.1. Kammer mit Laufpuffer (MOPS-Puffer) befüllen. Proben 10 Minuten bei 65°C denaturieren, mit denaturierendem RNA-Ladepuffer (Endkonzentration 1×) versetzen und in die Geltaschen füllen. Start der Elektrophorese bei 60 Volt, Laufzeit 45-60 Minuten.

### 4.2.7 Northern Blotting

Die Northern Blot-Analyse dient der spezifischen Darstellung des Transkriptionslevels eines Gens im untersuchten Gewebe zu einem ausgesuchten Zeitpunkt. Um eine quantitative Bestimmung des Transkriptionslevels des zu untersuchenden Gens (Zielgen) zu gewährleisten, muss zusätzlich zum Zielgen ein sog. Referenzgen nachgewiesen werden.

Beim Referenzgen handelt es sich um ein so genanntes konstitutiv exprimiertes Gen (*house keeping gene*), dessen Transkriptionslevel in jeder Zelle des zu untersuchenden Gewebes unter verschiedenen Versuchsbedingungen unverändert bleibt.

Die Northern Blot-Analyse setzt sich aus folgenden Einzelstufen zusammen:

1. Isolierung der Gesamt RNA und Konzentrationsbestimmung (*bereits beschrieben unter 4.2.4 und 4.2.5*)
2. Auftrennung der RNA nach ihrer Größe in einem denaturierenden Agarosegel (*bereits beschrieben unter 2.2.6*)
3. Transfer und Fixierung der RNA auf eine Membran
4. Hybridisierung der immobilisierten RNA mit einer genspezifischen Sonde
5. Entfernung der ungebundenen bzw. unspezifisch gebundenen Sonde
6. Detektion der gebundenen Sonde und Analyse

#### 4.2.7.1 RNA-Transfer und Fixierung

Beim Northern Blotting wird die isolierte Gesamt-RNA aus einem Formamid-Agarosegel (FA-Gel) auf eine Membran übertragen, worauf sie fixiert werden kann (ALWINE et al. 1977). Unterschiedliche Membranen sind für die verschiedensten Zwecke entwickelt worden. Der Vorteil der hier verwendeten Nylonmembran liegt in der großen Stabilität, die eine mehrfache Hybridisierung möglich macht.

Für die Northern Blot Analyse wurden 50µg (AVT) bzw. 70µg gesamt RNA (Galanin) des Hypothalamus auf ein 1,2% Formamid-Agarosegel geladen. Nach elektrophoretischer Auftrennung erfolgte das Kapillar-Blotting zum Transfer auf eine Nylonmembran.

##### 4.2.7.1.1 Transfer (Kapillarblotting)

###### Verwendete Lösungen

Blotpuffer (20×SSC – Salz-Natrium-Citrat-Puffer)	
NaCl	87,5 g
Trinatriumcitrat	44,0 g
DEPC-H <sub>2</sub> O	add 500 ml
pH mit mit 1 M HCl auf 7,0 einstellen	

In einer Blotwanne wird auf eine erhöhte, feste Unterlage (Blottisch) eine Filterpapier-Brücke (Gel Blotting Paper Nr. 426890, Schleicher & Schüll, Dassel) gelegt. Es folgt das umgedrehte FA-Gel (Taschenöffnung zeigt nach unten), darauf eine positiv geladene Nylonmembran

(Hybond™-N+ , Amersham/Ge Healthcare, Buckinghamshire, UK), sowie zwei Lagen Filterpapier (Gel Blotting Paper Nr. 426890, Schleicher & Schüll, Dassel). Alle Schichten wurden vorher im Blotpuffer (20×SSC) angefeuchtet. Als oberste Schicht wird schließlich ein 10-15 cm hoher Stapel Papiertücher trocken aufgelegt. Die Blotwanne wird mit ausreichend Blotpuffer gefüllt, so dass die Seiten der Filterpapier-Brücke im Puffer liegen. Um sicherzustellen, dass Flüssigkeit nur durch das Gel hindurch in die trockenen Tücher gesogen werden kann, wird die Blotwanne rund um den Blotaufbau mit flüssigkeitsundurchlässiger Folie (Schutzfolie) abgedichtet. Der Blot wird anschließend mit ca. 1 kg Gewicht beschwert. Das Blotting findet über Nacht statt.

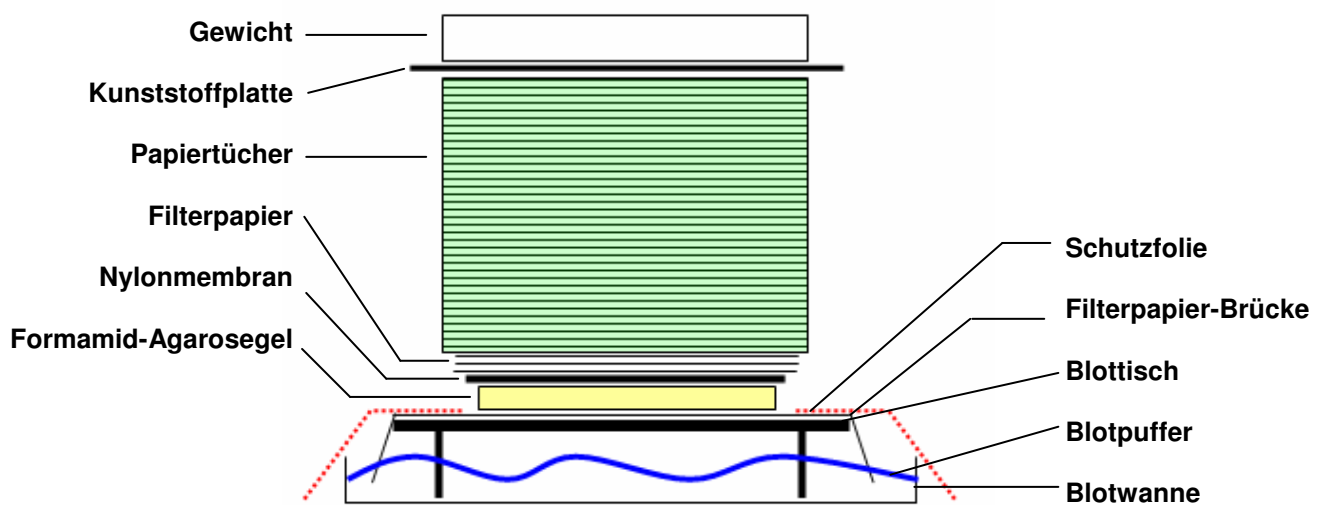


Abb. 4-3: Schematischer Aufbau eines einseitig gerichteten Kapillarblots.

#### 4.2.7.1.2 Fixierung

Nach erfolgreichem RNA-Transfer vom FA-Gel auf die Nylonmembran wird die Membran vom Gel abgenommen und 2 Mal im Gene Linker mit 150 mJ UV-Licht bestrahlt, um die negativ geladenen RNA-Fragmente kovalent an die positiv geladene Nylonmembran zu binden.

#### 4.2.7.2 Hybridisierung mit radioaktiv markierten Sonden

##### 4.2.7.2.1 Markierung genspezifischer Sonden mit $^{32}\text{P}$ mittels *random priming*

Zum spezifischen mRNA-Nachweis werden markierte cDNA-Sequenzen eingesetzt, die als komplementäre Gegenstränge mit der Zielsequenz hybridisieren können. Die Wahl des

Markermoleküls hängt hierbei zum einen von der Länge und zum andern von der gewählten Markierungsmethode der Sonde ab. Für die Markierung mittels *random priming* gilt die Faustregel: Sonden mit einer Länge von >250bp können mit Digoxigenin (DIG) bzw. Biotin markiert werden, kurze Sonden hingegen sollten mit radioaktiven Isotopen markiert werden.

Da zum Nachweis der AVT-mRNA, bedingt durch die hohe Homologie zu Mesotocin-mRNA, die Länge der eingesetzten Sonde auf 246bp beschränkt ist, wird in diesem Fall die Markierung der Sonde mit einem radioaktiven Isotop bevorzugt. Aufgrund der kurzen Expositionszeit und der hohen Sensitivität wurde für den Northern Blot das Isotop  $^{32}\text{P}$  ausgewählt. Das Plasmid mit der in dieser Arbeit verwendeten AVT-Sonde wurde von Prof. Richard Ivell und Ross Bathgate, Institut für Hormon- und Fortpflanzungsforschung der Universität Hamburg, zur Verfügung gestellt. Bei der Sonde für das Referenzgen 18S handelt es sich um eine kommerzielle Sonde (pTRI RNA 18S) der Firma Ambion (Applied Biosystems, Foster City, USA). Zum Nachweis der Galanin-mRNA wurde eine spezifische Sonde mit einer Länge von 608bp in der vorliegenden Arbeit kloniert. Der vergleichbaren Auswertung halber wurden auch diese beiden Sonden mit  $^{32}\text{P}$  markiert.

Bei der Methode des *Random Priming* (FEINBERG und VOGELSTEIN 1983) wird ein Hexamer-Gemisch, welches als Primer fungiert, mit der Sonden-DNA hybridisiert. Anschließend werden die angelagerten Hexamer-Primer durch das Klenow-Enzym entlang der DNA-Matrize verlängert. Ein Nukleotid (Cytosin) wird in radioaktiver Form zugegeben und markiert so den entstehenden Strang.

#### **Verwendete Lösungen/Kits**

- Amersham Megaprime<sup>TM</sup> DNA Labeling System RPN1604 (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK)
- Ambion pTRI RNA 18S (80 bp protected fragment) AM7339 (Applied Biosystems, Foster City, USA)
- Radioisotop  $^{32}\text{P}$  markiertes Cytosin ( $[\alpha^{32}\text{P}] \text{dCTP}$ ) der Firma Perkin Elmer (Massachusetts, USA)

#### **Verwendete Plasmide**

- zum Nachweis von AVT: pBSK+-AVT3' (zur Verfügung gestellt von Prof. Richard Ivell und Ross Bathgate, Institut für Hormon- und Fortpflanzungsforschung der Universität Hamburg)

- zum Nachweis von Galanin: pGEM-T<sub>easy</sub>-Gal43 (Klonierung erfolgte im Verlauf der vorliegenden Arbeit)

### Arbeitsanweisung

1. Im einfachen Ansatz von 50  $\mu\text{l}$  werden eingesetzt:

DNA (Plasmid)	25 ng
Primer-Gemisch	5 $\mu\text{l}$
DEPC-H <sub>2</sub> O	add 50 $\mu\text{l}$

2. Es folgen 5 Minuten Denaturierung im Wasserbad bei 100°C, anschließend wird das Gemisch auf Eis gekühlt.
3. Nun werden folgende Komponenten zugegeben:

Nukleotid-Gemisch (je 4 $\mu\text{l}$ / Nukleotid)	12 $\mu\text{l}$
Reaktionspuffer	5 $\mu\text{l}$
[ $\alpha^{32}\text{P}$ ] dCTP	5 $\mu\text{l}$
Klenow-Enzym	2 $\mu\text{l}$

4. Es folgt eine Inkubation für 30 Minuten im Wasserbad bei 37°C.
5. Währenddessen wird eine Sephadex G-50 Säule (Nick Columns, Pharmacia, Freiburg, DE) pro Sonde mit 3 ml TE-Puffer, pH 7,5 äquilibriert.
6. Nach Beendigung der Inkubation wird das Reaktionsgemisch abzentrifugiert und
7. im Anschluß mittig auf die Säule aufgetragen.
8. Zusätzlich wird als Laufmittel 400  $\mu\text{l}$  TE-Puffer, pH 7,5 zugeben.
9. Die erste Fraktion wird in einem Eppendorf-Gefäß aufgefangen und verworfen.
10. Es folgt eine erneute Zugabe von 450  $\mu\text{l}$  TE-Puffer, pH 7,5.
11. Die zweite Fraktion wird ebenfalls in einem Eppendorf-Gefäß aufgefangen.
12. Es folgt die Messung von 2  $\mu\text{l}$  des Eluats (zweite Fraktion) in 20 ml Scintillationsflüssigkeit im  $\beta$ -Counter (Wallac 1410 Liquidscintillationcounter, Pharmacia, Freiburg).

13. Nach erfolgreicher Markierung wird die Sonde für 5 Minuten im Wasserbad bei 100°C denaturiert.
14. Die denaturierte Sonde wird kurz auf Eis inkubiert und kann danach entweder sofort eingesetzt oder bei -20°C für maximal 3 Tage gelagert werden.

#### 4.2.7.2.2 Hybridisierung mit genspezifischen Sonden

Unter definierten Bedingungen lässt sich die Stabilität eines Doppelstrangs durch Berechnung der Schmelztemperatur ( $T_m$ ) bestimmen. Bei dieser Temperatur liegt die Hälfte der doppelsträngigen Moleküle in dissoziierter Form vor. Je stabiler ein Doppelstrang, desto höher ist seine Schmelztemperatur. Mit folgender Formel kann die Schmelztemperatur von Doppelsträngen mit einer Länge von  $\geq 250$ bp berechnet werden:

$$T_m = 81,5^\circ\text{C} + 0,41 \times (\%GC) + 16,6 \log [\text{Na}^+] - 500/n - 0,61 \times (\%\text{Formamid})$$

Hierbei ist:

%GC	prozentualer Gehalt der Basen Guanin und Cytosin
n	Länge des DNA-Doppelstrangs (Sonde) in bp;
[Na <sup>+</sup> ]	Konzentration monovalenter Kationen z.B. Natrium
(%Formamid)	Doppelstrang-destabilisierende Agenzien z.B. Formamid

Um optimale Hybridisierungsbedingungen zu schaffen, müssen folglich Formamid- und Salzkonzentration sowie Hybridisierungstemperatur aufeinander abgestimmt werden.

#### Verwendete Lösungen

<u>Hybridisierungspuffer</u>	
Formamid, entionisiert	50 ml
20 X SSC (RT)	25 ml
Natriumphosphat	2 ml
Heringsperma	250 µl
50 x Denhardt's	20 ml
20% SDS (RT)	2,75 ml
Lagerung im Kühlschrank bis 4 Wochen, bei -20°C bis 3 Monate. Achtung: Hybridisierungspuffer fällt bei Lagerung aus (SDS!). Vor Benutzung auf 37°C erwärmen (Inkubator/Wasserbad), dann löst es sich wieder.	

### Arbeitsschema

Die Membran wird zwei Stunden in einer verschließbaren Glasflasche im Hybridisierungssofen bei 42 °C mit Hybridisierungspuffer unter ständiger Bewegung gespült. Anschließend wird die genspezifische Sonde dem Hybridisierungspuffer zugegeben. Die Menge richtet sich hierbei zum einen nach der gemessenen spezifischen Aktivität, zum anderen nach der Stärke des erwarteten Signals. Die eingesetzte spezifische Aktivität beträgt für

AVT	3,5 x 10 <sup>7</sup> cpm,
Galanin	4 x 10 <sup>7</sup> cpm,
18S	1,5 x 10 <sup>7</sup> cpm.

Die Hybridisierung erfolgt nun unter ständiger Bewegung bei 42°C für 16 bis 20 Stunden.

### 4.2.7.3 Entfernung der ungebundenen bzw. unspezifisch gebundenen Sonden

Nach erfolgreicher Hybridisierung muss sowohl ungebundene, als auch unspezifisch gebundene Sonde durch stringentes Waschen von der Nylonmembran entfernt werden. Die Stringenz hängt von der Temperatur, der Ionenstärke und eventueller doppelstrangdestabilisierender Moleküle der Waschlösungen ab. Unter stringenten Bedingungen bleiben nur Doppelstränge mit nahezu perfekt komplementären Sequenzen gepaart.

### Verwendete Lösungen

<u>SSC – Salz-Natrium-Citrat-Puffer (Stocklsg. 20x)</u>			
NaCl			87,5 g
Trinatriumcitrat			44,0 g
DEPC-H <sub>2</sub> O	add		500 ml
pH mit mit 1 M HCl auf 7,0 einstellen			
<u>1xSSC mit 0,1% SDS</u>			
20xSSC			50 ml
SDS			10 ml
DEPC-H <sub>2</sub> O	add		1 l



### Arbeitsanweisung

1. Hybridisierungsflaschen aus dem Hybridisierungssofen holen, Hyb-Puffer (inkl. Sonde) in radioaktiven Abfall geben.
2. Waschen des Filters mit 60ml 1× SSC mit 0,1% SDS – Hybridisierungsflaschen wieder in den Hybridisierungssofen (42°C, 30’).
3. Hybridisierungsflaschen aus dem Ofen nehmen, Waschlösung entsorgen.
4. Erneut waschen mit 60ml 1× SSC mit 0,1% SDS - Hybridisierungssofen (42°C, 30’).
5. Hybridisierungsflaschen aus dem Ofen nehmen, Waschlösung entsorgen.
6. Letztes Mal waschen mit diesmal 60°C warmen 60ml 1× SSC mit 0,1% SDS – Hybridisierungssofen (60°C, 15’).
7. Hybridisierungsflaschen aus dem Ofen nehmen, Waschlösung entsorgen.
8. Filter aus den Flaschen nehmen, lufttrocknen.
9. Filter auf Screen (Phosphorschirm) auflegen, je nach gemessener Signalstärke (Handgerät) und je nach Erfahrung die einzelnen Sonden betreffend, den Screen Stunden, Tage oder Wochen ruhen lassen.

#### 4.2.7.4 Detektion der gebundenen Sonde und Analyse

Die Expositionszeit ist abhängig von der gemessenen Radioaktivität auf der Nylonmembran. Für das stärkere Signal der AVT-Sonde wurde eine Expositionszeit von 2 Tagen, für das deutlich schwächere Signal der Galanin-Sonde von 7 Tagen veranschlagt.

Das Prinzip des Phosphorschirms (Screens) beruht auf der Anregung von Elektronen durch die radioaktive Strahlung. Der Screen wird anschließend in einem Phosphor-Imager abgelesen. Hierbei kehren die Elektronen wieder auf ihr ursprüngliches Energieniveau zurück und strahlen währenddessen Energie ab. Diese wird vom Gerät gelesen und am Bildschirm optisch in Form von schwarzen Punkten dargestellt. Mit Hilfe der QuantiTec-Software (BioRad, München) können die gemessenen Signale ausgewertet werden.

Um eine quantitative Auswertung zu ermöglichen muss zusätzlich zum Zielgen auch ein Referenzgen nachgewiesen werden. Das Referenzgen dient als Korrekturfaktor, um eventuelle Unterschiede im Auftragen der Proben auf das Gel bzw. im Transfer der RNA auf die Membran, auszugleichen. Hierfür wird die bereits mit der Zielgen-spezifischen Sonde hybridisierte und ausgewertete Nylonmembran von eben jener Sonde befreit (gestrippt). Dies geschieht durch ein fünfminütiges Abkochen der Membran bei 95°C in Stripp-Lösung (10

mM EDTA, pH 7,5). Anschließend wird die Membran mit der ebenfalls radioaktiv Markierten 18S-Sonde hybridisiert (s. 4.2.7.2 und 4.2.7.3). Die Expositionsdauer für das sehr starke Signal der 18S-Sonde wurde auf 2 Stunden festgesetzt.

Nach Auswertung des radioaktiven Signals für 18S im Phosphor-Imager – wie oben beschrieben – können nun die Ergebnisse der einzelnen Versuchsgruppen zueinander in Beziehung gesetzt werden.

#### 4.2.8 cDNA-Synthese (reverse Transkription)

Mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase kann aus RNA die dazu komplementäre cDNA hergestellt werden. Diese spezifische, RNA-abhängige DNA-Polymerase benötigt wie andere Polymerasen Primer zur Synthese, welche an die RNA binden. Als Primer bezeichnet man kurze, komplementäre DNA-Abschnitte. Zur cDNA-Synthese werden Primer eingesetzt, die entweder aus 10-15 Thyminbasen (Oligo-dT-Primer), oder aus sechs zufällig zusammengesetzten Nukleinbasen bestehen (*random* Hexamer-Primer). Oligo-dT-Primer binden am Poly-A-Schwanz der eukaryotischen mRNA, während *random* Hexamer-Primer sequenzspezifisch und somit nicht nur mRNA sondern auch ribosomale RNA binden.

Zur cDNA-Synthese wird das *QuantiTect Reverse Transcription Kit* der Firma Qiagen verwendet. Hierbei wird ein Primergemisch aus Oligo-dT- und *random* Hexamer-Primern eingesetzt. Gleichzeitig verspricht die Verwendung des speziellen genomic DNA Wipeout Buffers eine Dekontamination der verwendeten RNA von genomischer DNA. Somit entfällt ein aufwendiger DNase-Verdau und anschließende Aufreinigung der RNA. Das Protokoll wird ausschließlich in den Volumenangaben (s.unten) verändert, die Protokolldurchführung bleibt gleich (s. *QuantiTect Reverse Transcription Kit*-Handbuch).

#### Verwendete Volumina

Komponenten der genomischen DNA Eliminations-Reaktion

Komponenten	Volumen/ Reaktion	Endkonzentration
gDNA Wipeout Buffer, 7 ×	1µl	1×
Template RNA	500ng	
Rnase-freies ddH <sub>2</sub> O	variabel	
Gesamtvolumen	7µl	

## Komponenten der reversen Transkriptions-Reaktion

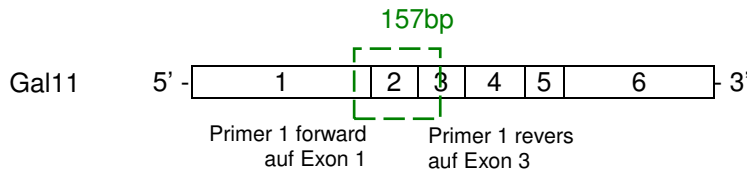
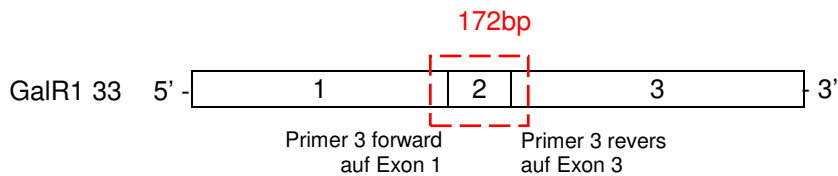
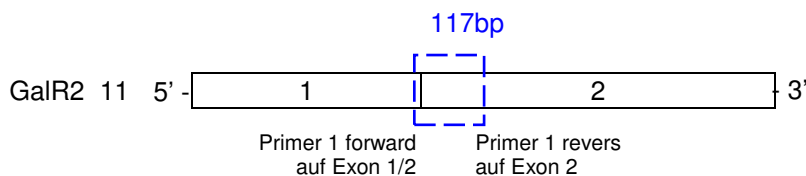
Komponenten	Volumen/ Reaktion	Endkonzentration
Quantiscript Reverse Transcriptase	0,5µl	1×
Quantiscript RT Buffer, 5×	2µl	1×
RT Primer Mix	variabel	
MasterMix A	7µl	
Gesamtvolumen	20µl	

**4.2.9 Primer-Konstruktion**

Primer flankieren bei der PCR die zu amplifizierende DNA-Region und stellen die von der DNA-Polymerase für die DNA-Synthese in 5'-3'-Richtung benötigten freien 3'-OH-Gruppen zur Verfügung. Die Spezifität der Primer wird von deren Länge, Schmelztemperatur ( $T_m$ , die Schmelztemperatur für beide Primer sollte ungefähr gleich sein), Selbst- und 3'-Komplementarität, sowie GC- und AT-Gehalt bestimmt. Die Näherungs-Formel lautet:

$$T_m \approx \text{Anzahl (G + C)} \cdot 4^\circ\text{C} + \text{Anzahl (A+T)} \cdot 2^\circ\text{C}$$

Zum Nachweis spezifischer PCR-Produkte werden Primer für Galanin, Galanin-Rezeptor Typ 1 (GalR1) und Typ (GalR2) anhand genomischer Sequenzen, bereitgestellt über die Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI; Acc.-Nr. siehe Anhang), konstruiert. Um sicherzustellen, dass es sich bei den amplifizierten Produkten um mRNA-Äquivalente handelt, werden die Primer auf unterschiedlichen Exons (teilweise Intron-übergreifend) platziert. Die Sequenzen der in der vorliegenden Arbeit konstruierten Primer unter Punkt 4.1.5 aufgeführt. Im Folgenden ist die Lage der einzelnen Primer bzw. des zu amplifizierenden PCR-Produkts schematisch dargestellt.

**Galanin****Galanin Rezeptor Typ 1****Galanin Rezeptor Typ 2**

**Abb. 4-4:** Schematische Darstellung der Lage der verwendeten Primer bzw. der klonierten PCR-Fragmente für Galanin, GalR1 und GalR2 des Huhns (*Gallus gallus*).

Zum Nachweis der AVT-mRNA werden bereits getestete Primer verwendet (KÖHLER 2000), sie liegen ebenfalls auf unterschiedlichen Exons im Bereich des Neurophysin II.

Während die optimale Fragment-Länge für die *realtime* PCR im Light Cycler<sup>®</sup> zwischen 100 und 250bp liegt, sollte eine im Northern Blot verwendete cDNA-Sonde möglichst lang sein (>250bp). Zur Klonierung einer Galanin-cDNA-Sonde werden Primer konstruiert, die ein 608bp langes cDNA-Fragment flankieren. Die schematische Darstellung der Lage der Primer bzw. der klonierten cDNA-Sonde erfolgt im Ergebnis-Teil der vorliegenden Arbeit (s. Kap. 5 Ergebnisse, Punkt 5.3.1.2). Dort werden ebenfalls Primerpaare/PCR-Fragmente dargestellt, die zum Nachweis einer zweiten Spleißvariante des Galanins konstruiert werden (s. Kap. 5 Ergebnisse, Punkt 5.3.3).

#### 4.2.10 Polymerasen-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR wird angewendet, um definierte Abschnitte eines DNA-Strangs zu vervielfältigen. Bei der eingesetzten DNA kann es sich grundsätzlich um genomische DNA, oder um in cDNA umgeschriebene RNA handeln. Der PCR-Prozess besteht aus einer Anzahl von 25 bis

40 Zyklen, die in einem Thermocycler durchgeführt werden. Jeder Zyklus besteht aus drei Schritten:

1. Trennung der DNA-Doppelstränge (Denaturierung)
2. Anlagerung der Oligomerprimer (Annealing)
3. DNA- Synthese (Elongation)

In der vorliegenden Arbeit werden zwei unterschiedliche PCR-Varianten verwendet, die im Folgenden kurz dargestellt werden: die Gradienten-PCR und die *realtime* PCR.

#### 4.2.10.1 Gradienten-PCR

Mit Hilfe eines Gradienten-Thermocyclers werden für Primer die optimalen Bedingungen zur Amplifikation eines DNA-Bereiches analysiert. Dabei können in einem PCR-Lauf verschiedene Annealing-Temperaturen gleichzeitig getestet werden. Über zwölf in einer Reihe liegende Probenplätze kann ein Gradient mit definierbarer Niedrigst- (Platz 1) und Höchsttemperatur (Platz 12) gewählt werden. Aufgrund seines technischen Aufbaus (vier Heizelemente für zwölf Probenplätze) kann kein linearer Anstieg der Temperatur erreicht werden, stattdessen verläuft der Temperaturanstieg sigmoid (s. Abb 4-5).

Die Spezifität der Primer wurde mittels Gradienten-PCR und Agarosegelelektrophorese bestimmt: Nur Primerpaare, die eine Einzelbande produzierten und deren PCR-Fragment die zu erwartende Länge (bp) hatte, wurden als spezifisch betrachtet. Zur quantitativen Analyse wurden Primerpaare für folgende Referenzgene konstruiert:  $\beta$ -Actin, GAPDH, Tata-Box binding Protein (TBP), RNA-Polymerase II (RPII) und 18S rRNA.

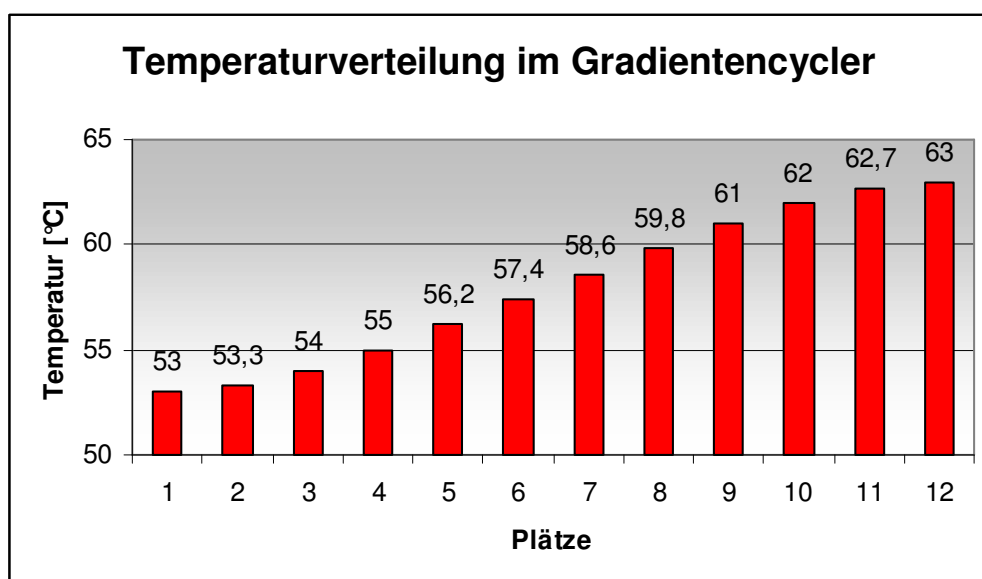


Abb. 4-5: Temperaturverteilung im Gradientencycler, als Beispiel ein gewählter Gradient von 53 bis 63°C.

## Verwendete Lösungen

Taq PCR Core-Kit (Nr. 201223) der Firma Qiagen (Hilden)

## Arbeitsanweisung

Um einer Verunreinigung der Reaktionsgemische vorzubeugen, werden folgende Arbeitsschritte in einer mittels UV-Licht sterilisierten PCR-Arbeitsstation (CleneCab) durchgeführt. Die Proben (cDNA) werden laut Anweisungen der Firma Qiagen mit den Reagenzien des PCR Core-Kits versetzt (tabellarische Auflistung folgend). Die Endkonzentration der Primer im Reaktionsgemisch beträgt 1 $\mu$ M. Um mögliche Pipettierungenauigkeiten auszugleichen wird von allen, nicht variablen Reagenzien vorab ein Mastermix hergestellt (10% größeres Volumen als durch Probenzahl vorgegeben), der später auf die einzelnen Proben aufgeteilt wird.

Zusammensetzung des Reaktionsgemisches (Einzelprobe):

Reagenzien	Volumen [μl]
cDNA	0,5
10x Puffer	2,0
5x Q-Solution	4,0
dNTP-Mix	0,4
Primer <i>forward</i>	1,0
Primer <i>reverse</i>	1,0
H <sub>2</sub> O	11,0
Polymerase	0,1

Folgendes Standard-PCR-Programm wird durchgeführt:

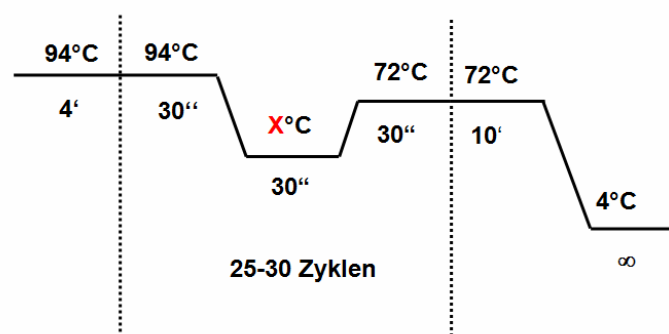


Abb. 4-6: PCR-Programm verwendet im Gradienten-Cycler.

Bei der Annealing-Temperatur ( $X^{\circ}\text{C}$ ) handelt es sich um eine variable Größe. Der gewählte Gradient für alle nachzuweisenden Produkte, deren Primer-Schmelztemperaturen sämtlich zwischen  $59$  und  $61^{\circ}\text{C}$  liegen, erstreckt sich von  $53$  bis  $63^{\circ}\text{C}$ .

Nach Ablauf der PCR werden die Proben mittels Agarosegelelektrophorese analysiert (s. 4.2.6.1).

#### 4.2.10.2 realtime-PCR

Die *realtime*-PCR beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR, bietet aber zusätzliche die Möglichkeit einer Quantifizierung. Die Quantifizierung wird mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen am Ende bzw. während eines PCR-Zyklus durchgeführt. Dafür werden interkalierende Fluoreszenzfarbstoffe (z.B. Ethidiumbromid oder SYBR® Green I) verwendet. Sie binden an die doppelsträngige DNA, wodurch die Fluoreszenz dieser Farbstoffe ansteigt. Die Zunahme der Target-DNA (durch spezifische Primer hergestelltes PCR-Produkt) korreliert daher mit der Zunahme der Fluoreszenz von Zyklus zu Zyklus.

Zur Quantifizierung der Target-DNA nach  $n$  Zyklen wird gleichzeitig ein Referenz-Gen amplifiziert, um Variationen in der Ausgangsmenge der eingesetzten RNA auszugleichen (Normalisierung). Das Referenz-Gen sollte stabil dedektierbar und innerhalb des Zellzyklus, der Zelltypen bzw. der zu untersuchenden Versuchsbedingungen unreguliert sein. Klassische Referenz-Gene sind z.B.  $\beta$ -Actin, 18S RNA, RNA-Polymerase II, TATA Box binding Protein (TBP). Zur Quantifizierung wird zwischen Referenz-Gen und Target-Gen ein relativer Mengen-Vergleich durchgeführt (relative Quantifizierung).

Die Amplifikation einer PCR kann in drei Phasen unterteilt werden.

1. Phase mit schwachem Anstieg
2. exponentielle Phase
3. Plateau-Phase

In der ersten Phase ist die Templatemenge begrenzt und das Verhältnis Template zu Primer und Polymerase suboptimal. Es erfolgt nur ein schwacher Anstieg der Template-DNA. In der dritten Phase, der Plateau-Phase, dagegen ist die Menge hergestellten Templates so hoch, dass es zur Hemmung der Amplifikation kommt, indem die zahlreichen DNA-Fragmente häufiger miteinander hybridisieren. Zudem sind die freien Nukleotide langsam verbraucht. Ein exponentieller und somit quantifizierbarer Anstieg der Template-Menge findet nur in der

zweiten Phase statt. Zur Quantifizierung wird ein definierbarer Punkt am Anfang der exponentiellen Phase gewählt, der *crossing point* (CP). Er beschreibt den Zyklus, an dem die gemessene Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt. Die unterschiedliche Expression wird als n-fache Expression mit Hilfe des delta-delta-CP-Wertes angegeben. Zunächst werden die CP-Werte der Referenz- und Zielgene voneinander abgezogen (delta-CP). Danach werden die beiden delta-CP-Werte der einzelnen Gruppen (normohydriert/dehydriert) voneinander abgezogen (delta-delta-CP-Wert) und schließlich in die Gleichung n-fache Expression (Gruppe A zu Gruppe B) =  $2^{-\text{delta-delta-CP}}$  eingesetzt.

In der vorliegenden Arbeit wird die *realtime* PCR

- a) zur Quantifizierung der Genregulation im Vergleich zweier Behandlungsgruppen,
- b) zur Quantifizierung des mRNA-Gehalt eines bestimmten Gens in unterschiedlichen Geweben eingesetzt.

Zur Quantifizierung des mRNA-Gehaltes wird dieser über die Zyklenzahl definiert, nach deren Erreichen die Zunahme an mRNA exponentiell ansteigt (*crossing point*). Die PCR endete bei Zyklus 45, der in diesem Fall den geringsten detektierbaren mRNA-Gehalt beschreibt. Je kleiner die Zyklenzahl, desto größer die Ausgangsmenge an vorhandener mRNA. Ist bis Zyklus 45 kein exponentieller Anstieg der nachzuweisenden mRNA erfolgt, gilt diese als nicht vorhanden.

### **Verwendete Lösungen**

QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Nr. 204245) der Firma Qiagen (Hilden)

### **Zusätzlich notwendige Materialien**

Reaktionsgefäße: LightCycler<sup>®</sup> Capillaries (20 µl) für das LightCycler<sup>®</sup> Carousel-Based System von Roche Applied Science (Mannheim)

### **Arbeitsanweisung**

Das Ansetzen der PCR-Reaktionsgemische erfolgt in einer mittels UV-Licht sterilisierten PCR-Arbeitsstation (CleneCab). Die Angaben zur Herstellung der Reaktionsgemische werden den Instruktionen des QuantiTect SYBR Green Kit der Firma Qiagen entnommen. Die allgemeine Zusammensetzung ist im Folgenden tabellarisch aufgeführt.



Reagenzien	Volumen/Reaktion	Endkonzentration
2× QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix*	10 µl	1×
Primer forward	0,5 µl	0.5 µM
Primer reverse	0,5 µl	0.5 µM
cDNA	variabel	≤1 µg
RNase-freies Wasser	variabel	
<b>Total reaction volume</b>	<b>20 µl</b>	

\* enthält eine Endkonzentration von 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>.

Das folgende PCR-Programm wird zum Nachweis jedes in der vorliegenden Arbeit beschriebenen PCR-Produkts verwendet.

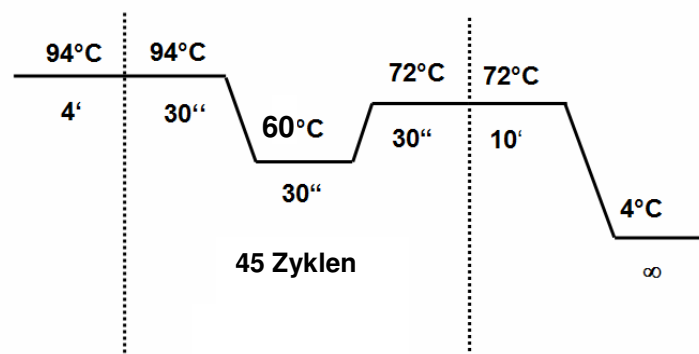


Abb. 4-7: PCR-Programm verwendet im Light-Cycler®.

#### 4.2.11 Klonierung

Klonieren bezeichnet in der Molekularbiologie die Vermehrung von beliebigen DNA-Abschnitten oder Genen in Wirtszellen. Die DNA, die vervielfältigt werden soll, wird in einen geeigneten Vektor eingebaut (Ligation), der sie auf die Wirtszelle überträgt (Transformation). Der am häufigsten dafür verwendete Wirt ist ein Stamm des Bakteriums *Escherichia coli*.

Durch das schnelle Wachstum der Bakterien (Teilungsrate: 20-30 Minuten unter geeigneten Wachstumsbedingungen) findet eine enorme Vermehrung dieses DNA-Moleküls in der Bakterienpopulation statt. Die Plasmid-DNA lässt sich durch einfache Methoden (Plasmid-Präparation) aus den Zellen isolieren.

### 4.2.11.1 Ligation

Bei der Ligation werden über das Enzym T4-DNA-Ligase homolog-kohäsive Enden (sticky ends) von DNA-Fragmenten miteinander verknüpft. Auf diese Weise werden PCR-Fragmente in Vektoren inkloniert. Das Enzym hat sein Temperaturoptimum bei 37°C, wird jedoch häufig für Ligationen bei niedrigeren Temperaturen eingesetzt um die Anlagerung der DNA-Fragmente zu erleichtern.

#### Verwendete Lösungen

Rapid Ligation-Kit der Firma Promega (Madison, USA)

#### Arbeitsanweisung

Die Ligation wird laut Instruktionen des Rapid Ligation-Kits der Firma Promega durchgeführt. Der Ansatz je Probe setzt sich wie folgt zusammen:

2× Rapid Ligation -Puffer	5µl
pGEM-Teasy Vector (50ng)	1µl
PCR-Produkt	xµl
T4 DNA-Ligase (3 U/µl)	1µl
RNA - freies Wasser	ad 10µl

Der Vektor und das zu ligierende Insert werden in einem molaren Verhältnis von 1:3 eingesetzt. Die DNA-Menge wird mittels folgender Formel ausgerechnet:

$$\frac{\text{ng Vector} \times \text{bp Länge Insert}}{\text{bp Länge Vector}} \times \text{Insert : Vector - Verhältnis} = \text{ng Insert}$$

Das Reaktionsgemisch wird über Nacht bei 37°C inkubiert. Hierbei gilt es zu beachten, dass die Reaktion in einem 0,5ml Eppendorf-Gefäß stattfindet, dessen Material als „nicht DNA-bindend“ gilt. In einem sonst gebräuchlichen 1,5ml Eppendorf-Gefäß, kann es passieren, dass die zu ligierende DNA (PCR-Produkt und Vektor) an die Wand des Gefäßes bindet und so ihrem Reaktionspartner nicht frei zur Verfügung steht.

### 4.2.11.2 Transformation

Die direkte Aufnahme von DNA-Molekülen in Zellen und die stabile Weitergabe dieser Information wird Transformation genannt. In der molekularen Genetik wird hauptsächlich das Bakterium *Escherichia coli* verwendet, um die Vervielfältigung transformierter Plasmide zu erreichen. Im Gegensatz zu einigen grampositiven Bakterien, besitzt das gramnegative Bakterium *E. coli* keine natürliche Kompetenz Plasmide aufzunehmen, kann aber durch verschiedene Methoden kompetent gemacht werden: Die Behandlung mit zweiwertigen Ionen (meist  $\text{Ca}^{2+}$ ) befähigt Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase zur Aufnahme von DNA. Die behandelten Zellen werden mit zirkulärer, superhelikaler Plasmid-DNA inkubiert.

#### Verwendete Lösungen

- LB-Medium (s. 4.1.7): Flüssig-Nährmedium und Ager-Platten mit Ampicillin (AppliChem) 50 µg/ml
- hitzekompetente Zellen des Bakteriums *Escherichia coli* JM107 (s. 4.1.6)
- Plasmid-DNA (Ligationsansatz)

#### Arbeitsanweisung

1. Plasmid-DNA und kompetente Zellen auf Eis auftauen
2. 100 µl kompetente Zellen + 10µl Plasmid-DNA (10-100ng)
3. Inkubation: 10' bis 15' auf Eis.
4. Hitzeschock: 90'' bei 42°C.
5. Zellen sofort wieder auf Eis stellen.
6. Zugabe von je 200 µl 2×  $\text{LB}_{\text{AMP}}$ -Medium.
7. Inkubation: 30' bei 37°C, 180 rpm.
8. Danach die Zellen auf LB- bzw.  $\text{LB}_{\text{AMP}}$ -Platten ausstreichen
9. Die Platten mit leicht geöffnetem Deckel etwa 10' bei 37°C inkubieren.
10. Den Deckel schließen, die Platten umdrehen und o/n bei 37°C inkubieren.

### 4.2.11.3 Bakterienkulturen

Zur Vermehrung Plasmid-tragender *E. coli*-Klone wird zunächst eine Vorkultur (etwa 3ml LB-Medium mit Ampicillin ) bei 37°C über Nacht im Schüttler bei 180 rpm inkubiert.  
Antibiotikakonzentration: Ampicillin 50µg/ml

#### 4.2.11.4 Mini-Plasmid-Präparation

Die Mini-Plasmid-Präparation wird mit Hilfe des Quantum Prep<sup>®</sup> Plasmid Miniprep Kit der Firma Biorad durchgeführt.

Alle folgenden Zentrifugationsschritte werden bei 13 000 rpm in der Tischzentrifuge (Sigma 3K30) durchgeführt. 2ml Bakteriensuspension werden in ein Eppendorf-Tube überführt und anschließend eine Minute zentrifugiert. Dem entstandenen Pellet werden 200µl Zell-Resuspension-Puffer zugegeben und das Pellet wird mit Hilfe der Pipette resuspendiert. Durch Zugabe von 200µl Lysis- Puffer werden die Zellen lysiert und die Plasmid-DNA tritt aus den Zellen aus. Zur Einstellung eines optimalen pH-Wertes werden 250µl Neutralisation-Puffer zugegeben. Nach einer fünfminütigen Zentrifugation zur Abtrennung des Zellschrotts wird der Überstand in eine neues Eppendorf-Tube diesmal mit Spin-Basket überführt. Zum Überstand werden 200µl Matrix zugegeben, an der die Plasmid-DNA bindet. Nach 30 Sekunden Zentrifugation verbleibt die Matrix (inkl. daran gebundener Plasmid-DNA) als fester Bestandteil im Spin-Basket, der Durchfluss wird verworfen. Danach wird die Matrix mit 400µl Wasch-Puffer versetzt und erneut 30 Sekunden zentrifugiert. Dieser Waschschrift wird zweimal wiederholt. Nach einer zusätzlichen Zentrifugation für 2 Minuten, die dazu dient, Reste des Wasch-Puffers loszuwerden, wird die Plasmid-DNA durch Zugabe von 100µl ddH<sub>2</sub>O und anschließender Zentrifugation für eine Minute aus der Matrix eluiert.

#### 4.2.11.5 Restriktionsverdau

Zur Kontrolle der Ligation wird aus einem Teil der zuvor präparierten Plasmide das Insert mit Hilfe von Restriktionsenzymen wieder herausgeschnitten. Dabei orientiert man sich an der im Plasmid vorhandenen *multiple cloning site* (MCS). Hierbei werden 5-10µg Plasmid mit etwa 0,5U Restriktionsenzym/µg Plasmid in 1× Restriktionspuffer (variiert je nach verwendetem Enzym) eingesetzt. Der Verdau wird über Nacht bei der optimalen Temperatur, die für das verwendete Enzym angegeben wurde, inkubiert (z.B. EcoRI bei 37°C). Der Restriktionsverdau kann mittels Gelelektrophorese überprüft werden. Die Größe des herausgeschnittenen Inserts liefert hierbei bereits einen Anhaltspunkt, ob das gewünschte PCR-Fragment inkloniert wurde. Zum endgültigen Nachweis des gesuchten PCR-Fragments wird das Plasmid sequenziert.

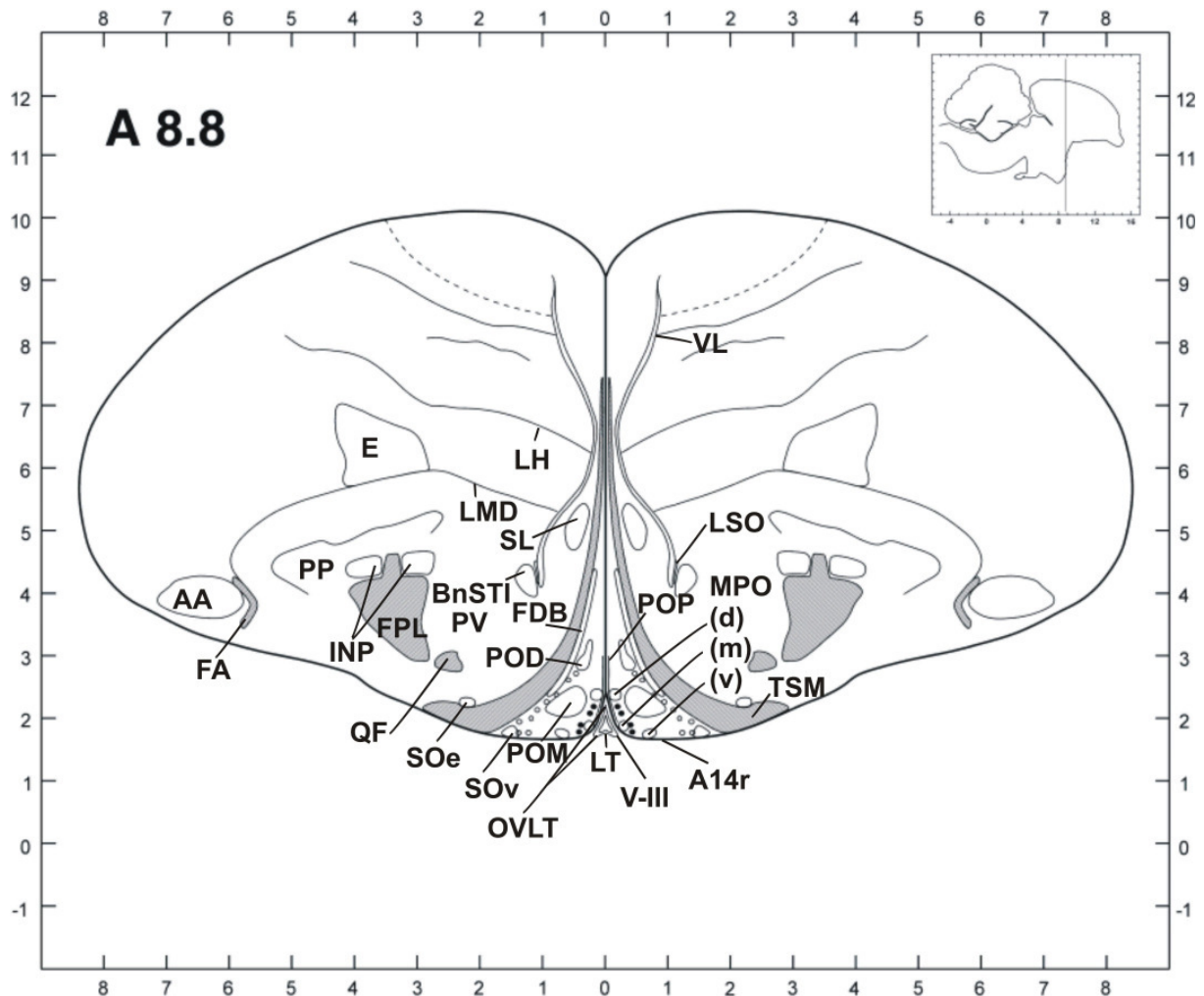
#### 4.2.11.6 Sequenzierung

Die klonierten Sequenzen werden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) sequenziert. Hierfür müssen die Proben in 1,5M Tris-HCl pH 8,0 vorliegen. Zur Sequenzierung eines Plasmids werden die Primer T7 und SP6 (pGEM-T<sub>easy</sub>) bzw. T3 und T7 (pBluescript-K+) verwendet. PCR-Produkte werden mit Hilfe der in der PCR verwendeten Primer sequenziert.

#### 4.2.12 Immunhistochemie

##### 4.2.12.1 Herstellung von Gewebeschnitten

Die mittels Perfusion (s. 4.2.1) fixierten und bei -80°C gelagerten Gehirne werden vor der Weiterbearbeitung 2 Stunden bei -20°C inkubiert, um ein Zerbrechen des Gewebes beim darauffolgenden Schneiden zu verhindern. Mit Hilfe eines Gefriermikrotoms (Kryostat) werden 40µm dicke, transversale Schnitte beginnend mit dem Auftreten des Tractus septomesencephalicus (TSM) hergestellt. Als Orientierung dient hierbei der Hühnergehirnatlas von KUENZEL und MASSON (1988): der geschnittene Bereich des Gehirns entspricht den Atlas-Positionen A 9.4 – A 7.6 (Beispiel s. Abb. 4-7). Die Gehirnschnitte werden in *24-well*-Platten, bestückt mit 2 ml 0,02M PBS (pH7,4) und 0,1% Natriumazid pro *well*, gesammelt. Die Lagerung erfolgt in diesen Platten bei 4°C.



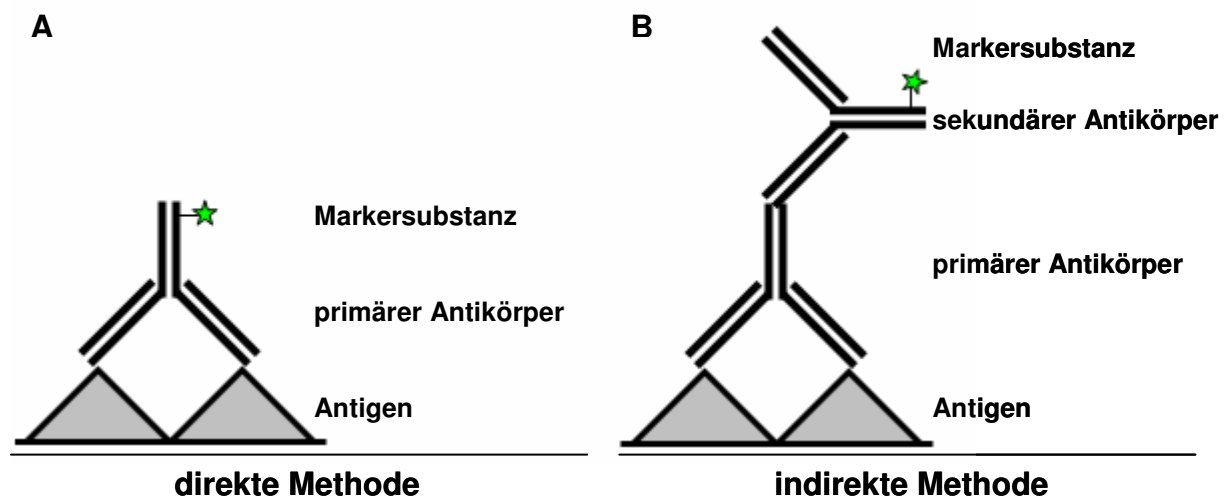
**Abb. 4-9:** Eine Schnittebene (schematische Darstellung) des Hühnergehirns modifiziert nach KUENZEL und MASSON (1988). A: Archistriatum, AA: Archistriatum Anterior, BnST: Bed Nucleus of Stria Terminalis, E: Ectostriatum, FA: Tractus Fronto-Archistriticus, FDP: Fasciculus Prosencephali Lateralis, INP: Nucleus Intrapedunculularis, LMD: Lamina Medullaris Dorsalis, LSO: Organum Septi Laterale., LH: Lamina Hyperstriatica, LT: Lamina Terminalis, MPO (d,m,v): Nucleus magnocellularis preopticus, pars dorsalis, medialis, ventralis, OVLT: Organum Vasculosum Lamina Terminalis, POM: Nucleus Preopticus Medialis, POP: Nucleus Preopticus Periventricularis, PP: Paleostrium Primitivum, PV: Nucleus Posteroventralis Talami, QF: Tractus Quotofrontalis, SL: Nucleus Septalis Lateralis, SO(e,v): Nucleus supraopticus, pars externus, ventralis, TSM: Tractus septomesencephalicus, VIII: Ventriculus Tertius, VL: Ventriculus Lateralis.

#### 4.2.12.2 Immunhistochemischer Nachweis von AVT und Galanin

Durch immunhistochemische bzw. immunhistologische Techniken wird es möglich, Proteine, Polysaccharide u.a. Strukturen, gegen die Antikörper gebildet werden können, hochspezifisch nachzuweisen. Der immunhistochemische Nachweis der Neuropeptide AVT und Galanin beruht auf dem Einsatz eines, spezifisch gegen das jeweilige Peptid gerichteten, polyklonalen Antikörpers. Polyklonale Antikörper sind natürliche Gemische der Antikörper, die im Zuge der Immunisierung eines Tieres gegen die verschiedenen Determinanten eines Antigens von den jeweiligen B-Lymphozyten bzw. Plasmazellen gebildet werden. Eine Antigen-

Antikörper-Reaktion allein reicht nicht aus, um das gesuchte Protein in einem Gewebeschnitt darzustellen. Dafür muss an den Antikörper eine sog. Markersubstanz gebunden werden, die eine Sichtbarmachung von gewebsgebundenen Antigen-Antikörperkomplexen erst ermöglicht. Bei den am häufigsten verwendeten Markersubstanzen handelt es sich um Fluoreszenzfarbstoffe (Fluorochrome), wie z.B. Fluoreszeinisothiocyanat (FITC). Fluorochrome sind Stoffe, die Licht einer bestimmten Wellenlänge aufnehmen (Absorption) und anschließend Photonen in einem anderen Wellenlängenbereich wieder abgeben (Emission). Zum Nachweis eines Antigens kann das verwendete Markermolekül direkt an den spezifischen (primären) Antikörper gekoppelt werden (direkte Nachweismethode), oder aber an einen zweiten (sekundären) Antikörper, der wiederum spezifisch gegen die Tierspezies des primären Antikörpers gerichtet ist (s. Abb. 4-8).

Die Konjugation eines Fluorochroms mit einem Antikörper über eine chemische Bindungsreaktion kann eventuell die Antikörperstruktur und damit dessen Immunreaktivität beeinflussen. Das ist mit ein Grund, warum häufig die indirekte Nachweismethode eingesetzt wird. Ein weiterer positiver Effekt dieser Methode ist die größere Variabilität im Einsatz unterschiedlicher sekundärer Antikörper und unterschiedlicher Markermoleküle.



**Abb. 4-10:** Schematische Darstellung immunhistochemischer Nachweismethoden: **A** direkte Methode, **B** indirekte Methode.

Die Wahl der primären und sekundären Antikörper hängt u.a. vom geplanten Versuchsaufbau ab. Will man eine Kolokalisation zweier Peptide in einem Schnitt nachweisen, müssen die primären Antikörper aus unterschiedlichen Tierspezies stammen. Für den Nachweis des AVT wird ein in Kaninchen (*rabbit-anti-AVT*), für den Nachweis des Galanin ein in

Meerschweinchen (*guinea pig-anti-Galanin*) gezogener Antikörper ausgewählt. Die sekundären Antikörper, gerichtet gegen die jeweilige Tierart des primären Antikörpers, stammen beide aus der Ziege (*goat-anti-rabbit* bzw. *goat-anti-guinea pig*).

### Verwendete Lösungen

#### 0,02M PBS

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O		2,208 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O		14,952 g
NaCl		4,5g
dd H <sub>2</sub> O	add	500 ml
auf pH 7,4 einstellen		

#### 0,4% Triton (in 0,02M PBS)

Triton X-100		200 µl
PBS 0,02M	add	100 ml
Achtung: Triton sehr zähflüssig		

#### 10% NGS (Normales-Ziegenserum)

NGS ( <i>selbstgewonnen</i> )		10 ml
Triton X-100		200 µl
PBS 0,02M	add	100 ml
Achtung: Triton sehr zähflüssig		

#### Antikörper-Lösung

PBS		0,02 M
Triton X-100		0,2%
NGS (Dako, Hamburg)		1 %
Natriumazid		0,1%

### Antikörper:

- *rabbit-anti-AVT* (rb $\alpha$ AVT); zur Verfügung gestellt von Dr. D. Gray (Max Planck Institut für Physiologische und Klinische Forschung, Bad Nauheim, GE)  
Verdünnung in Antikörper-Lösung 1:30 000 (Hähne) / 1:45 000 (Hennen)
- *guinea pig-anti-Galanin* (gp $\alpha$ Gal); Peninsula Laboratories, California, USA  
Verdünnung in Antikörperlösung 1:600
- *goat-anti-rabbit* (go $\alpha$ rb) gekoppelt mit Alexa Fluor 555 (A555); Molecular Probes Pailsley, UK.  
Verdünnung in Antikörperlösung 1:400
- *goat-anti-rabbit* (go $\alpha$ rb) gekoppelt mit Fluoreszeinisothiocyanat (FITC); Molecular Probes Pailsley, UK.



## Verdünnung in Antikörperlösung 1:400

weitere Lösungen:

- Einbettmedium *vectashield*<sup>®</sup> (Vector H-1000) Vector laboratories, Burlingame, USA
- Nagellack, zum Versiegeln der Objektträger

**Arbeitsanweisung**

Das Protokoll erstreckt sich über zwei Tage. Zu beachten ist, dass ab dem Einsatz des sekundären Antikörpers (Fluoreszenz-gekoppelt) alle Arbeitsschritte im Dunkeln, d.h. so lichtabgeschirmt wie möglich, durchzuführen sind. Der Einfachheit halber sind die einzelnen Schritte hier in tabellarischer Form dargestellt:

**1.Tag**

1.	Schnitte in 0,02M PBS waschen; Schüttelinkubator	6x 15 min	RT
2.	Schnitte mit 0,4% Triton spülen; Schüttelinkubator	1x 15 min	RT
3.	Schnitte in 0,02M PBS waschen Schüttelinkubator	1x 15 min	RT
4.	Schnitte mit 10% NGS blocken; Schüttelinkubator	1x 30 min	RT
5.	Schnitte mit primärem Antikörper inkubieren	o/n	4°C

**2. Tag**

6.	Schnitte in 0,02M PBS waschen; Schüttelinkubator	6x 15 min	RT	DUNKEL !!
7.	Schnitte mit sekundärem Antikörper inkubieren	90 min	RT	
8.	Schnitte mit 0,2% Triton spülen; Schüttelinkubator	3x 15 min	RT	
9.	Schnitte in 0,02M PBS waschen; Schüttelinkubator	2x 15 min	RT	
10.	Schnitte mit Vectashield <sup>®</sup> eindeckeln		RT	
11.	Schnitte bis zur Aufnahme im Kühlschrank lagern		4°C	

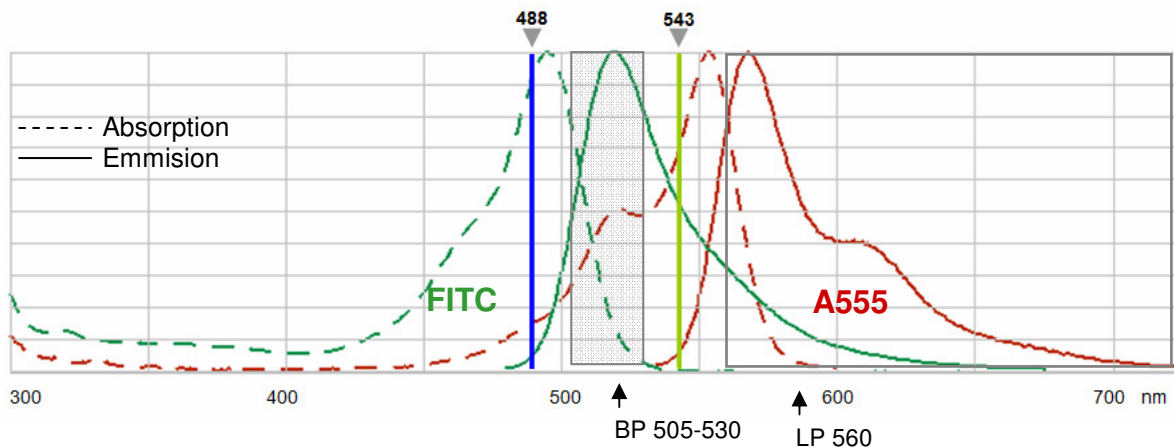
Die in dieser Arbeit verwendeten Antiseren für AVT und Galanin wurden bereits in der Arbeitsgruppe Funktionelle Genetik und Bioregulation des FLI Mariensee in anderen immunhistochemischen Analysen am Hühnergehirn getestet (BARTH et al., 1997; JURKEVICH et al., 1997; KLEIN et al., 2006; KLEIN und GROSSMANN, 2008). Notwendige Kontrollen, wie

die Präinkubation des Galanin Antiserums mit Schweine-Galanin zum Austesten des primären Antikörpers wurden durchgeführt (KLEIN et al., 2006).

#### 4.2.12.3 Konfokale Laser-Raster-Mikroskopie

Bei den meisten Konfokalmikroskopen handelt es sich um sog. Laser-Raster-Mikroskope (*laser scanning microscope – LSM*). Hierbei rastert bzw. scannt ein Laser zeilenweise ein Objekt mit einem fokussierten Strahl. Es werden Fluoreszenzmoleküle angeregt, welche sich im Lichtweg des fokussierten Laserstrahles befinden. Bildet man die Signale der Fluoreszenzemission auf einer Bildebene ab, in der sich eine kleine Lochblende (konfokale Blende, *pinhole*) befindet, können nur jene Signale, die aus der Fokusebene kommen, exakt in diese konfokale Blende fallen. Der Durchmesser der konfokalen Blende ist variabel und im Idealfall so klein wie möglich. Die Signalanteile, die aus anderen Ebenen oberhalb oder unterhalb der Fokusebene in der Probe stammen, werden dadurch ausgeblendet und es kommt zu einer Schichtaufnahme. Mit Hilfe eines konfokalen LSM ist es also möglich, aus einer „dicken“ Probe (40µm) ausschließlich eine dünne Präparatschicht, einen sog. optischen Schnitt, abzubilden. Bewegt man nun das Präparat nach dem Abrastern einer optischen Schnittebene entlang der optischen Achse auf bzw. ab, erhält man eine Vielzahl optischer Schnitte aus unterschiedlichen Präparatebenen. Dieser 3D-Datensatz kann mittels Software wieder zu einem Schnitt zusammengesetzt werden, sodass sich eine klar differenzierbare Abbildung der gesamten Schnitttiefe ergibt. Ein weiterer Vorteil liegt in der Mehr-Kanal-Aufnahme eines LSM. Hierbei können einzelne Aufnahmekanäle unterschiedlich angesteuert (über Filtersysteme und Spiegel voneinander getrennt) und damit verschiedene Fluoreszenzsignale im selben Präparat getrennt voneinander betrachtet werden. Eine Überlagerung der auf diese Weise gewonnenen Daten in einem weiteren Kanal gibt Aufschluss über eine eventuelle Kolo-kalisation der aufgenommenen Signale.

Die Anregung des FITC erfolgt mittels Argon-Laser (488 nm, blaues Licht) und die Selektion der Emission (grünes Licht) über einen Bandpass-Filter von 505 bis 530 nm. A555 hingegen wird mit dem Helium/Neon-Laser (543nm, grünes Licht) angeregt und dessen Emission (rotes Licht) wird mit einem Langpass-Filter ab 560 nm selektiert (s. Abb. 4-9).



**Abb. 4-11:** Schematische Darstellung der Adsorptions- und Emissionsspektren der Fluorochrome FITC und A555 inklusive Laseranregungen durch den Argon-Laser (488nm, blau), HeNe-Laser (543nm, grün) und der verwendeten Filter: Bandpass-Filter (BP 505-530) und Langpass-Filter (LP 560) (Molecular Probes, Invitrogen).

Es wurden Probeaufnahmen an Tieren jeder Behandlungsgruppe beider Geschlechter vorgenommen, um die maximale, noch differenzierbare Signalintensität und damit die maximale Anregungsenergie der Laser festzusetzen. Unter diesen Bedingungen wurden anschließend alle ausgewählten Gehirnschnitte der Tiere eines Geschlechts aufgenommen. Der Nucleus supraopticus wurde in fünf, morphologisch differenzierbare Abschnitte eingeteilt. Je Abschnitt wurden 2 Schnitte pro Tier von drei Tieren pro Behandlungsgruppe und Geschlecht ausgewertet. Die Auswertung beinhaltet die Intensitätsbestimmung einzelner magnozeller Neurone (3 höchster Intensität, 3 mittlerer Intensität und 3 niedrigster Intensität) pro Peptid und pro Schnitt. Zudem wird die Zahl Galanin-immunoreaktiver Neurone pro Schnitt gezählt, ein Verfahren das aufgrund der hohen Anzahl AVT-haltiger Neurone und ihrer sehr dichten Lage an- und übereinander nicht durchgeführt wird. Grundsätzlich wird auch die Intensität der sog. Hintergrundstrahlung ermittelt und der dreifache Wert dieser Intensität als Nachweisgrenze von den gemessenen Intensitäten der Neurone abgezogen. Die rechnerisch dabei entstehenden negativen Werte werden =0 gesetzt. Die Intensitätsbestimmungen erfolgen mit der dem Mikroskop zugehörigen LSM-Software (Zeiss, Jena).

#### 4.2.13 Statistische Auswertung

Die Bestimmung der Plasmaosmolalität, des Plasma-AVT-Gehaltes und der Natriumionenkonzentration im Blut dient der Überprüfung der osmotischen Stimulation. Um Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen (Gruppe normohydrierter Tiere, Gruppe

dehydrierter Tiere) zu belegen, werden die gemessenen Werte mittels *Student's t-Test* analysiert. Zusätzlich werden mittels Pearsonscher Korrelationskoeffizient Wechselbeziehungen zwischen Plasmaosmolalität und Plasma-AVT-Gehalt in normo- und dehydrierten Tieren verifiziert. Die Auswertung der *realtime* PCR erfolgt mit Hilfe des Excel-Makros *Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test* © von Dr. Michael Pfaffl (Institut für Physiologie, Technische Universität München). Unterschiede im hypothalamischen AVT und Galanin mRNA-Gehalt zwischen den Versuchsgruppen (Northern Blot-Analyse) werden mittels *student's t-Test* analysiert. Die statistische Betrachtung der Intensitätsunterschiede AVT- und Galanin-ir Neurone und der Anzahl Galanin-ir Neurone wird ebenfalls mittels *Student's t-Test* durchgeführt. Hierbei werden die Intensitätswerte/Zellzahlen einzelner Regionen des SON separat, sowie die Gesamtheit des SON zwischen den Versuchsgruppe verglichen. Intensitätsunterschiede und Unterschiede in der Anzahl Galanin-ir Neurone zwischen den einzelnen Regionen des SON innerhalb der Versuchsgruppen werden mit Hilfe einer ANOVA-Analyse mit anschließendem Tukey-Test verifiziert. In die statistische Analyse gehen je zwei Schnitte pro Region/pro Tier ein.

Die statistische Auswertung (*Student's t-Test*, Pearsonscher Korrelationskoeffizient und ANOVA Analyse mit anschließendem Tukey Test) erfolgt mit Hilfe des Programms Sigma-Stat 3.5 (Systat Software Inc.). Die Signifikanzgrenze lag jeweils bei  $p \leq 0,05$ .

## 5 Ergebnisse

Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse zu den an Hennen und Hähnen durchgeführten Experimenten im direkten Vergleich der Geschlechter dargestellt.

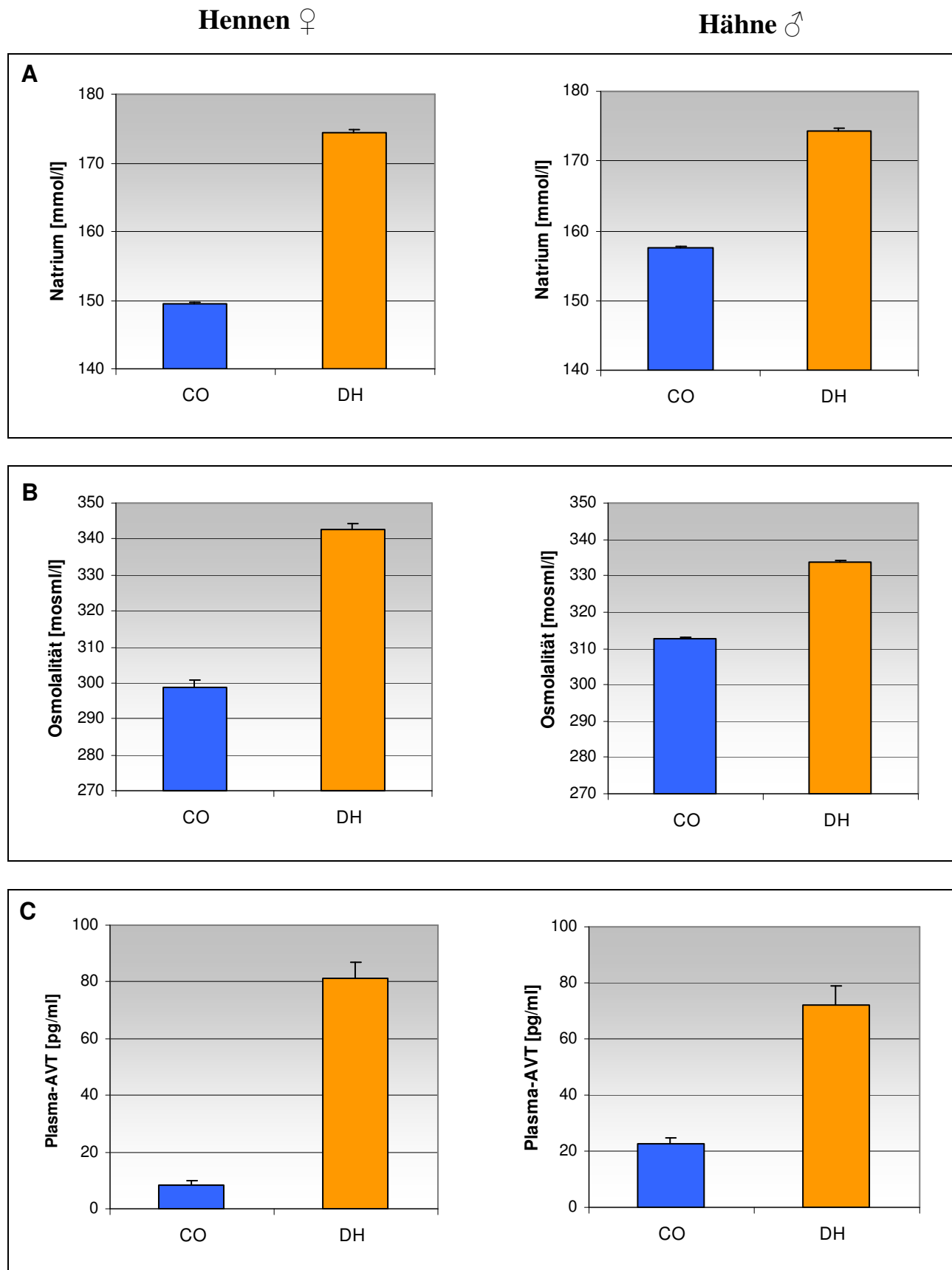
### 5.1 Veränderung der Blutparameter nach Dehydrierung

Eine Dehydrierung für 48 Stunden führt in beiden Geschlechtern zu einem signifikanten Anstieg der Natriumkonzentration ( $p < 0,001$ ), Plasmaosmolalität ( $p < 0,001$ ) und Plasma-AVT Konzentration ( $p < 0,001$ ) im Blut. Weder bei normohydrierten (CO) noch dehydrierten Hähnen (DH) besteht eine Korrelation zwischen Osmolalität und Plasma-AVT-Gehalt (Hähne-CO:  $r = 0,49$ ;  $p > 0,05$ ; Hähne-DH:  $r = -0,43$ ;  $p > 0,05$ ). Auch normohydrierte Hennen zeigen keine Korrelation der beiden Blutparameter ( $r = -0,6$ ;  $p > 0,05$ ) während dehydrierte Hennen bei einem Korrelationskoeffizienten von  $r = 0,73$  eine Signifikanz von  $p = 0,015$  aufweisen. Im Detail heißt das für diese Gruppe: Paare von Variablen mit positivem Korrelationskoeffizienten und einer Signifikanz  $p < 0,05$  steigen gemeinsam an, ein Paar mit negativem Korrelationskoeffizienten und einer Signifikanz  $p < 0,05$  nimmt gemeinsam ab, während die anderen gemeinsam ansteigen. Paare mit einer Signifikanz  $p > 0,05$  zeigen keine Korrelation zwischen den Variablen.

Die basale Plasma-AVT-Konzentration im Vergleich beider Geschlechter ist bei Hähnen signifikant höher als bei Hennen ( $p < 0,001$ ). Dieser Unterschied ist im aufregulierten System (nach 48 Stunden Dehydrierung) nicht mehr zu finden. Gleiches gilt für die Natrium-Konzentration im Plasma. Die Plasma-Osmolalität unterscheidet sich auch im aufregulierten System zwischen Hähnen und Hennen signifikant. Hierbei dreht sich jedoch das Verhältnis um: Während im normohydrierten Zustand Hähne eine höhere Plasma-Osmolalität aufweisen als Hennen ( $p < 0,001$ ), zeigen im dehydrierten Zustand Hennen eine höhere Osmolalität ( $p = 0,006$ ) und damit einen stärkeren Anstieg der Osmolalität im Plasma.

Behandlung	normohydriert (CO)		dehydriert (DH)	
	Hennen ♀	Hähne ♂	Hennen ♀	Hähne ♂
AVT [pg/ml]	8,28 ± 0,24 *	22,45 ± 2,03 *	81,45 ± 0,39 *	71,99 ± 6,74 *
Na <sup>+</sup> [mmol/l]	149,39 ± 0,61 *	157,58 ± 0,34 *	174,38 ± 1,12 *	172,43 ± 0,31 *
Osmolalität [mosml/l]	298,55 ± 2,13 *	312,73 ± 0,49 *	342,55 ± 1,45 *	333,75 ± 0,54 *
	n=10	n=11	n=10	n=10
	* $p < 0,001$			

**Tab. 5-1:** Plasma-AVT-Gehalt, Natrium-Konzentration und Osmolalität normo- und dehydrierter Tiere im Vergleich der Geschlechter

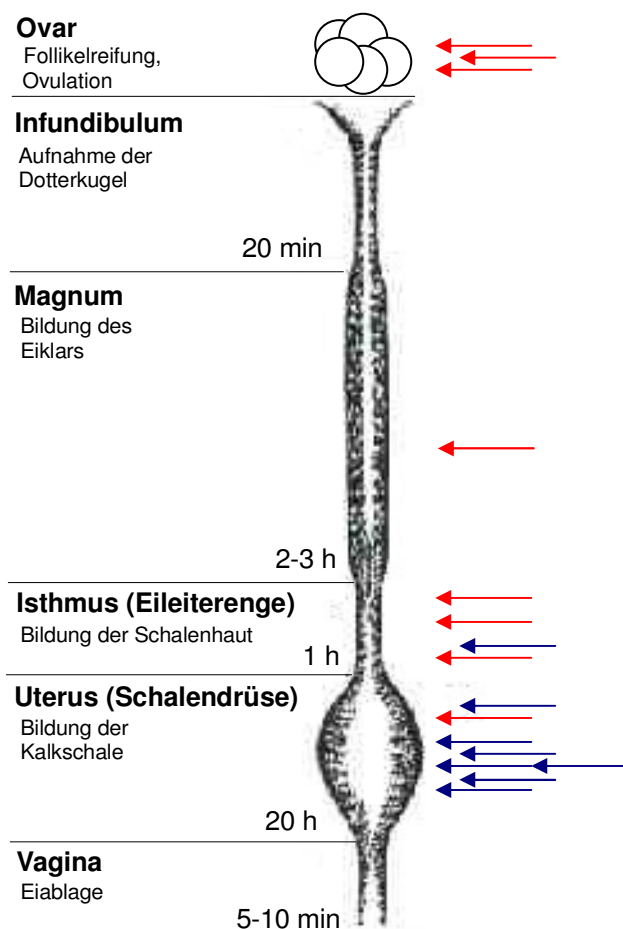


**Abb. 5-1:** Vergleich einzelner Blutparameter zwischen normhydrierten (CO) und dehydrierten (DH) Hennen (links) bzw. Hähnen (rechts): **A** Natrium-Konzentration ( $p < 0,001$ ), **B** Osmolalität ( $p < 0,001$ ) und **C** Plasma-AVT-Gehalt ( $p < 0,001$ ).

## 5.2 Einfluss der Dehydrierung auf Ovulation/Oviposition der Henne

Zwei Gruppen je 8 Hennen (4 Hennen pro Behandlung) wurden nachmittags 9 Stunden nach Tagesbeginn (Licht an) verwendet. Der Legedarm jeder Henne wurde entnommen, um die Position des Eies zu bestimmen. Alle Hennen wurden seit Einstellung bzw. Legebeginn bezüglich ihrer Legehäufigkeit beobachtet. Vor Versuchsbeginn wurde über zwei Tage kontrolliert, zu welcher Tageszeit die Eiablage stattfindet. Es wurden nur solche Tiere in den Versuch genommen, die regelmäßig (d.h. ohne zu erwartende Legepause) ihre Eier zwischen 0 und 4 Stunden nach Tagesbeginn ablegten.

Während sich die Eier der Kontrolltiere zu 87,5% in der Schalendrüse befanden, konnte von 8 dehydrierten Tieren nur bei einem Tier das Ei bereits in der Schalendrüse gefunden werden. Bei drei Tieren befand sich der ovulierte Follikel im 15 cm langen Isthmus (etwa 4-7 cm vom Uterus entfernt). Während bei einem Tier der ovulierte Follikel (Dotter + Eiklar) noch im Magnum war, hatten drei weitere Tiere noch nicht ovuliert. Alle Hennen hatten jedoch am Vormittag des Versuchstages ein Ei (0-6 Stunden nach Licht an) abgelegt.



**Abb. 5-2:** Position der Eier normohydrierter (blaue Pfeile) und dehydrierter (rote Pfeile) Hennen im Legedarm: schematische Darstellung.

### 5.3 Transkriptebene

Die mRNA-Expression für AVT und Galanin im weiblichen und männlichen Hypothalamus wurde mittels *realtime* PCR und Northern Blot Analyse quantitativ bestimmt. Galanin Rezeptor 1 (GalR1) und Galanin Rezeptor 2 (GalR2) wurden zum einen unter Versuchsbedingungen (Dehydrierung) in Hypothalami beider Geschlechter, zum anderen in unterschiedlichen Geweben unter Normalbedingungen über *realtime* PCR nachgewiesen.

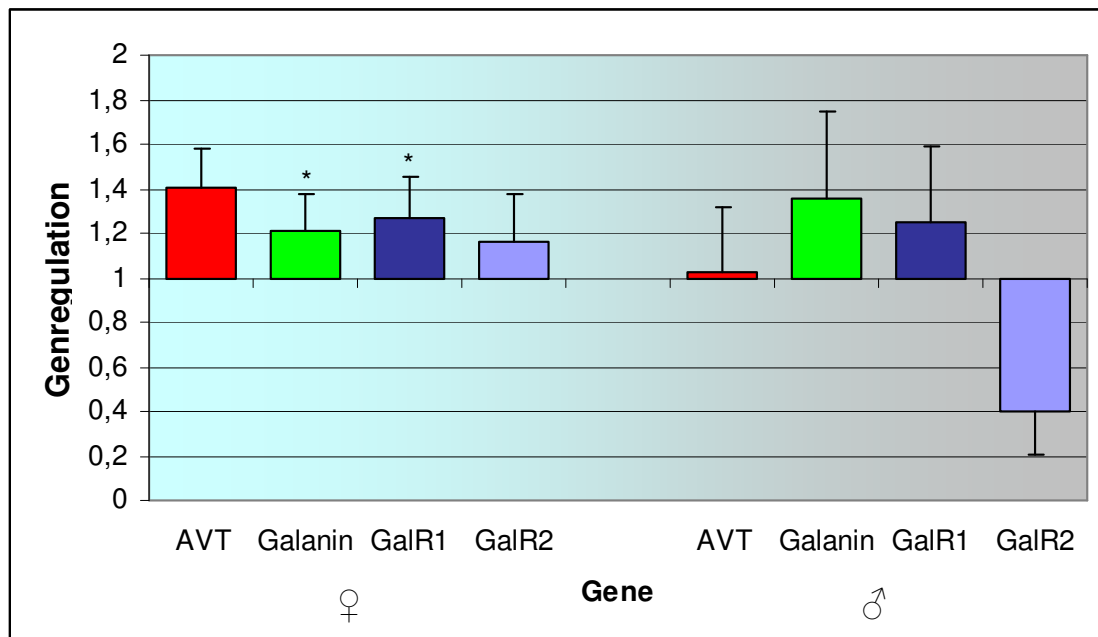
#### 5.3.1 Einfluss der Dehydrierung auf mRNA Expression im Hypothalamus

##### 5.3.1.1 *realtime* PCR

Nach einer 48stündigen Dehydrierung steigt im weiblichen Hypothalamus (n=8) die mRNA Konzentration sowohl für AVT als auch für Galanin, GalR1 und GalR2 an (s. Abb 5-3). Nach Normalisierung auf die Referenzgene  $\beta$ -Actin und TBP erhält man für Galanin eine Steigerung des mRNA-Gehaltes um 21% und für GalR1 um 27% bei einer Signifikanz von  $p < 0,05$ . Für AVT zeigt sich eine deutlich stärkere Veränderung (40% mehr mRNA in dehydrierten Hennen), unterliegt aber einer höheren individuellen Streuung ( $p > 0,05$ ). Für GalR2 werden die geringsten Veränderungen (16%) mit dem gleichzeitig höchsten Standardfehler ( $p > 0,05$ ) festgestellt.

Bei Hähnen (n=6) können nach Normalisierung auf die Referenzgene  $\beta$ -Actin und TBP keine signifikanten Veränderungen ( $p > 0,09$ ) nachgewiesen werden. Weder AVT mRNA mit einer rechnerischen Erhöhung von 2%, noch Galanin (35%) und GalR1 mRNA (23%) können aufgrund der hohen Varianz innerhalb der untersuchten Versuchsgruppen als eindeutig erhöht betrachtet werden. Auch für den Gehalt an GalR2 mRNA, der bei dehydrierten Hähnen gemittelt um 60% niedriger ist verglichen mit Kontrolltieren, wird keine Signifikanz erreicht. Somit zeigt eine 48stündige Dehydrierung adulter Hähne keine eindeutige Veränderung des mRNA-Gehaltes für AVT, Galanin und Galanin-Rezeptor 1 (s. Abb 5-3).



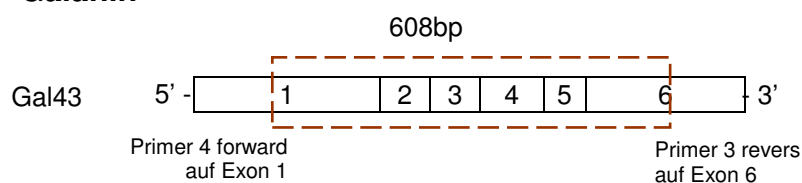


**Abb. 5-3:** Darstellung der Genregulation nach Dehydrierung für AVT, Galanin, GalR1 und GalR2 im weiblichen und männlichen Hypothalamus des Huhns (\* $p < 0,05$ ). Normalisierung auf Referenzgene:  $\beta$ -Actin, TBP (Hennen/Hähne).

### 5.3.1.2 Northern Blot Analyse

Zum spezifischen Nachweis von Galanin mittels Northern Blot Analyse wurde zunächst eine cDNA-Sonde mit einer Länge von 608bp kloniert (pGEM-T<sub>easy</sub>-Gal43). Im Folgenden wird die Lage der Galanin-cDNA-Sonde innerhalb der mRNA-Sequenz schematisch dargestellt.

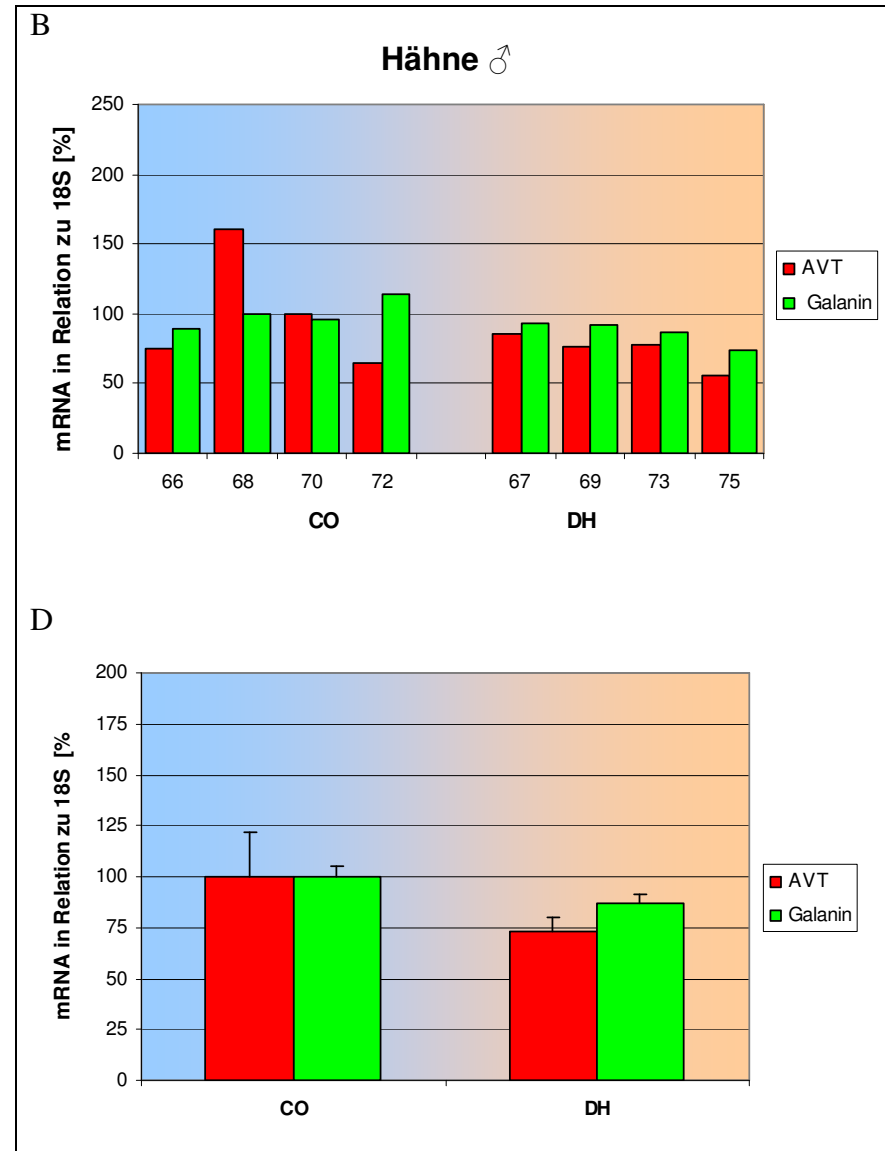
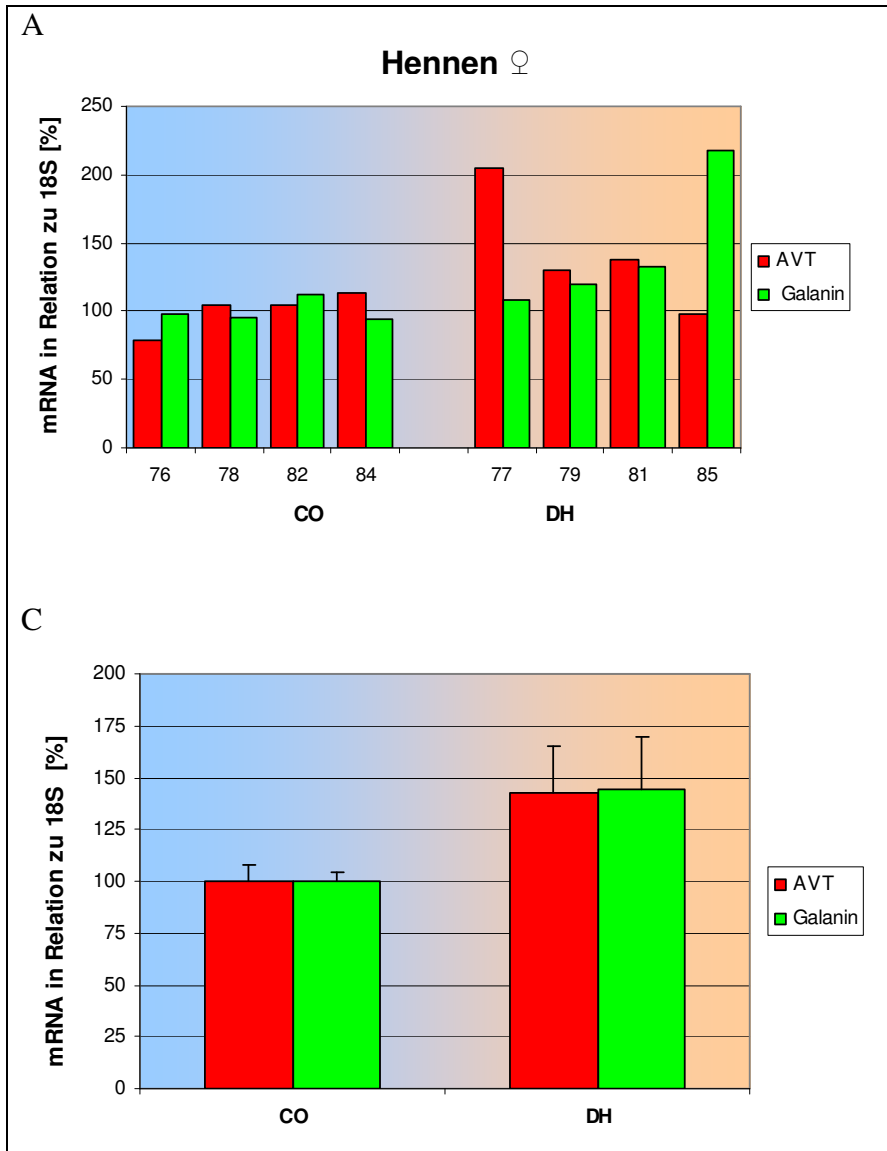
#### Galanin



**Abb. 5-4:** Schematische Darstellung der Lage der klonierten cDNA-Sonde zum Nachweis des Galanin im Hypothalamus des Huhns (*Gallus gallus*) mittels Northern Blot Analyse.

Nach Messung des radioaktiven Signals ( $\text{cpm} \times \text{mm}^2$ ) wurde das gemessene AVT- bzw. Galanin-Signal mit Hilfe der Signalstärke der 18S rRNA normalisiert und prozentual zueinander in Beziehung gesetzt. Hierbei gelten die Mittelwerte der Einzeltiermessungen normohydrierter Tiere als Bezugspunkt (100%) innerhalb eines Geschlechts (Abb.5-5: A-D).

Während der Gehalt an AVT-mRNA bei Hennen nach 48 Stunden Dehydrierung im Mittel um 42,4% ansteigt (C), verringert sich der mRNA-Anteil für AVT bei Hähnen um 26,6% (D). Der Gehalt an Galanin-mRNA verändert sich im Mittel in beiden Geschlechtern gleichgerichtet zur AVT-mRNA (C, D). Für die dehydrierten Hennen bedeutet dies einen Anstieg der Galanin-mRNA im Mittel um 44,7%, für die Hähne einen Abfall um 13,4%. Aufgrund der individuellen Schwankungen der Einzeltiere (Abb. 5-5: A,B) im mRNA-Gehalt der Zielgene (A, B) können jedoch keine signifikanten Veränderungen festgestellt werden.



**Abb. 5-5:** Northern Blot Analyse des AVT- und Galanin-mRNA-Gehaltes männlicher und weiblicher Hypothalami nach Dehydrierung, Vergleich zwischen den Behandlungsgruppen (CO, DH). **A** Einzeltiere Hennen, **B** Einzeltiere Hähne, **C** gemittelte Tendenz Hennen, **D** gemittelte Tendenz Hähne

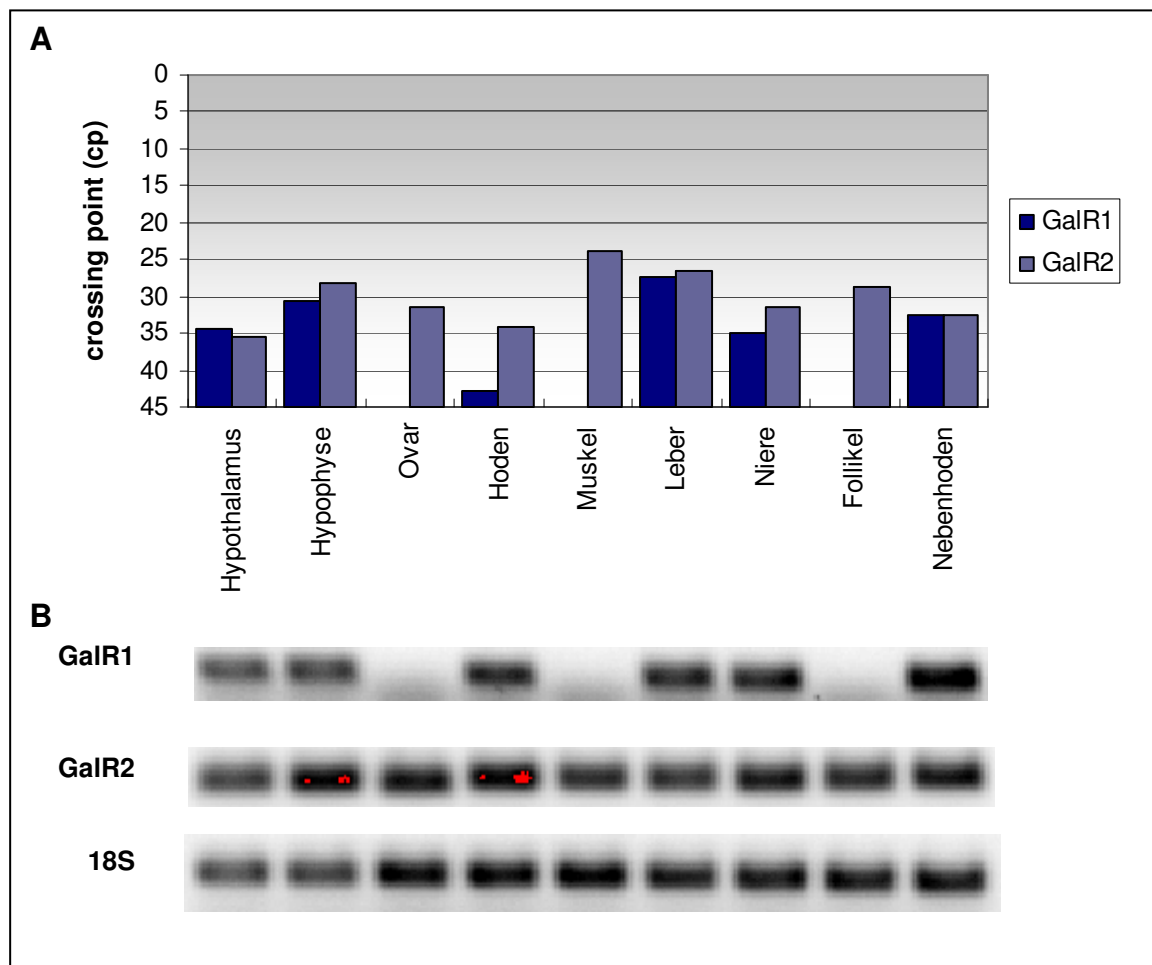
### 5.3.2 Nachweis der Galanin Rezeptoren in unterschiedlichen Geweben

Das Vorkommen der Rezeptoren wurde mittels *realtime* PCR normalisiert auf 18S in unterschiedlichen Geweben nachgewiesen (Abb. 5-6: A und B). Der Gehalt an Rezeptor-mRNA wird hierbei über die Zyklenzahl definiert, nach deren Erreichen die Zunahme an mRNA exponentiell ansteigt (*crossing point*).

**GalR1** (A) kann in Hypothalamus, Hypophyse, Hoden, Leber, Niere und Nebenhoden nachgewiesen werden, nicht jedoch in Ovar, Muskel und Follikel. Die geringste, detektierbare mRNA-Menge für GalR1 findet man im Hoden (Zyklus 42,9), die höchste Menge in der Leber (Zyklus 27,3).

**GalR2** (A) hingegen kommt in allen untersuchten Geweben vor und wird nur im Hypothalamus in geringerer Menge im Vergleich zu GalR1 exprimiert (GalR2: Zyklus 35,5; GalR1: Zyklus 34,5). Der Hypothalamus enthält gleichzeitig die geringste Menge GalR2-mRNA. Die höchste Expressionsrate zeigt sich im Muskel (Zyklus 24), gefolgt von der Leber (Zyklus 26,5).

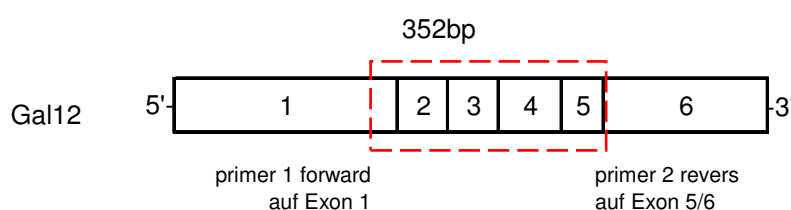
Der Nachweis der klonierten PCR-Fragmente nach elektrophoretischer Auftrennung über Ethidiumbromid-Färbung mit anschließender UV-Detektion bestätigt das Vorkommen des Galanin-Rezeptoren in Hypothalamus, Hypophyse, Hoden, Leber, Niere und Nebenhoden (B). Während GalR2 zudem in Ovar, Muskel und Follikel nachgewiesen werden kann, fehlt GalR1 mRNA dort völlig. Auch hier wurde 18S rRNA als Referenzgen dargestellt (B).



**Abb.5-6:** Darstellung der mRNA-Expression für GalR1 und GalR2 des Huhns (*Gallus gallus*) in unterschiedlichen Geweben, normalisiert auf 18S. **A** quantitative Darstellung anhand der *crossing points* **B** gelelektrophoretischer Nachweis.

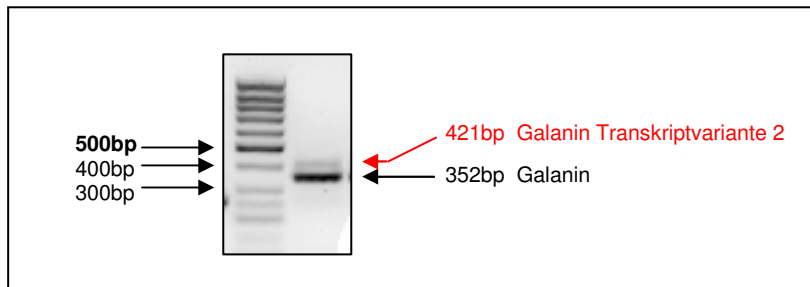
### 5.4.3 Galanin mRNA: Nachweis einer zweiten Spleißvariante

Der Nachweis der Galanin-mRNA des Huhns wurde zunächst über konventionelle PCR erbracht. Die Primer wurden so gewählt, dass das entstehende Fragment mit einer Länge von 352bp alle sechs Exons des Galanins überspannt.



**Abb. 5-7:** Schematische Darstellung der Lage des klonierten Galanin-PCR-Fragments zum Nachweis mittels konventioneller PCR

Nach erfolgter Gelelektrophorese über ein 2,5%iges Agarosegel werden zwei Banden sichtbar. Die untere Bande hat die zu erwartende Länge von 352bp und entspricht dem nachzuweisenden Galanin. Die obere, sehr viel schwächere Bande ist mit 421bp um 69bp länger (s. Abb 5-8).

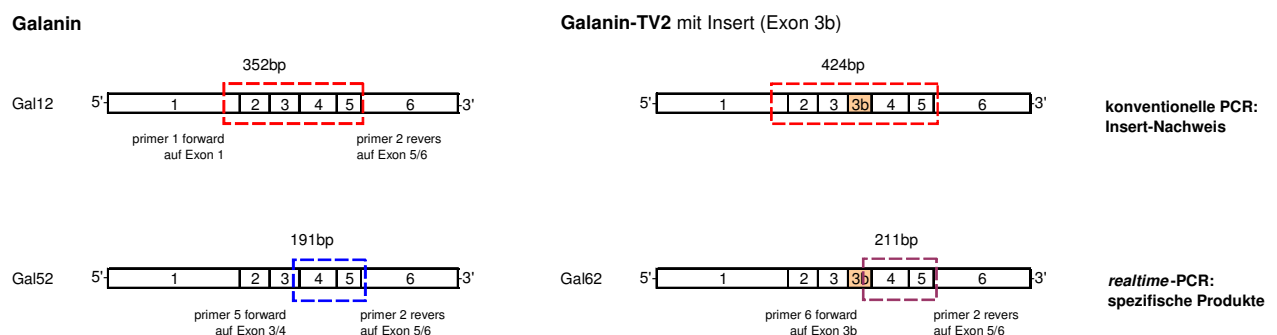


**Abb. 5-8:** Nachweis einer zweiten Transkriptvariante für Galanin beim Huhn (*Gallus gallus*) mittels PCR

Beide PCR-Produkte wurden in Vektoren (pGEM-Teasy) kloniert und in thermo-kompetente Zellen (*E. coli* JM107) transformiert. Aus den über Nacht hochgezogenen Zellen wurden die Plasmide mittels Plasmid-Minipräparation extrahiert und anschließend zum Sequenzieren gegeben. Die Sequenzanalyse ergab eine Übereinstimmung in den Basen 1 bis 170 beider Transkriptvarianten, gefolgt von einem 69bp Einschub (Insert) in Transkriptvariante 2 (Gal-TV2) und einer erneuten Übereinstimmung von Basenpaar 171 (248) bis 352 (424) (Abb. 5-10).

Der Vergleich der klonierten Fragmente mit genomischen Sequenzdaten bereitgestellt über NCBI, lässt den Schluss zu, dass es sich bei dem zusätzlichen 69bp langen Insert in Gal-TV2 um ein zusätzliches Exon handelt. Es liegt zwischen Exon 3 und Exon 4 des Galaninens und wird hier im Weiteren als Exon 3b bezeichnet.

Da das Primerpaar Gal12 beide Transkriptvarianten kloniert, wurden zusätzliche Primer konstruiert, die spezifisch Galanin bzw. Gal-TV2 klonieren (s. Abb 5-9).



**Abb. 5-9:** Schematische Darstellung der Lage der klonierten PCR-Fragmente für Galanin- und Gal-TV2-mRNA

```

            1                                                     50
    Galanin  CAGCTCCCTGCGAGACACCGTTGTGCCCCAGCTCAAGATGCAGAGGTGTG
             | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Galalin TV2 CAGCTCCCTGCGAGACACCGTTGTGCCCCAGCTCAAGATGCAGAGGTGTG
             51                                                     100
    Galanin  TGGGTTTCCTGTTTCTGTCTTTAATCCTTTGTGCCGCCCTGTCAGAAACA
             | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Galalin TV2 TGGGTTTCCTGTTTCTGTCTTTAATCCTTTGTGCCGCCCTGTCAGAAACA
             101                                                     150
    Galanin  TTCGGACTGGTTTTGTCTGCAAAGAAAAAGGGGCTGGACTTTGAACAG
             | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Galalin TV2 TTCGGACTGGTTTTGTCTGCAAAGAAAAAGGGGCTGGACTTTGAACAG
             151                                                     200
    Galanin  TGCTGGTTACCTACTTGGGCCAC-----
             | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Galalin TV2 TGCTGGTTACCTACTTGGGCCACGTCGTATTGATCACCTTTTAATGATAA
             201                                                     250
    Galanin  -----ATGCA
             | | | | |
Galalin TV2 AGGAAATGCCCATTTGCAAGGGGGAGAGAAGAGGCACCAGGGGCATATGCA
             251                                                     300
    Galanin  GTAGATAACCACAGATCTTTTAATGACAAACATGGTTTCACTGGTAAACG
             | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Galalin TV2 GTAGATAACCACAGATCTTTTAATGACAAACATGGTTTCACTGGTAAACG
             301                                                     350
    Galanin  GTGAAATACACCTGATGAGGATATAAAAGCAGGAAATCTTGAAGACCAC
             | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Galalin TV2 TGAAATACAGCCTGATGAGGATATAAAAGCAGGAAATCTTGAAGACCAC
             351                                                     400
    Galanin  GCTGATGAAAACATTGTGCGCACAGTAATCGAATTTCTGACTTACTTGCA
             | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Galalin TV2 GCTGATGAAAACATTGTGCGCACAGTAATCGAATTTCTGACTTACTTGCA
             401                                                     424
    Galanin  TCTTAAAGAGGCGGGAGCACTT
             | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Galalin TV2 TCTTAAAGAGGCGGGAGCACTT

```

**Abb. 5-10:** Sequenzvergleich der klonierten PCR-Produkte für Galanin des Huhns (*Gallus gallus*)

Die spezifischen Primerpaare wurden eingesetzt, um eine quantitative Relation zwischen den beiden Galanin-Varianten zu ermöglichen. Zudem wurden auf diesem Wege beide Transkriptvarianten unabhängig voneinander in unterschiedlichen Geweben darstellbar.

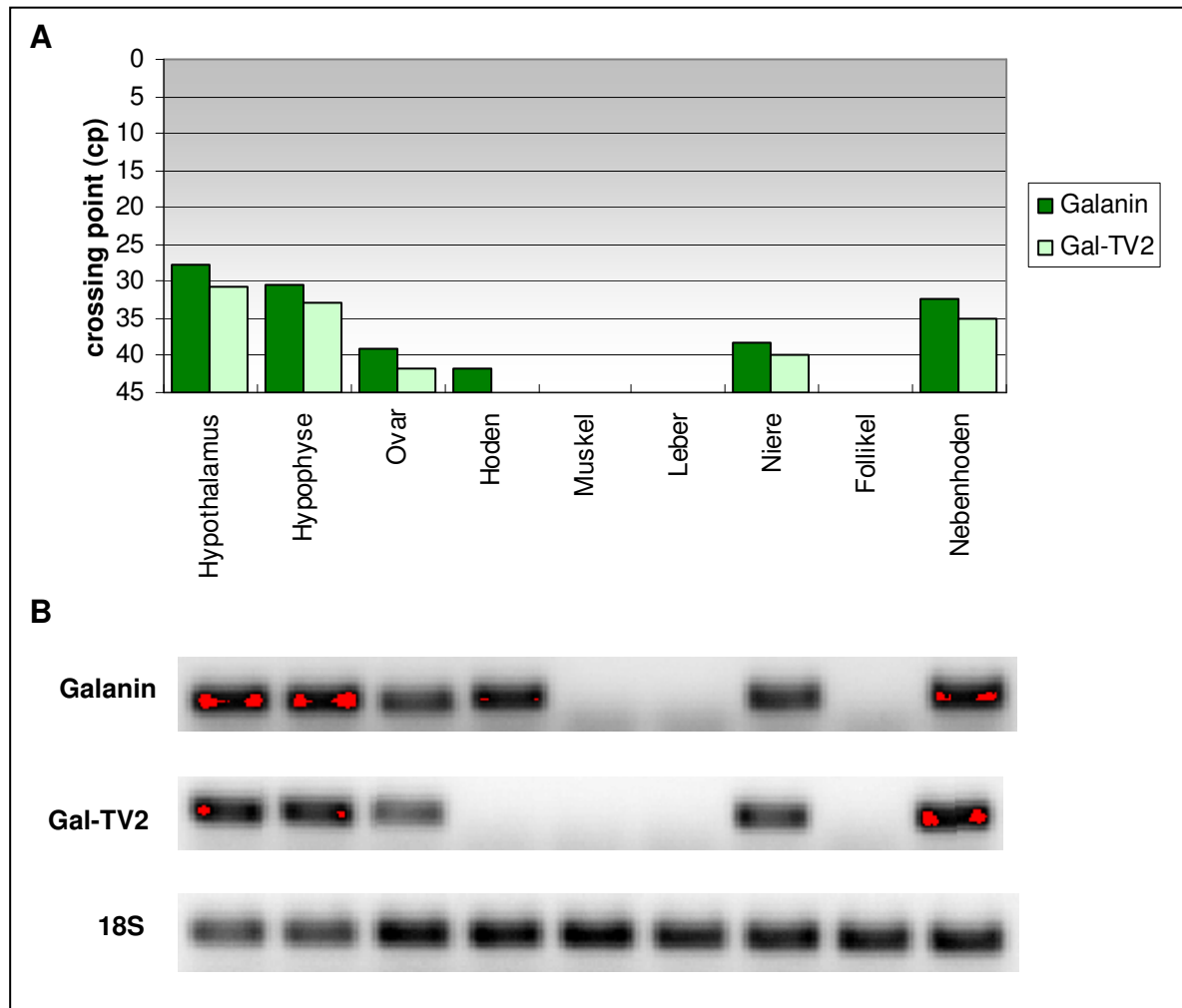
#### 5.4.3.1 Einzelnachweis von Galanin- und Gal-TV2-mRNA in unterschiedlichen Geweben

Galanin und Gal-TV2 wurden, wie zuvor die Galanin-Rezeptoren in Hypothalamus, Hypophyse, Ovar (je drei Follikel aller drei Reifestadien), Muskel, Leber, Niere und Follikel (Tertiär-) vom weiblichen Tier, Hoden und Nebenhoden vom männlichen Tier mittels *realtime* PCR nachgewiesen. Als Referenzgen dient 18S rRNA. Die PCR endete bei Zyklus 45, der in diesem Fall den geringsten detektierbaren mRNA-Gehalt beschreibt. Ist bis Zyklus 45 kein exponentieller Anstieg der nachzuweisenden mRNA erfolgt, gilt diese als nicht vorhanden (Abb. 5-11).

Beide Transkriptvarianten sind in Hypothalamus, Hypophyse, Ovar, Niere und Nebenhoden nachweisbar, fehlen hingegen in Muskel, Leber und Follikel. Im Hoden kann ausschließlich Galanin, nicht aber Gal-TV2 nachgewiesen werden (A). Beide Transkripte kommen im Hypothalamus im Vergleich zu den anderen Geweben am häufigsten vor (Galanin: Zyklus 27,8; Gal-TV2: Zyklus 30,6). Während die geringste Menge TV2-mRNA im Ovar gemessen wurde (Zyklus 41,8), findet man die geringste Galanin-mRNA Menge im Hoden (Zyklus 41,7) (A). Generell kommt Gal-TV2-mRNA seltener vor im Vergleich zu Galanin-mRNA im selben Gewebe: Die Differenz beträgt zwischen 1,5 bis 2,8 Zyklen. Geht man von einer idealen Effizienz pro Zyklus aus ( $E=2$ ), was eine Verdopplung der cDNA Menge entspräche, wäre eine etwa 3 bis 14fach geringere Menge Gal-TV2-mRNA im Vergleich zu Galanin-mRNA im Gewebe vorhanden.

Der Nachweis der klonierten PCR-Fragmente nach elektrophoretischer Auftrennung bestätigt das Vorkommen der Galanin-mRNA in Hypothalamus, Hypophyse, Ovar, Hoden, Niere und Nebenhoden (B). Gal-TV2 kann ebenfalls in Hypothalamus, Hypophyse, Ovar, Niere und Nebenhoden, nicht aber im Hoden nachgewiesen werden. Beide Transkriptvarianten fehlen in Muskel, Leber und Follikel. Auch hier wurde 18S rRNA als Referenzgen dargestellt (B).

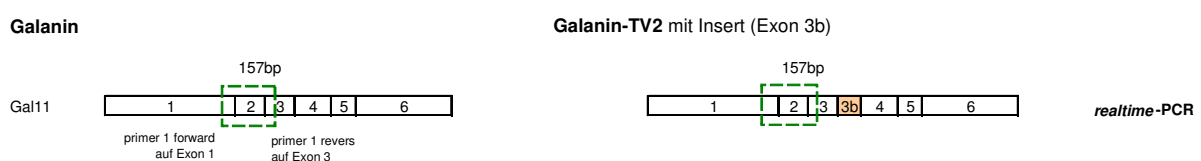




**Abb. 5-11:** Darstellung der mRNA-Expression für Galanin und Gal-TV2 des Huhns (*Gallus gallus*) in unterschiedlichen Geweben, normalisiert auf 18S. **A** quantitative Darstellung anhand der *crossing points* **B** gelelektrophoretischer Nachweis.

### 5.4.3.2 Einfluss der Dehydrierung auf Galanin- und Gal-TV2-mRNA im Hypothalamus

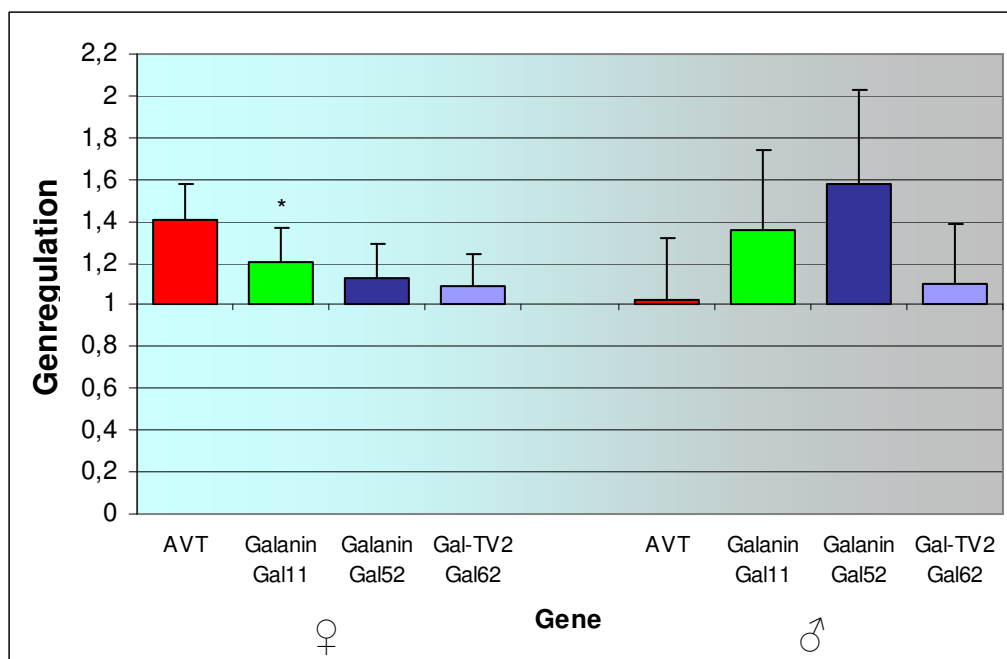
Unter Punkt 5.2.1 wurde bereits der Einfluss der Dehydrierung auf AVT-, Galanin-, GalR1- und GalR2-mRNA dargestellt. Bei Galanin handelte es sich um das Primerpaar Gal11, das ähnlich Gal12 beide Transkriptvarianten kloniert, ohne jedoch die zusätzliche Insert-Sequenz des Gal-TV2 zu amplifizieren, da das Primerpaar nur auf Exon 1 (Primer Gal 1 *forward*) und Exon 2 (Primer Gal 1 *reverse*) liegt (Abb. 5-12).



**Abb. 5-12:** Schematische Darstellung der Lage des klonierten PCR-Fragments G11 in beiden Galanin-Transkriptvarianten

Um die Auswirkungen einer Dehydrierung auf Galanin- und Gal-TV2-mRNA unabhängig voneinander nachzuweisen, wurde eine *realtime* PCR unter Verwendung der spezifischen Primerpaare Gal52 (Galanin) und Gal62 (Gal-TV2) durchgeführt. Gleichzeitig wurden die unter Punkt 5.2.1.1 bereits gezeigten Zielgene nachgewiesen. Als Referenzgene dienten  $\beta$ -Actin und TBP in weiblichen und in männlichen Hypothalami.

Die beiden Galanin-Transkriptvarianten werden hier im Vergleich zu AVT-mRNA und gesamt-Galanin-mRNA (Gal11) dargestellt (Abb. 5-13). Weder bei Hennen noch bei Hähnen können signifikante Änderungen in einer der beiden Galanin-Transkriptvarianten nachgewiesen werden. Während sich Gesamt-Galanin-mRNA im weiblichen Hypothalamus nach 48 Stunden Dehydrierung signifikant ( $p < 0,05$ ) um 20% erhöht, bleiben Galanin (G52) mit 12% und GalTV2 (G62) mit 9% deutlich zurück ( $p > 0,05$ ). Die Abweichungen sind für beide Varianten sehr hoch, zudem befindet sich Gal-TV2 mit unter 10% im Bereich des methodischen Fehlers. Bei Hähnen wird weder für die beiden Transkriptvarianten noch für Gesamt-Galanin mRNA eine signifikante Genregulation nachgewiesen ( $p > 0,05$ ). Hierbei beträgt die gemittelte Regulation des Gesamt-Galanin (G11) 35% und die des Galanin (G52) 58% ( $p > 0,05$ ). Die zweite Transkriptvariante Gal-TV2 (G62) liegt mit gerade noch 10% Anstieg der mRNA Menge im Bereich des methodischen Fehlers ( $p > 0,05$ ).



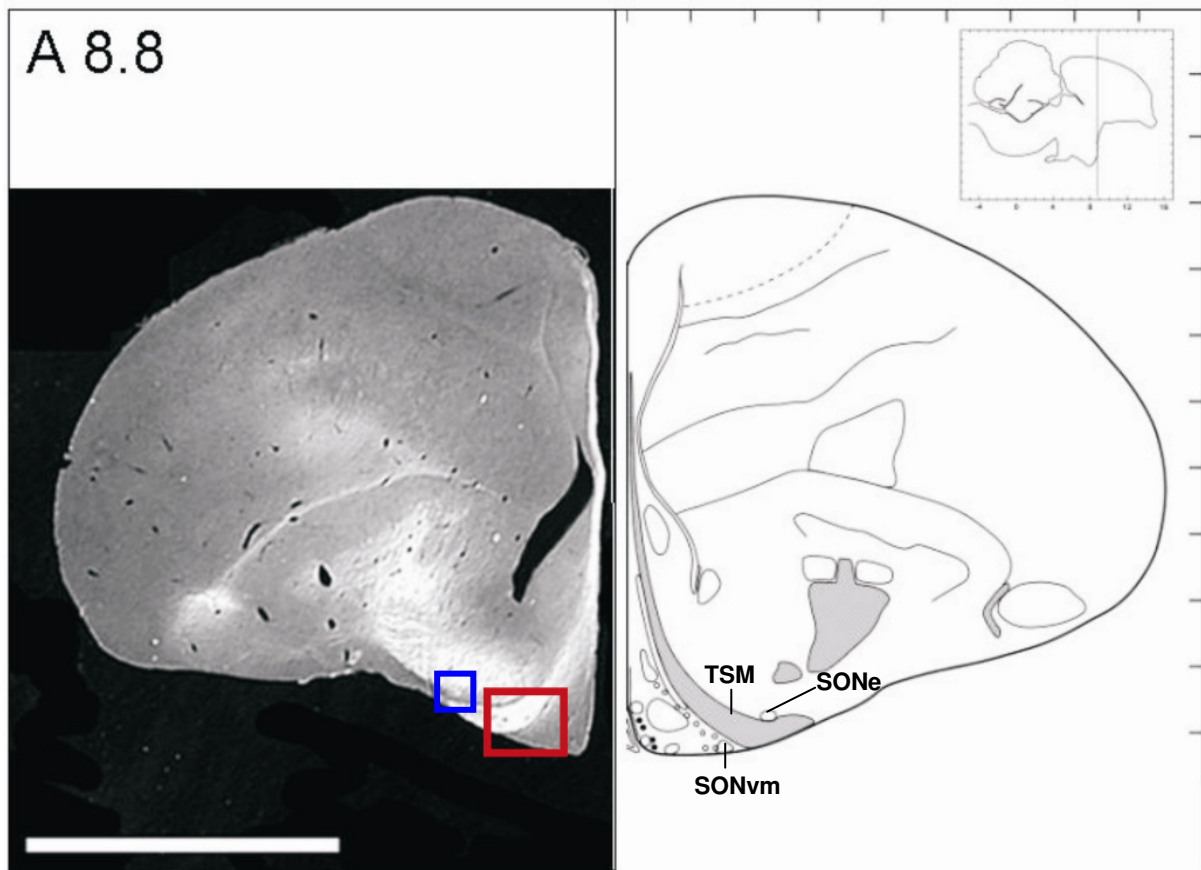
**Abb. 5-13:** Darstellung der Genregulation nach Dehydrierung für AVT, Gesamt-Galanin (G11) und dessen beiden Transkriptvarianten: Galanin (G52) und Gal-TV2 (G62) im weiblichen und männlichen Hypothalamus des Huhns (\* $p < 0,05$ ). Normalisierung auf Referenzgene:  $\beta$ -Actin, TBP (Hennen) bzw.  $\beta$ -Actin, RPII (Hähne).

## **5.5 Nachweis von AVT- und Galanin-immunoreaktiven Neuronen im SON**

### **5.5.1 Verteilung**

Wie bei den meisten der hypothalamischen Kerngebiete handelt es sich bei dem Nucleus Supraopticus (SON) um ein bilaterales Kerngebiet, das sich beidseitig des dritten Ventrikels in der ventrolateralen Zone des Hypothalamus befindet. Der SON des Huhns erstreckt sich über eine Distanz (roostro-caudal) von etwa 1,2 mm beginnend ventral des Tractus septomesencephalicus (TSM). Zur leichteren Orientierung und höheren Vergleichbarkeit wurde der SON in fünf morphologisch unterscheidbaren Regionen unterteilt, die angegebenen Distanzen sind als Näherungswerte zu verstehen.

Der Beginn des SON wurde als Region ventral des TSM, in der zum ersten Mal  $10 \pm 3$  AVT-immunoreaktive (AVT-ir), magnozelluläre Neurone auftreten, definiert. Während der folgenden 200 $\mu$ m (Region: SON1) nimmt die Zahl der magnozellulären Neurone ventromedial des TSM zu. Zudem wird ein schmales Band AVT-haltiger MCN ventral des TSM entlang des Zwischenhirnbodens sichtbar. Die Region SON2 beschreibt den Abschnitt 200 $\mu$ m bis 400 $\mu$ m nach Beginn des SON. Hier hat der TSM endgültig den Zwischenhirnboden erreicht und das ventrale Band der MCN verdrängt. Der dorsomediale Teil des TSM zieht sich nun langsam von der Wand des dritten Ventrikels zurück. Am lateralen Ende des TSM bildet sich eine kleine Gruppe AVT haltiger MCN, der sogenannte SON externalis (SONe) (s. Abb. 5-14). Die Zahl der MCNs ventromedial des TSM nimmt weiter zu, damit auch die Ausdehnung des SON in dorsaler und medialer (dem dritten Ventrikel zugewandter) Richtung. Im Verlauf der nachfolgenden 400 $\mu$ m (Region: SON2-3) wandert der TSM weiter in lateraler Richtung entlang des Zwischenhirnbodens. Der SON erstreckt sich nun als breites, dicht gepacktes Band magnozellulärer Neurone ausgehend vom TSM in Richtung drittem Ventrikel, bis zum beginnenden Suprachiasmatischen Nucleus. Die im Verlauf des SON letzte morphologisch charakteristische Region wird hier als SON3 bezeichnet. In den 800 $\mu$ m bis 1200 $\mu$ m nach Beginn des SON tritt das optische Chiasma am ventralen Zwischenhirnboden auf. Das breite Band der MCN zieht nach lateral zurück, eine deutliche Abgrenzung zwischen SON und SCN wird sichtbar. Der SON erreicht seine dorsoventral breiteste Ausdehnung direkt am TSM, bevor er über deutliche Abnahme der Neuronenzahl schließlich endet. Hierbei wird die Ausdehnung des Kerngebietes stetig verringert. Der SONe erstreckt sich von etwa 350 $\mu$ m bis 950 $\mu$ m nach Beginn des SON. Zur Auswertung wurde der SONe auf Höhe des SON 2-3 ausgewählt.

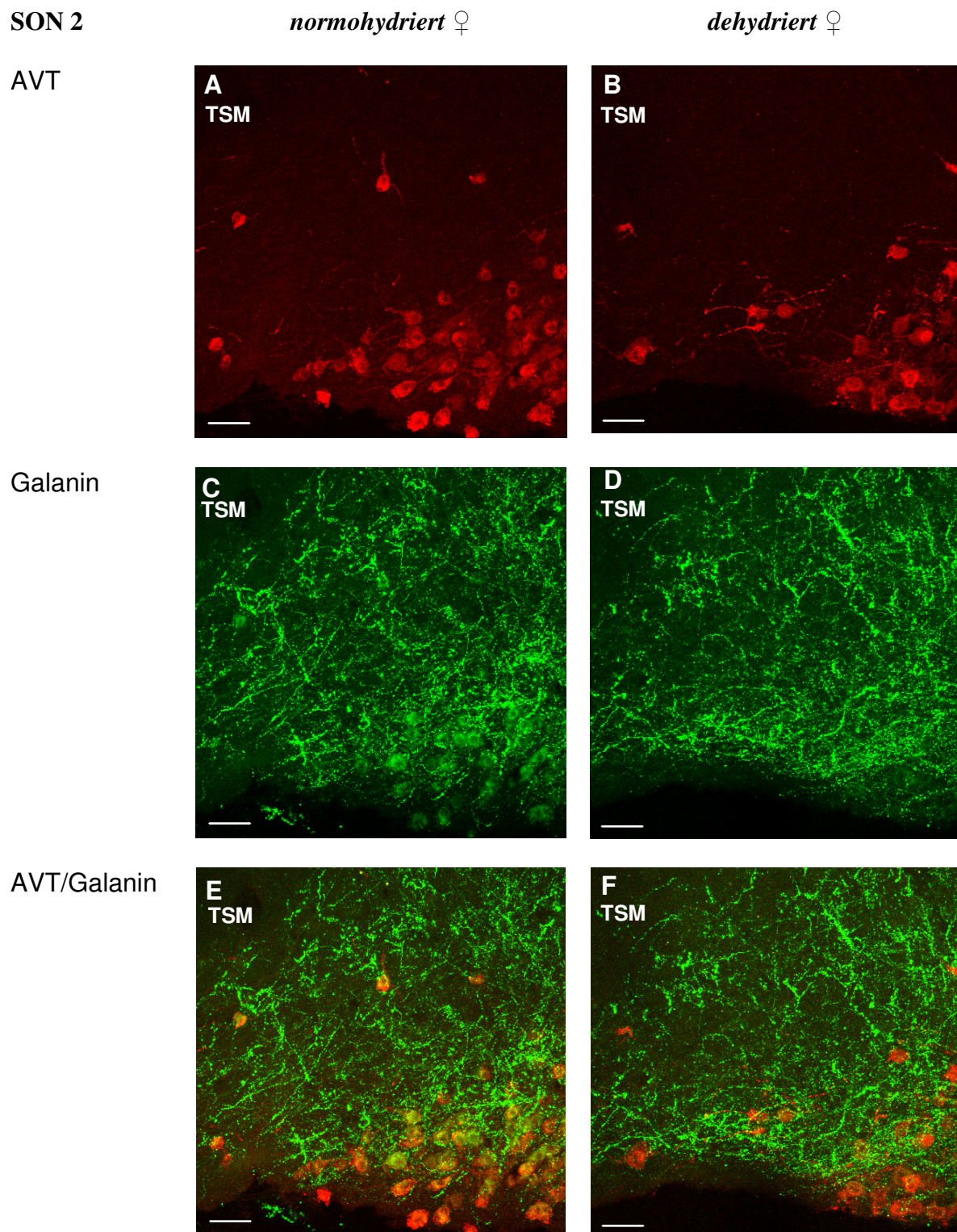


**Abb. 5-14:** Differenzieller Interferenz Kontrast (DIC) und schematische Darstellung eines coronalen Schnittes modifiziert nach KUENZEL und MASSON (1988). Der Ausschnitt rechts oben stellt die Schnittebene innerhalb des Hühnergehirns in Sietenansicht dar. Der rote Rahmen markiert den zentrierten Aufnahmebereich des SONvm, der blaue Rahmen den des SONE. Maßstab = 1 cm; TSM: Tractus Septomesencephalicus, SONvm: Nucleus Supraoptic pars ventralis, SONE: Nucleus Supraopticus pars externalis.

### 5.5.2 Vergleich der Peptidverteilung im SON zwischen normo- und dehydrierten Hennen

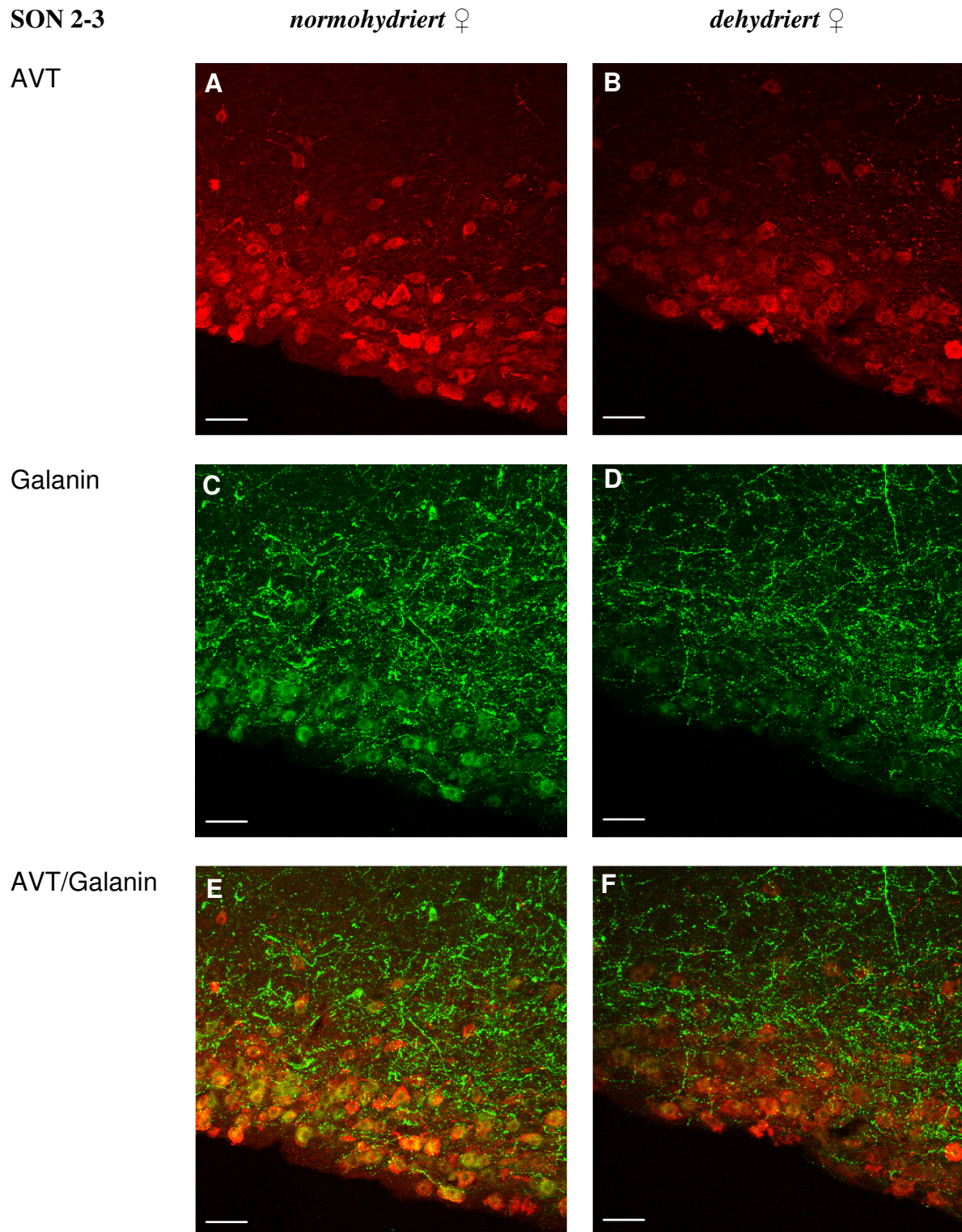
Die nachfolgenden Aufnahmen (s. Abb. 5-15 bis 5-18) zeigen exemplarisch die Peptidverteilung für AVT und Galanin in einzelnen Regionen des SON (SON2, SON2-3, SON3 und SONE) normohydrierter Hennen (A, C, E) im Vergleich zu dehydrierten Hennen (B, D, F). Jedes Peptid ist dabei zunächst einzeln dargestellt: rot gefärbte AVT-ir Neurone und Nervenfasern (A, B), grün gefärbte Galanin-ir Neurone und Nervenfasern (C, D). Abbildungen E und F zeigen die Kombination beider Aufnahmekanäle: Man sieht sowohl rote AVT-ir Neurone als auch grüne Galanin-ir Neurone bzw. gelb erscheinende Neurone, die beide Peptide beinhalten (Kokalisation). Unterschiede in der Peptidverteilung sind zum einen in Anzahl der Zellen, zum anderen in der Intensität der Färbung erkennbar. Je intensiver rot bzw. grün eine Zelle erscheint, desto mehr Peptid ist vorhanden. Die Auswertung des Experimentes erfolgte jedoch nicht allein nach optischen Maßstäben, sondern wurde

hauptsächlich durch Intensitätsmessungen und Zellzählungen, sowie deren statistische Auswertung gesichert.

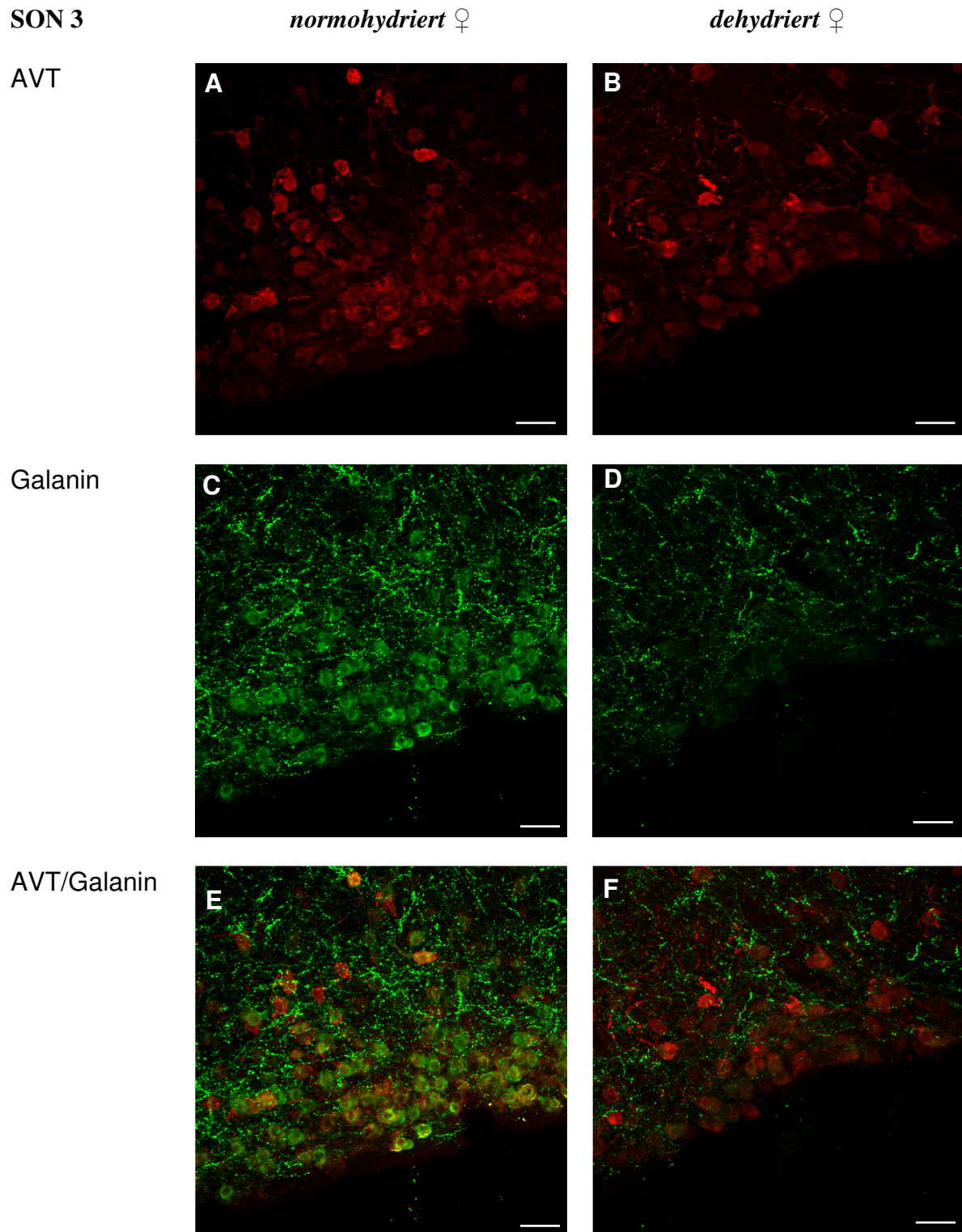


**Abb. 5-15:** Darstellung AVT- und Galanin-immunoreaktiver Neurone im SON 2 normo- (**A, C, E**) und dehydrierter (**B, D, F**) Hennen: **A, B** AVT-ir Neurone und Fasern; **C, D** Galanin-ir Neurone und Fasern; **E, F** Kolokalisation beider Peptide. Maßstab entspricht 50µm; TSM = Tractus septomesencephalicus.



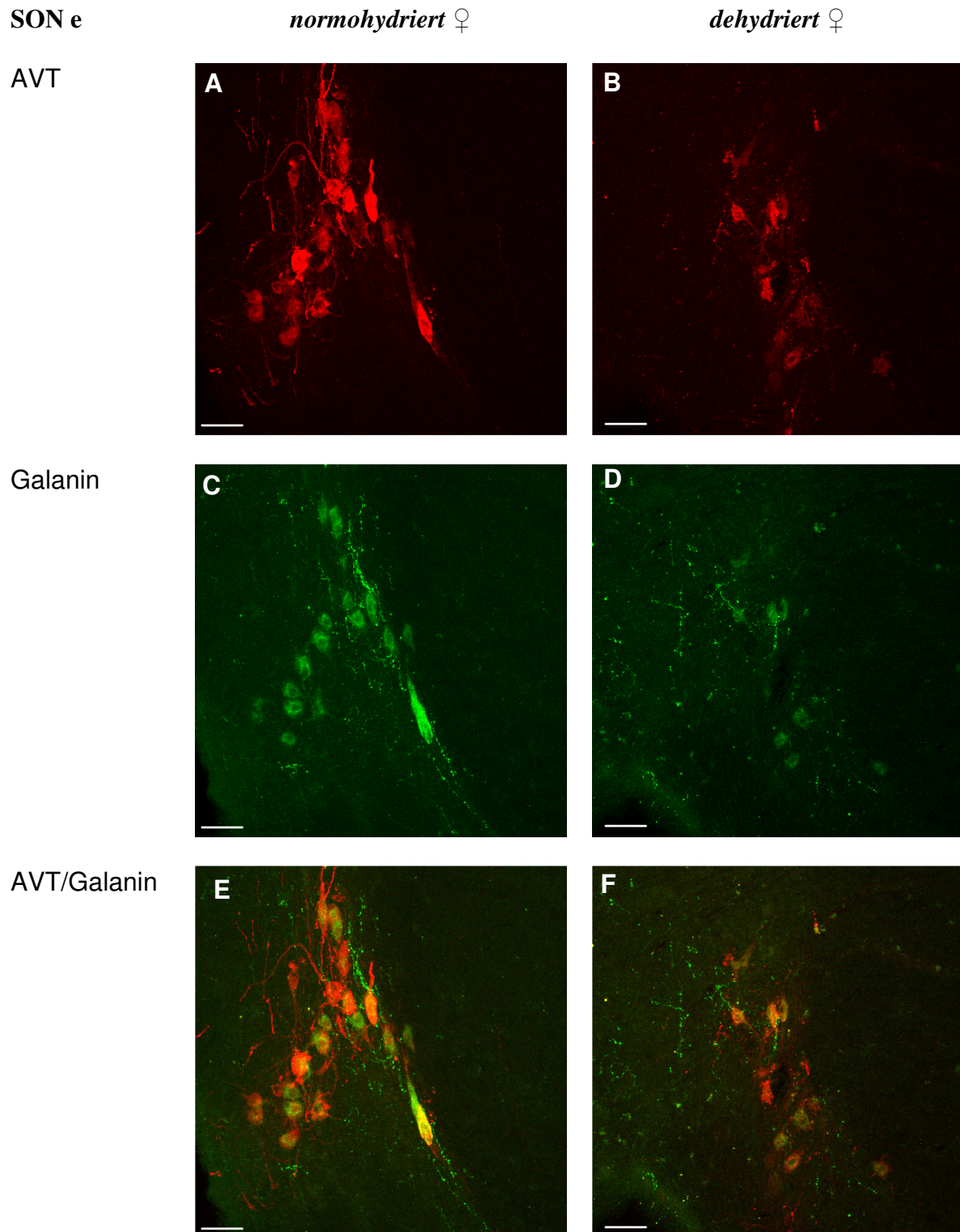


**Abb. 5-16:** Darstellung AVT- und Galanin-immunoreaktiver Neurone im SON 2-3 normo- (A, C, E) und dehydrierter (B, D, F) Hennen; A, B AVT-ir Neurone und Fasern; C, D Galanin-ir Neurone und Fasern; E, F Kolokalisation beider Peptide. Maßstab entspricht 50µm.



**Abb. 5-17:** Darstellung AVT- und Galanin-immunoreaktiver Neurone im SON 3 normo- (A, C, E) und dehydrierter (B, D, F) Hennen; A, B AVT-ir Neurone und Fasern; C, D Galanin-ir Neurone und Fasern; E, F Kolokalisation beider Peptide. Maßstab entspricht 50µm.





**Abb. 5-18:** Darstellung AVT- und Galanin-immunoreaktiver Neurone im SONE normo- (A, C, E) und dehydrierter (B, D, F) Hennen: A, B AVT-ir Neurone und Fasern ; C, D Galanin-ir Neurone und Fasern; E, F Kolokalisation beider Peptide. Maßstab entspricht 50µm.

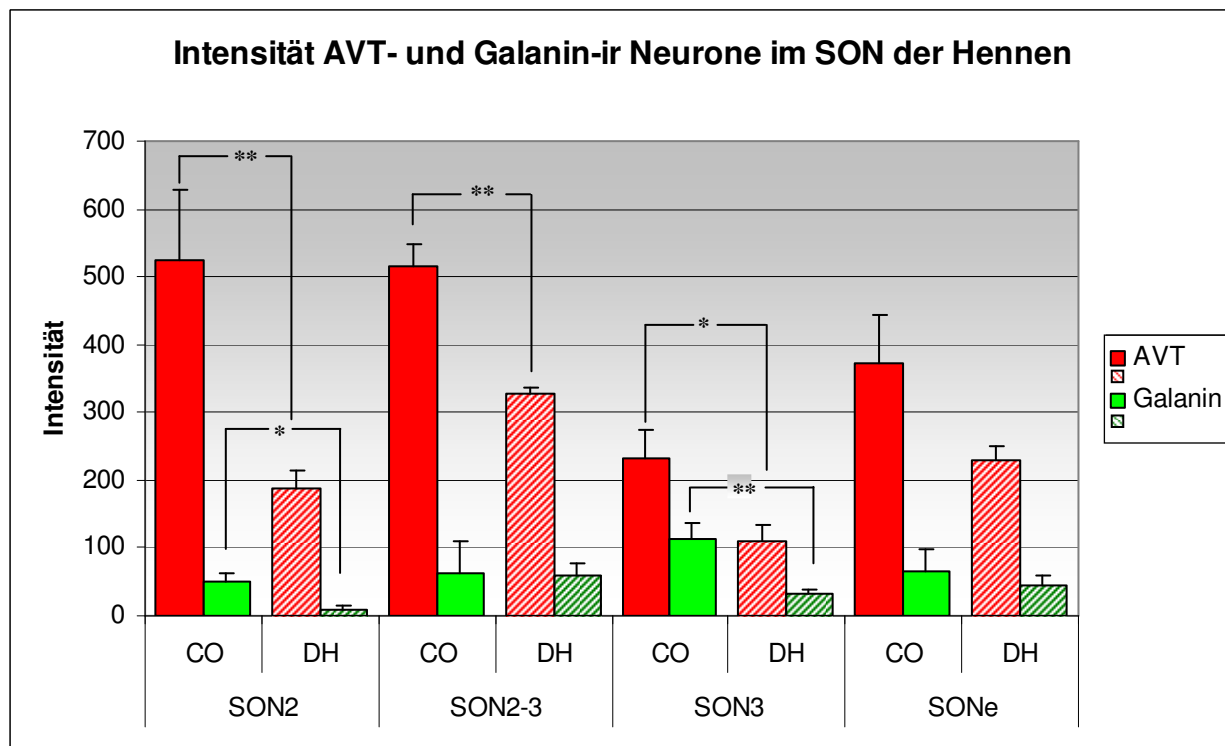


### **Intensitätsmessung und Zellzählung – Statistische Auswertung**

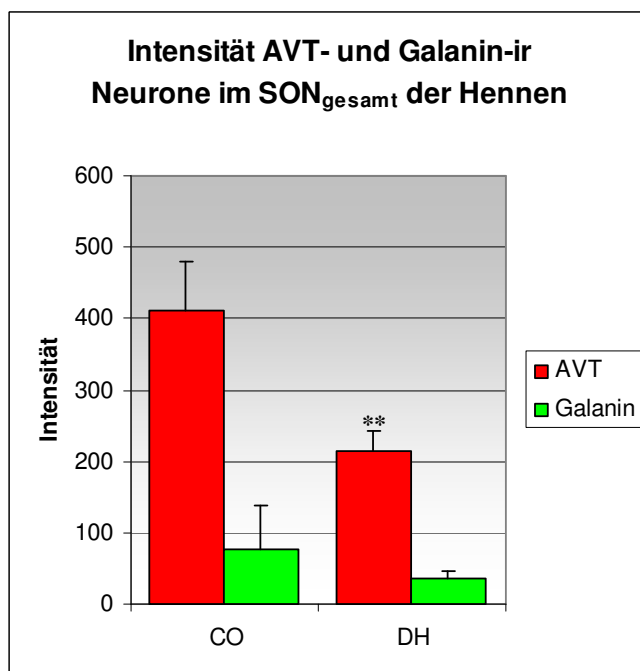
Die mittlere Intensität AVT-ir Neurone im **SON2** ist bei dehydrierten Hennen um 64% ( $p=0,007$ ) geringer im Vergleich zu normohydrierten Hennen (s. Abb. 5-19). Auch die Galanin-ir ist in dieser Region bei dehydrierten Hennen um 85% ( $p=0,015$ ) geringer als in normohydrierten Hennen. Im **SON2-3** weisen dehydrierte Hennen eine um etwa 37% ( $p=0,002$ ) signifikant geringere AVT-ir auf verglichen mit normohydrierten Hennen. Die Galanin-ir dehydrierter Hennen ist in diesem Bereich auf etwa dem gleichen Niveau (lediglich um etwa 5% geringer,  $p=0,8$ ). Im **SON3** zeigen dehydrierte Hennen verglichen mit normohydrierten Hennen sowohl für AVT-ir (47%) als auch für Galanin-ir (27%) Neurone eine signifikant geringere Intensität. Vergleicht man AVT-ir bzw. Galanin-ir Neurone im **SONe** normohydrierter und dehydrierter Hennen fällt auf, dass auch hier normohydrierte Hennen sowohl für AVT als auch für Galanin eine höhere mittlere Intensität aufweisen als dehydrierte Hennen. Der Unterschied zwischen den Versuchsgruppen ist aufgrund individueller Schwankungen weder für AVT (38% Differenz) noch für Galanin (32% Differenz) signifikant.

In der Gesamtheit bedeutet das für den SON ( $SON_{gesamt}$ ): Dehydrierte Hennen zeigen sowohl in AVT-ir Neuronen (52%;  $p=0,054$ ), als auch in Galanin-ir Neuronen (49%;  $p=0,083$ ) eine geringere Intensität im Vergleich zu normohydrierten Hennen. (s. Abb.5-20).

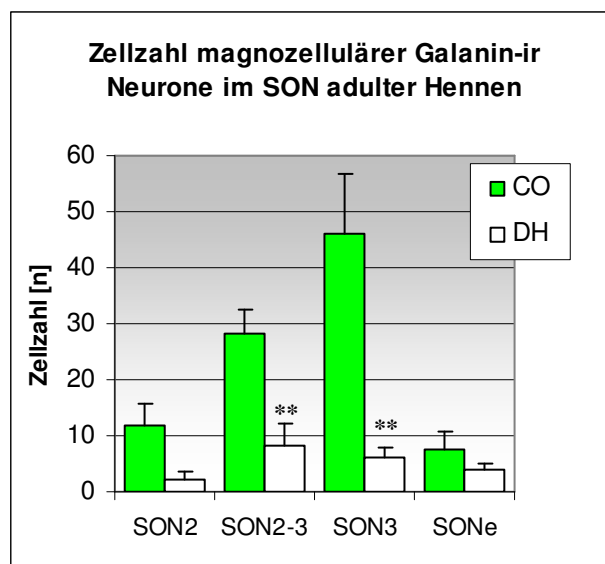
Ein Unterschied zwischen normohydrierten und dehydrierten Hennen zeigt sich auch in der Zahl positiv bewerteter ( $3\times HG$ ) Galanin-ir Neurone (s. Abb. 5-21). Normohydrierte Hennen weisen im SON3 die größte gemittelte Anzahl Galanin-ir Neurone (46) auf, gefolgt von SON2-3 (28), SON2 (12) und SONe (8). Die maximale gemittelte Anzahl Galanin-ir Neurone im SON dehydrierter Hennen findet man im SON2-3 (8), gefolgt von SON3 (6), SONe (4) und SON2 (2).



**Abb. 5-19:** Intensitätsvergleich für AVT und Galanin in magnozellularen Neuronen des SON2, SON2-3, SON3 und SONe normohydrierter (CO) und dehydrierter (DH) Hennen. (\*\* $p \leq 0,01$ , \* $p \leq 0,05$ )



**Abb. 5-20:** Gemittelter Intensitätsvergleich für AVT und Galanin in magnozellularen Neuronen des SON<sub>gesamt</sub> normohydrierter (CO) und dehydrierter (DH) Hennen. (\*\* $p \leq 0,01$ )



**Abb. 5-21:** Vergleich der absoluten Zellzahl Galanin-ir magnozellularer Neurone im SON2, SON2-3, SON3 und SONe normohydrierter (CO) und dehydrierter (DH) Hennen. (\*\* $p \leq 0,008$ )

Betrachtet man die einzelnen Bereiche des SON normohydrierter Hennen stellt man Unterschiede in den gemittelten Intensitäten AVT-ir Neurone fest. Die Intensität AVT-ir Neurone befindet sich in den Bereichen SON2 und SON2-3 auf etwa dem gleichen Niveau. In SON3 jedoch ist die gemittelte Intensität AVT-ir Neurone um etwa 55% geringer verglichen mit den beiden vorherigen Bereichen. Es ist gleichzeitig der Bereich mit der geringsten gemittelten Intensität AVT-ir Neurone und unterscheidet sich signifikant ( $p \leq 0,02$ ) von den Bereichen SON2 und SON2-3 (s. Tab. 5-2). Im SONE ist die gemittelte Intensität AVT-ir Neurone um etwa 29% ( $p > 0,05$ ) geringer im Vergleich zu den Bereichen SON2 und SON 2-3, aber um etwa 60% ( $p > 0,05$ ) höher im Vergleich zu SON3.

Auch dehydrierte Hennen weisen Unterschiede in den gemittelten Intensitäten AVT-ir Neurone zwischen den einzelnen Bereichen des SON auf. Hier ist die gemittelte Intensität im SON2-3 um etwa 74% höher verglichen mit dem SON2. Der SON3 ist bei dehydrierten Hennen ebenso wie bei normohydrierten Hennen der Bereich mit der geringsten Intensität AVT-ir Neurone. Er unterscheidet sich signifikant um etwa 66% ( $p < 0,001$ ) vom SON2-3 (s. Tab 5-2). Im SONE beträgt die Intensität AVT-ir Neurone verglichen mit dem SON2 etwa 44%.

AVT	CO			DH			
	Vergleich der Regionen	Differenz der Mittelwerte	p-Wert	Signifikanz	Differenz der Mittelwerte	p-Wert	Signifikanz
	SON2 vs. SON2-3	9,8	1	n.s.	138,6	0,108	n.s.
	SON2 vs. SON3	294,0	0,018	*	77,1	0,577	n.s.
	SON2 vs. SONE	153,3	0,394	n.s.	41,9	0,898	n.s.
	SON2-3 vs. SON3	284,2	0,002	**	215,6	<0,001	***
	SON2-3 vs. SONE	143,4	0,243	n.s.	96,7	0,182	n.s.
	SON3 vs. SONE	140,7	0,258	n.s.	119,0	0,067	n.s.

**Tab. 5-2:** Vergleich der Intensität AVT-ir Neurone zwischen einzelnen Bereichen des SON normo- (CO) und dehydrierter (DH) Hennen. (n=3 Tiere pro Versuchsgruppe)

Weder normo- noch dehydrierte Hennen zeigen im Vergleich der einzelnen Bereichen des SON signifikante Unterschiede in der gemittelten Intensität Galanin-ir Neurone (s. Tab 5-3).

Galanin	CO			DH			
	Vergleich der Regionen	Differenz der Mittelwerte	p-Wert	Signifikanz	Differenz der Mittelwerte	p-Wert	Signifikanz
	SON2 vs. SON2-3	13,7	>0,05	n.s.	52,6	>0,05	n.s.
	SON2 vs. SON3	63,7	>0,05	n.s.	24,1	>0,05	n.s.
	SON2 vs. SONE	16,5	>0,05	n.s.	36,9	>0,05	n.s.
	SON2-3 vs. SON3	50,0	>0,05	n.s.	28,5	>0,05	n.s.
	SON2-3 vs. SONE	2,8	>0,05	n.s.	15,7	>0,05	n.s.
	SON3 vs. SONE	47,2	>0,05	n.s.	12,8	>0,05	n.s.

**Tab. 5-3:** Vergleich der Intensität Galanin-ir Neurone zwischen einzelnen Bereichen des SON normo- (CO) und dehydrierter (DH) Hennen. (n=3 Tiere pro Versuchsgruppe)

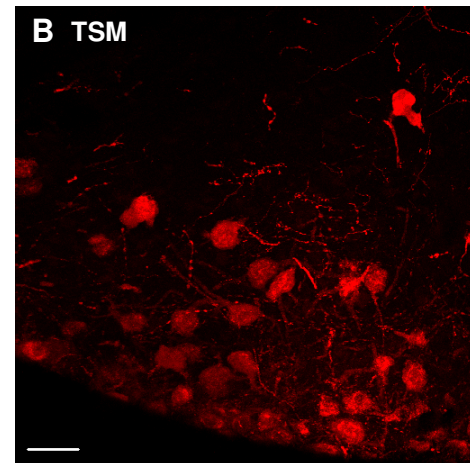
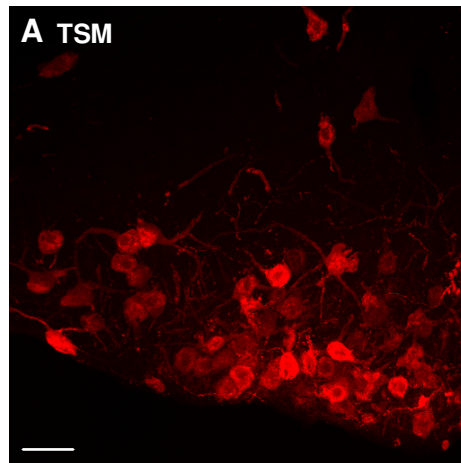
### 5.5.3 Vergleich der Peptidverteilung zwischen normo- und dehydrierten Hähnen

Die Darstellung der nachfolgenden Aufnahmen (s. Abb. 5-22 bis 5-25) entspricht im Wesentlichen der vorangegangener Abbildungen (Kap. 5.4.1.3). Auch hier handelt es sich um exemplarische Aufnahmen aus beiden Versuchsgruppen.

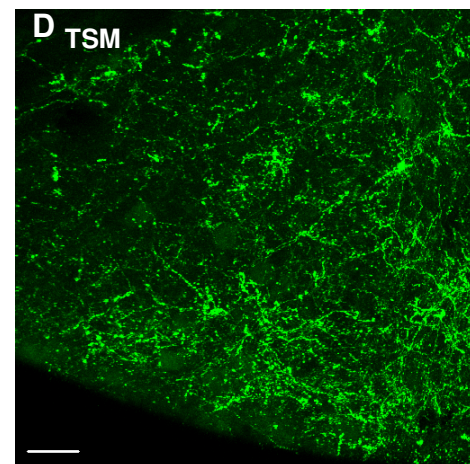
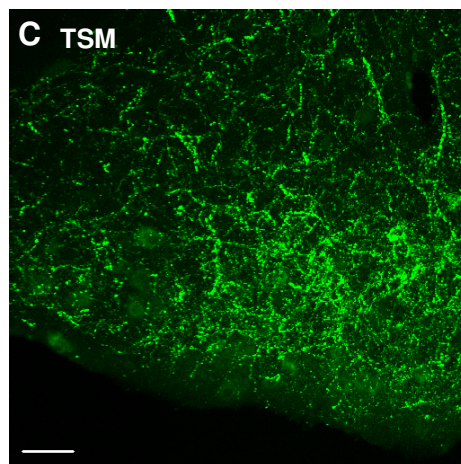
SON 2

*normohydriert* ♂*dehydriert* ♂

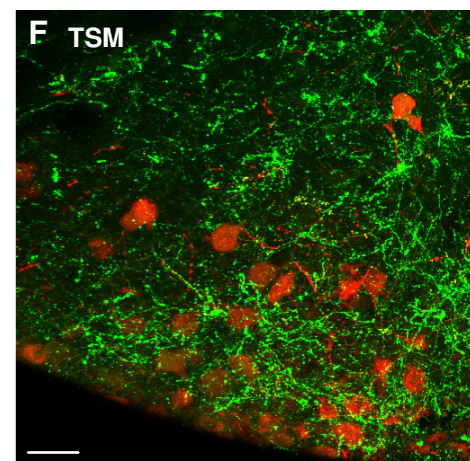
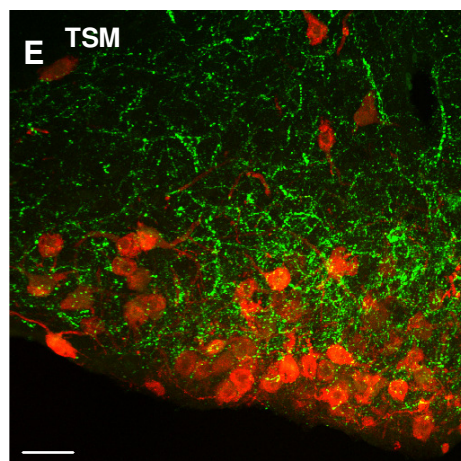
AVT



Galanin

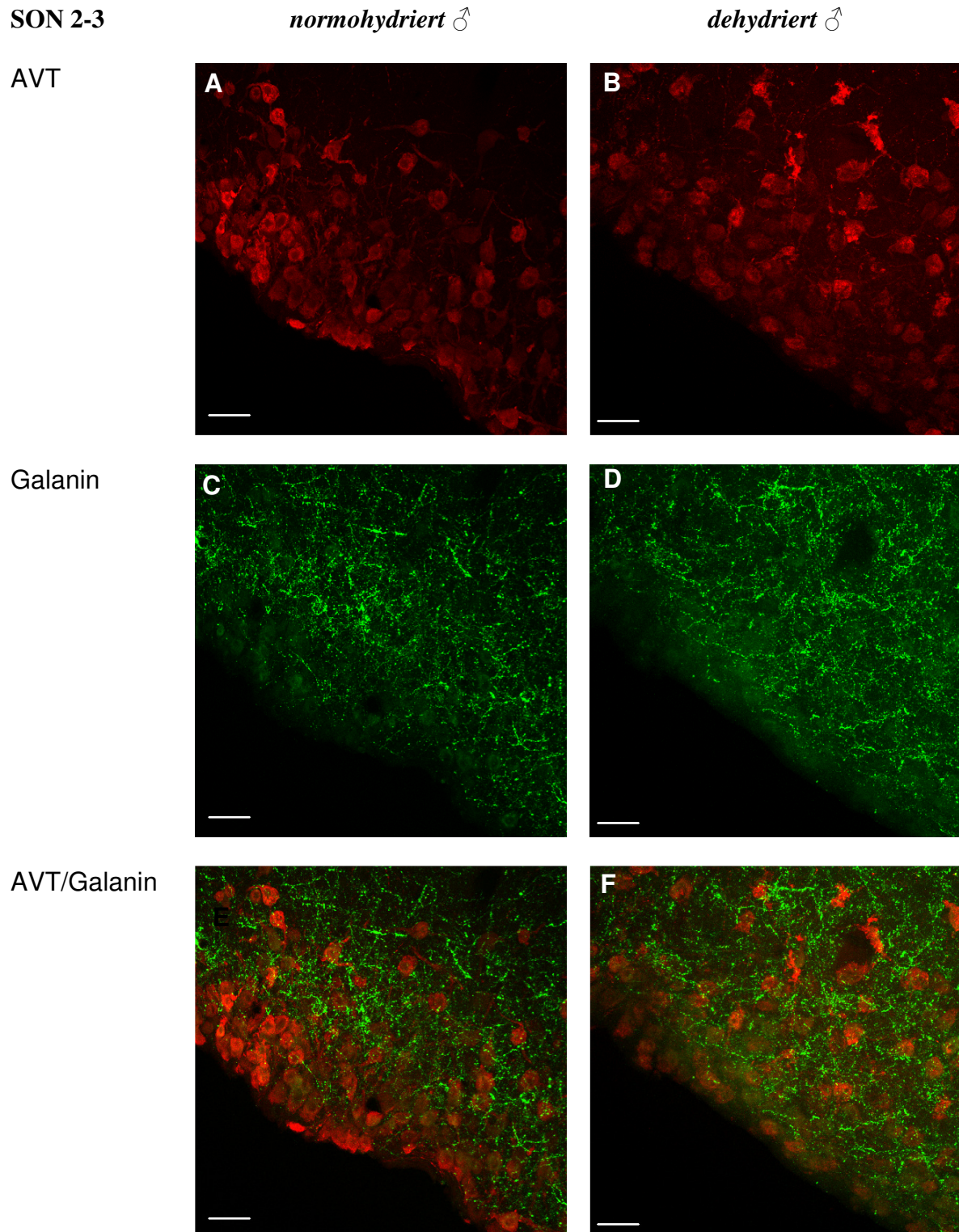


AVT/Galanin

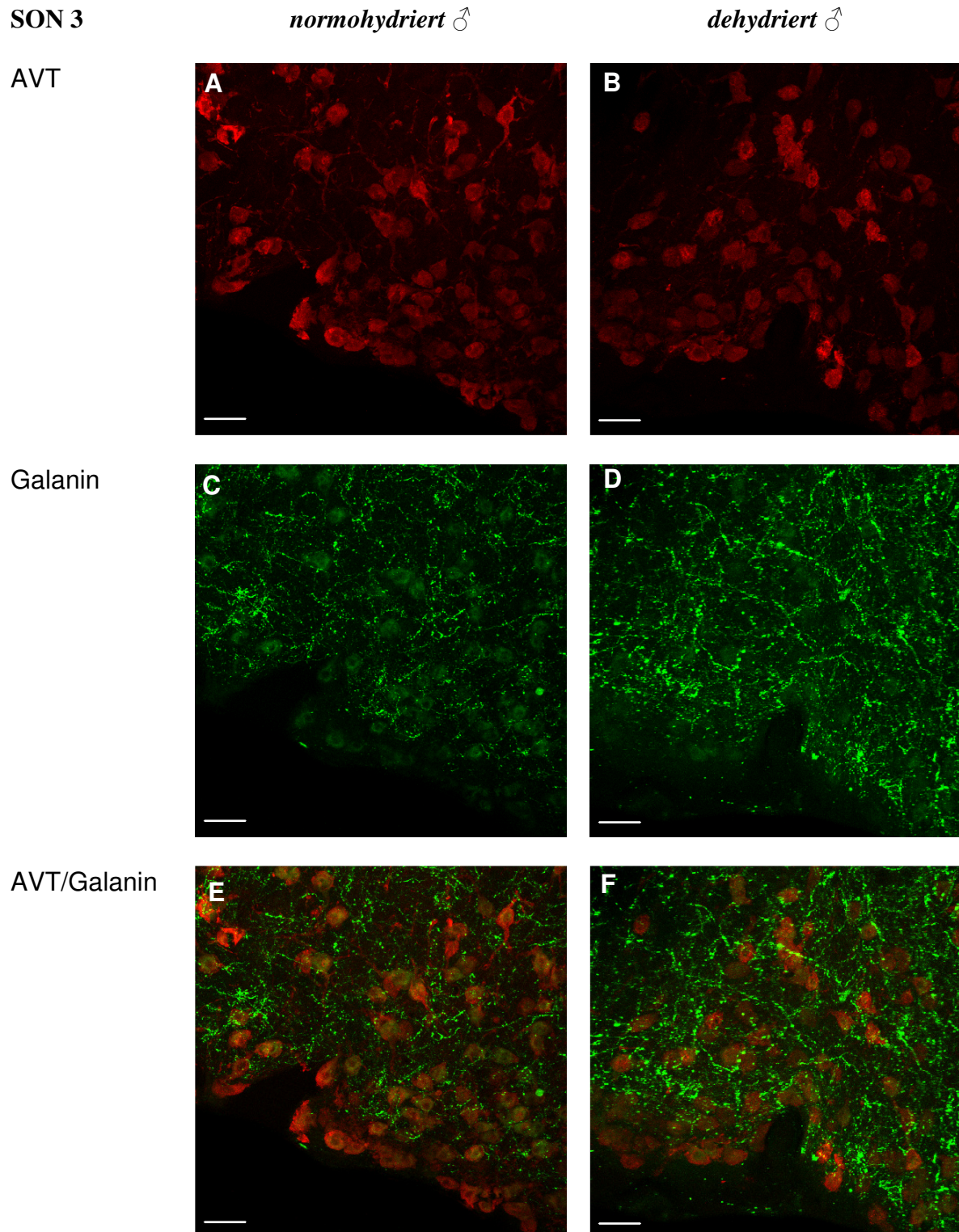


**Abb. 5-22:** Darstellung AVT- und Galanin-immunoreaktiver Neurone im SON 2 normo- (A, C, E) und dehydrierter (B, D, F) Hähne; A, B AVT-ir Neurone und Fasern; C, D Galanin-ir Neurone und Fasern; E, F Kolokalisation beider Peptide. Maßstab entspricht 50µm; TSM = Tractus septomesencephalicus. 98



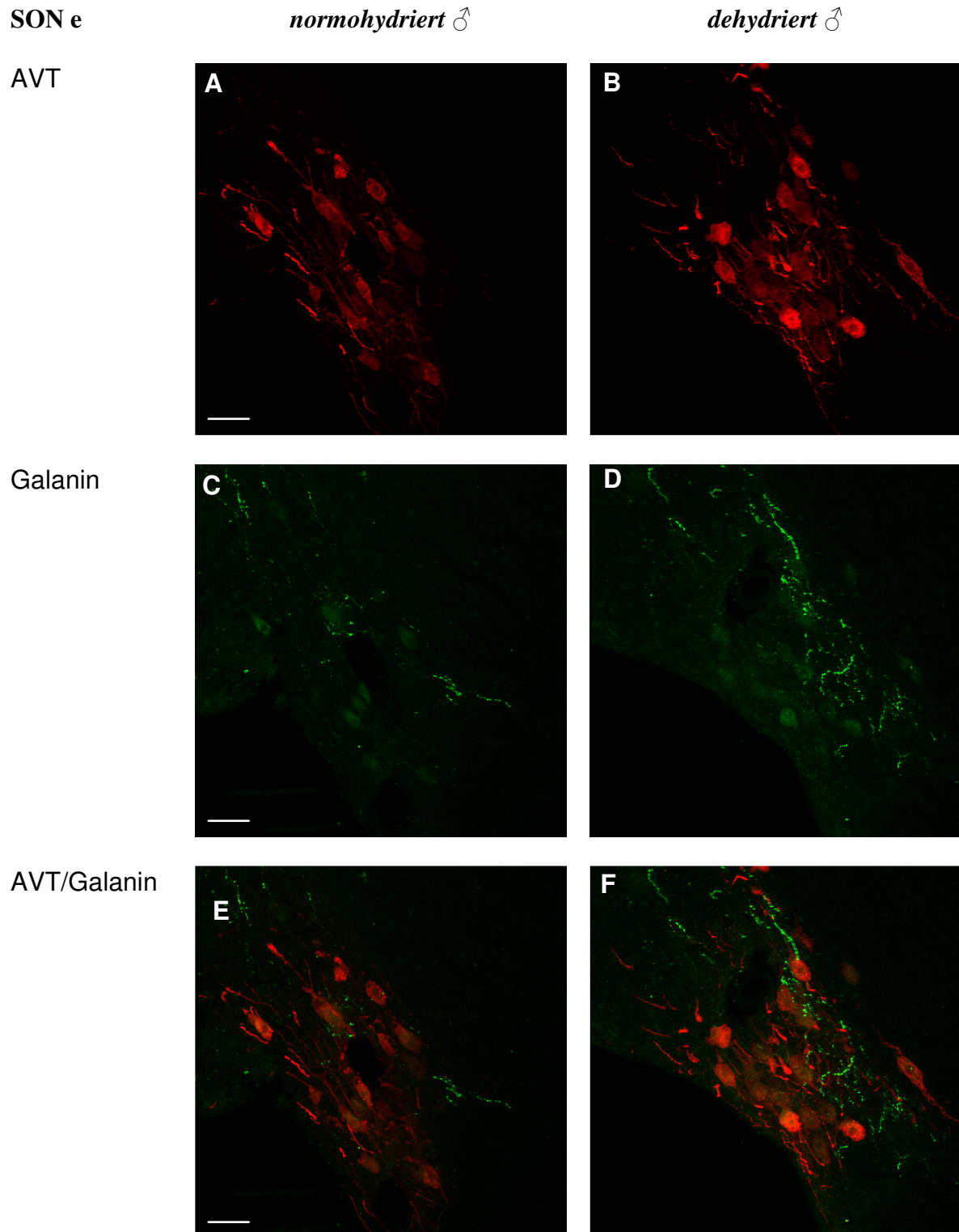


**Abb. 5-23:** Darstellung AVT- und Galanin-immunoreaktiver Neurone im SON 2-3 normo- (A, C, E) und dehydrierter (B, D, F) Hähne: A, B AVT-ir Neurone und Fasern ; C, D Galanin-ir Neurone und Fasern; E, F Kolokalisation beider Peptide. Maßstab entspricht 50µm.



**Abb. 5-24:** Darstellung AVT- und Galanin-immunoreaktiver Neurone im SON 3 normo- (A, C, E) und dehydrierter (B, D, F) Hähne: A, B AVT-ir Neurone und Fasern ; C, D Galanin-ir Neurone und Fasern; E, F Kolokalisation beider Peptide. Maßstab entspricht 50µm.





**Abb. 5-25:** Darstellung AVT- und Galanin-immunoreaktiver Neurone im SONE normo- (A, C, E) und dehydrierter (B, D, F) Hähne: A, B AVT-ir Neurone und Fasern ; C, D Galanin-ir Neurone und Fasern; E, F Kolokalisation beider Peptide. Maßstab entspricht 50µm.

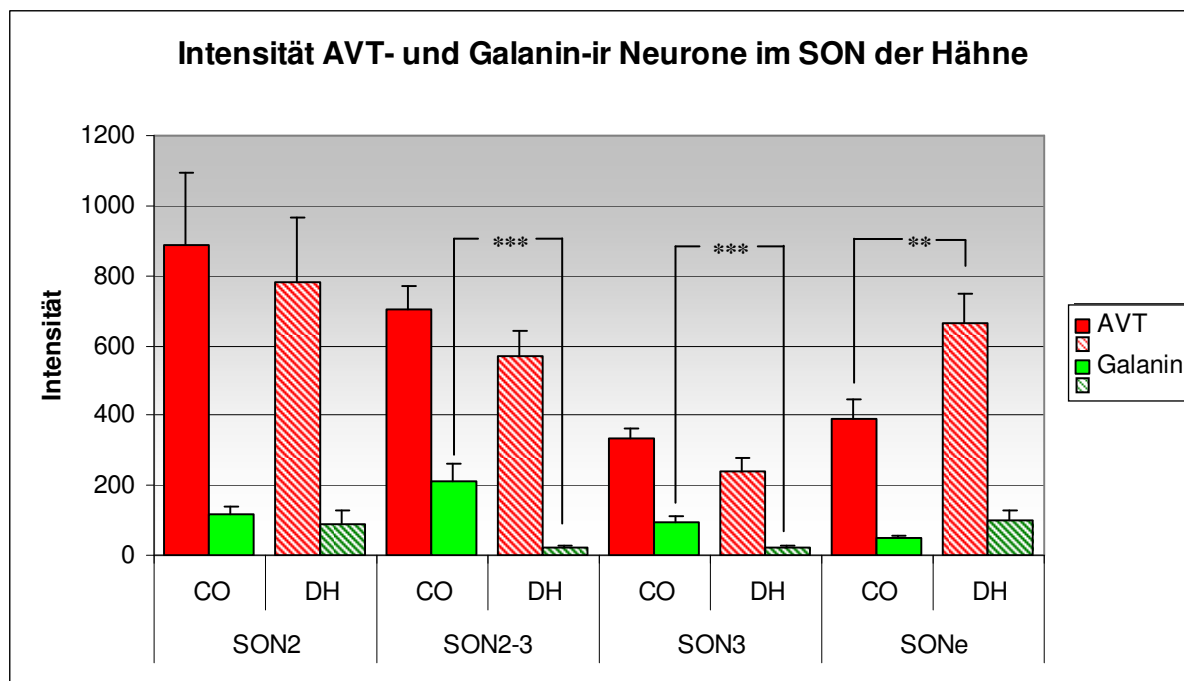
### **Intensitätsmessung und Zellzählung – Statistische Auswertung**

Im **SON2** zeigt sich ein kein signifikanter Unterschied ( $p=0,717$ ) der gemittelten Intensitäten der AVT-ir Neurone zwischen normo- und dehydrierten Hähnen, wobei Hähne nach 48 Stunden Dehydrierung lediglich eine um etwa 12% geringere gemittelte Intensität aufweisen als Hähne der Kontrollgruppe (s. Abb.5-26.). Der Unterschied der gemittelten Intensitäten Galanin-ir Neurone beträgt rechnerisch zwar etwa 22% (geringere Intensität im SON2 dehydrierter Hähne), ist aber ebenfalls nicht signifikant. Auch im **SON2-3** dehydrierter Hähne kann im Vergleich zu normohydrierten Hähnen für AVT-ir Neurone keine signifikant geringere Intensität (Differenz 18%,  $p=0,19$ ) nachgewiesen werden. Die Intensität Galanin-ir Neurone dehydrierter Hähne ist in diesem Bereich jedoch um 88% ( $p=0,001$ ) signifikant geringer verglichen mit normohydrierten Hähnen. Während sich im **SON3** die gemittelten Intensitäten AVT-ir Neurone zwischen normo- und dehydrierten Hähnen um etwa 29% ( $p=0,54$ ) deutlicher unterscheiden als in den vorangegangenen Bereichen, besteht auch hier in der Intensität Galanin-ir Neurone ein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen. Dehydrierte Hähne weisen im Vergleich zu normohydrierten Hähnen eine um 75% ( $p=0,001$ ) geringere Intensität Galanin-ir Neurone auf. Im **SONe** normohydrierter Hähne werden in sowohl AVT- als auch Galanin-ir Neuronen geringere Intensitäten als im **SONe** dehydrierter Hähnen gemessen. Hierbei unterscheidet sich die gemittelte Intensität AVT-ir Neurone um etwa 69% ( $p=0,009$ ) signifikant. Die gemittelte Intensität Galanin-ir Neurone ist in dehydrierten Hähnen zwar doppelt so hoch verglichen mit normohydrierten Hähnen, erreicht aber aufgrund hoher individueller Schwankungen keine Signifikanz.

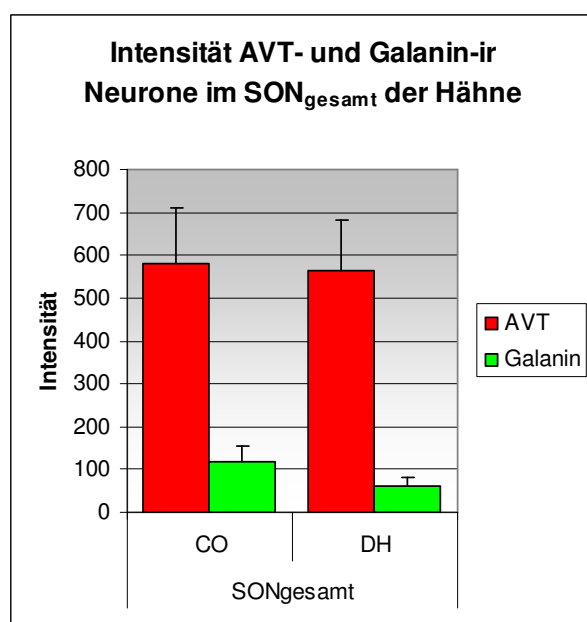
Betrachtet man alle Regionen des SON gemeinsam ( $SON_{gesamt}$ ), lässt sich für AVT-ir Neurone kein Unterschied in der Intensität zwischen den Versuchsgruppen feststellen. Die gemittelte Intensität Galanin-ir Neurone ist in dehydrierten Hähnen hingegen um etwa 50% ( $p=0,19$ ) geringer.

Ebenso wie in den gemittelten Intensitäten Galanin-ir Neurone, lassen sich in deren Anzahl Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen in den einzelnen Regionen des SON feststellen. Normohydrierte Hähne weisen im SON2-3 die größte gemittelte Anzahl Galanin-ir Neurone (44) auf, gefolgt von SON3 (37), SON2 (15) und SONe(5). Bei dehydrierten Hähnen befindet sich hingegen die maximale gemittelte Anzahl positiv bewerteter Galanin-Neurone im SON2 (15), gefolgt von SON3 (10) und SONe (10). Im Gegensatz zu normohydrierten Hähnen, die in SON2-3 die größte Anzahl Galanin-ir Neurone aufweisen, sind im SON2-3 dehydrierter Tiere die wenigsten Galanin-ir Neurone (7) detektierbar (s. Abb. 5-28.).

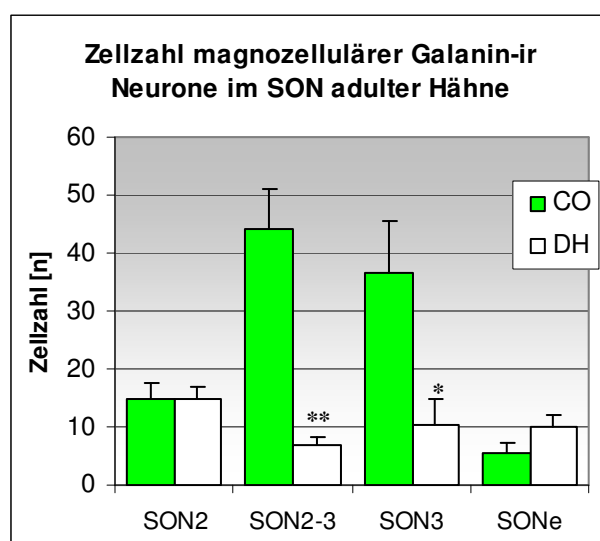




**Abb. 5-26:** Intensitätsvergleich für AVT und Galanin in magnozellularen Neuronen des SON2, SON2-3, SON3 und SONe normohydrierter (CO) und dehydrierter (DH) Hähne. (\*\*\*) $p \leq 0,001$ ; (\*\*) $p \leq 0,01$ )



**Abb. 5-27:** Gemittelter Intensitätsvergleich für AVT und Galanin in magnozellularen Neuronen des SON<sub>gesamt</sub> normohydrierter (CO) und dehydrierter (DH) Hähne.



**Abb. 5-28:** Vergleich der absoluten Zellzahl Galanin-ir magnozellularer Neurone im SON2, SON2-3, SON3 und SONe normohydrierter (CO) und dehydrierter (DH) Hähne. (\*\*) $p \leq 0,001$ ; (\*) $p \leq 0,05$ )

Normohydrierte Hähne weisen eindeutige Unterschiede in den gemittelten Intensitäten AVT-ir Neurone in den einzelnen Bereichen des SON auf. Die Intensität AVT-ir Neurone unterscheidet sich in den Bereichen SON2 und SON2-3 um etwa 20%, kann aufgrund hoher Schwankungen zwischen den Einzeltieren nicht als signifikant betrachtet werden. Ebenso ist die Differenz der gemittelten Intensitäten AVT-ir Neurone zwischen den Bereichen SON3 und SONE nur gering (17%,  $p=0,86$ ). Die beiden Bereiche SON2 und SON2-3 weisen hingegen im Vergleich zu den Bereichen SON3 und SONE signifikante ( $p\leq 0,001$ ) Unterschiede auf (s. Tab 5-4). Hierbei wird verglichen mit dem SON2 im SON3 eine um 38% und im SONE eine um 44% geringere Intensität in AVT-ir Neuronen gemessen.

Auch zwischen den einzelnen Bereichen des SON dehydrierter Hähne treten Differenzen in den gemittelten Intensitäten AVT-ir Neurone auf. Hierbei unterscheidet sich der SON3 signifikant von allen anderen Bereichen des SON (s. Tab 5-4). Verglichen mit dem SON2 werden im SON3 um etwa 31% geringere Intensitäten in AVT-ir Neuronen gemessen. Ebenso ist die gemittelte Intensität im SON3 um etwa 42% geringer verglichen mit der Intensität im SON2-3. Im SONE hingegen ist die Intensität AVT-ir Neurone etwa 2,8fach höher verglichen mit dem SON3.

AVT	CO			DH			
	Vergleich	Differenz der Mittelwerte	p-Wert	Signifikanz	Differenz der Mittelwerte	p-Wert	Signifikanz
	SON2 vs. SON2-3	180,2	0,418	n.s.	209,4	0,534	n.s.
	SON2 vs. SON3	549,9	<0,001	***	541,8	0,008	**
	SON2 vs. SONE	492,7	<0,001	***	116,0	0,884	n.s.
	SON2-3 vs. SON3	369,7	<0,001	***	332,4	0,011	*
	SON2-3 vs. SONE	312,4	0,001	***	93,4	0,769	n.s.
	SON3 vs. SONE	57,2	0,867	n.s.	425,8	0,001	***

**Tab. 5-4:** Vergleich der Intensität AVT-ir Neurone zwischen einzelnen Bereichen des SON normo- (CO) und dehydrierter (DH) Hähne. (n=3 Tiere pro Versuchsgruppe)

Die Intensität Galanin-ir Neurone im SON2-3 normohydrierter Hähne unterscheidet sich signifikant ( $p\leq 0,008$ ) von den gemittelten Intensitäten der Bereiche SON3 und SONE (s. Tab 5-5). Der SON2-3 ist zugleich der Bereich mit der höchsten Intensität Galanin-ir Neurone. Im Vergleich dazu werden im SON2 um etwa 45%, im SON3 um etwa 55% und im SONE um etwa 78% geringere Intensitäten Galanin-ir Neurone gemessen.

Dehydrierte Hähne weisen in SONE und SON2 die höchsten gemittelten Intensitäten Galanin-ir Neurone auf. Im SON2 und im SON2-3 werden hingegen um etwa 24% ( $p\leq 0,018$ )

signifikant geringere Intensitäten Galanin-ir Neurone gemessen verglichen mit dem SONE (s. Tab 5-5).

Galanin	CO			DH		
	Differenz der Mittelwerte	p-Wert	Signifikanz	Differenz der Mittelwerte	p-Wert	Signifikanz
SON2 vs. SON2-3	96,2	0,264	n.s.	68,4	0,223	n.s.
SON2 vs. SON3	21,3	0,975	n.s.	67,8	0,27	n.s.
SON2 vs. SONE	70,0	0,517	n.s.	7,4	0,997	n.s.
SON2-3 vs. SON3	117,6	0,008	**	0,6	1	n.s.
SON2-3 vs. SONE	166,3	<0,001	***	75,7	0,006	**
SON3 vs. SONE	48,7	0,464	n.s.	75,1	0,018	*

**Tab. 5-5:** Vergleich der Intensität Galanin-ir Neurone zwischen einzelnen Bereichen des SON normo- (CO) und dehydrierter (DH) Hähne. (n=3 Tiere pro Versuchsgruppe)

#### 5.5.4 Vergleich der Peptidverteilung zwischen den Geschlechtern

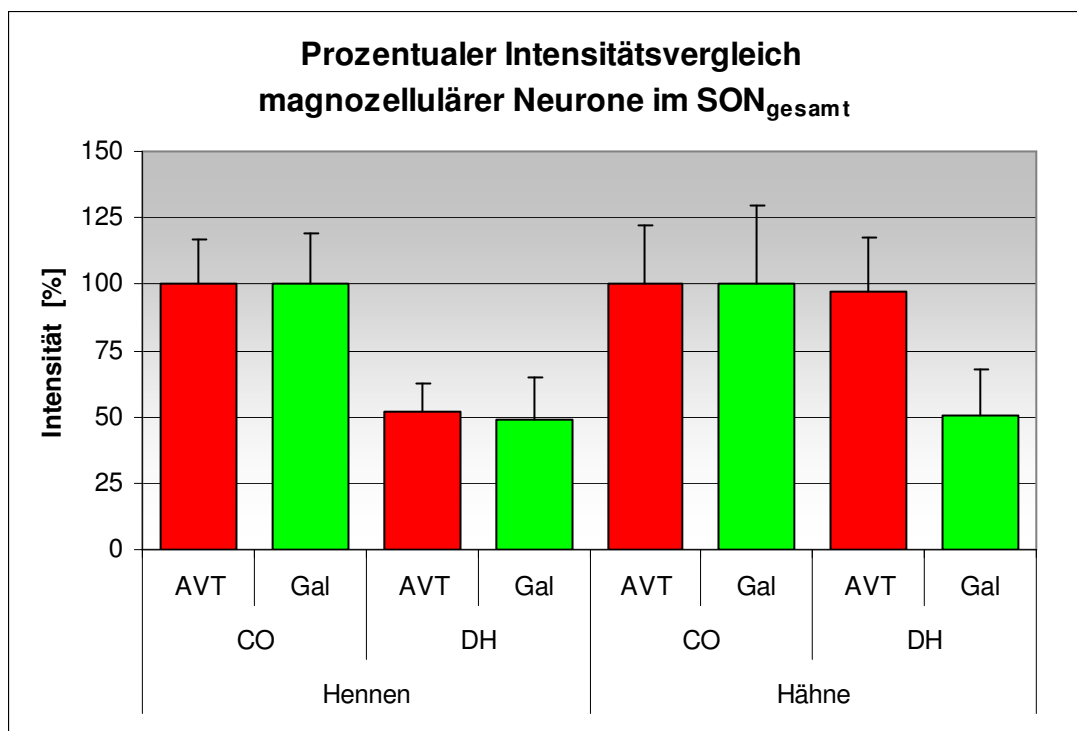
##### Prozentualer Vergleich gemittelter Intensitäten des SON<sub>gesamt</sub>

Der Vergleich der absoluten Intensitätswerte zwischen den Geschlechtern ist aufgrund der unterschiedlichen Antikörperkonzentration des primären AVT-Antikörpers nicht möglich. Zum immunhistochemischen Nachweis des AVT in coronalen Gehirnschnitten normo- und dehydrierter Hähne wurde der primäre Antikörper in einer Verdünnung von 1:30.000 eingesetzt. Die gleiche Antikörperkonzentration führte bei normohydrierten Hennen zu einer Antikörper-Akkumulation an beiden Schnittkanten: von den insgesamt 40µm Schnittdicke wurden jeweils nur die äußeren 5-10µm angefärbt. Mit einer Antikörperverdünnung von 1:45.000 wurde eine gleichmäßige Färbung des Schnittes erreicht. Da ansonsten alle Gehirnschnitte beider Geschlechter während Fixierung und immunhistochemischer Nachweismethode gleich behandelt wurden, liegt der Grund der bei Hennen auftretenden Antikörper-Akkumulation im höheren Peptidgehalt des Gewebes. Die Antikörperkonzentration des primären Antikörpers für Galanin wurde ebenfalls so eingestellt, dass sie zu einer optimaler Färbung (Durchfärbung der 40µm Schnittdicke) der Schnitte führte: Verdünnung 1:600 für beide Geschlechter.

Setzt man die gemittelten Intensitäten magnozellularer Neurone des SON<sub>gesamt</sub> prozentual in Beziehung, erhält man sowohl für AVT (bei Hennen) als auch für Galanin (bei beiden Geschlechtern) eine Reduktion der Immunoreaktivität bei beiden Geschlechtern. Im Einzelnen betrachtet bedeutet das: Dehydrierte Hennen zeigen eine 52%ige AVT-ir im

Vergleich zu normohydrierten Hennen (100%). Bei Hähnen verändert sich die AVT-ir nach 48 Stunden Dehydrierung nicht. Die Galanin-ir dehydrierter Hennen entspricht etwa der Hälfte (50%) der Galanin-ir normohydrierter Hennen. Im Vergleich zu normohydrierten Hähnen (100% Galanin-ir) weisen dehydrierte Hähne eine Reduktion der Galanin-ir um 49% auf.

Im direkten Vergleich der Geschlechter fällt auf, dass die Veränderung der gemittelten Intensitäten Galanin-ir Neurone gleichgerichtet ist und mit 48-50% in der Höhe der Reduktion übereinstimmen (s. Abb. 5-29.).



**Abb. 5-29:** Prozentualer Intensitätsvergleich für AVT und Galanin in magnozellulären Neuronen des SON<sub>gesamt</sub> normohydrierter (CO) und dehydrierter (DH) Hennen bzw. Hähne.

### Vergleich der durchschnittlichen Zellzahl Galanin-ir Neurone im SON<sub>gesamt</sub>

In der durchschnittlichen Zellzahl Galanin-ir Neurone im gesamten SON unterscheiden sich normohydrierte Hennen und Hähne nicht wesentlich (Hennen: 23; Hähne: 25). Dehydrierte Hennen hingegen weisen durchschnittlich nur die Hälfte (5) Galanin-ir Neurone im gesamten SON verglichen mit dehydrierten Hähnen (10) auf. Auch in der Zellzahl ist in beiden Geschlechtern eine gleichgerichtete Regulation nach 48 Stunden Dehydrierung erkennbar (s. Tab. 5.6.), die aufgrund der hohen individuellen Schwankungen jedoch keine Signifikanz erreicht.

Behandlung	Hennen		Hähne	
	<i>CO</i>	<i>DH</i>	<i>CO</i>	<i>DH</i>
Zellzahl	23	5	25	10
SEM	8,77	1,29	9,03	1,70
p-Wert	0,086		0,156	

**Tab. 5-6:** Durchschnittliche Zellzahl für Galanin-ir Neurone des SON<sub>gesamt</sub> normohydrierter (CO) und dehydrierter (DH) Hennen bzw. Hähne. (n=3 Tiere pro Versuchsgruppe beider Geschlechter)

## 6 Diskussion

Während die Rolle des AVT als Regulator des Wasserhaushaltes beim Huhn bereits eingehend untersucht wurde, gibt es bisher wenige Erkenntnisse zur Funktion des Galanin innerhalb dieses regulatorischen Systems beim Vogel. Das Vorkommen Galanin-immunoreaktiver Neurone im SON des Huhns konnte bereits in Untersuchungen zur Oviposition (KLEIN und GROSSMANN 2008), sowie zur osmotischen Stimulation adulter Hähne (CABUK, 2007) belegt werden. Zur Veränderung der hypothalamischen Galanin-Genexpression nach Dehydrierung hingegen gibt es beim Huhn keine veröffentlichten Daten. In der vorliegenden Arbeit sollen die Veränderungen der Genexpression im AVT- und Galanin-System nach osmotischer Stimulation sowohl auf Peptid- als auch auf Transkriptebene für beide Gene dargestellt werden. Neben osmotisch stimulierten Hähnen, werden erstmals osmotisch stimulierte Hennen auf die Veränderung des Galanin-Peptidgehaltes in magnozellulären Neuronen des SON untersucht. Da Galanin seine Wirkung über spezifische Rezeptoren ausübt, wurde ein zusätzliches Augenmerk auf die Galanin-Rezeptoren Subtyp 1 und 2 gerichtet. Die Existenz einer zweiten Galanin-Transkriptvariante bei der Wachtel, lässt auch für das Huhn eine weitere Transkriptvariante des Galanin vermuten.

Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

- Osmotische Stimulation führt zu einer Erhöhung der Plasma-AVT-Konzentration, Osmolalität und Natriumkonzentration.
- Osmotische Stimulation führt zu einer Veränderung der AVT- und Galanin-Immunoreaktivität in magnozellulären Neuronen des SON. Hierbei reagieren einzelnen Bereiche des SON unterschiedlich auf die Stimulation.
- Osmotische Stimulation führt im weiblichen Hypothalamus zu einer Erhöhung sowohl der Galanin mRNA als auch der Galanin Rezeptor Subtyp 1 mRNA.
- Osmotische Stimulation beeinflusst den Ovipositionszyklus der Henne.
- Transkripte der Galanin Rezeptor Subtypen 1 und 2 können in unterschiedlichen Geweben des Huhns nachgewiesen werden.
- Es existiert eine zusätzliche Transkriptvariante des Galanin-Vorläuferhormons beim Huhn und sie kann in unterschiedlichen Geweben des Huhns nachgewiesen werden.

## **6.1 Regulation der AVT- und Galanin-Genexpression nach osmotischer Stimulation**

### **6.1.1 Veränderung der Blutparameter**

Osmotische Stimulation führt zu einem Anstieg des Plasma AVT Levels und gleichzeitig zu einer Erhöhung der Osmolalität. 48 Stunden Dehydrierung resultiert in einer signifikant erhöhten AVT-Konzentration im Plasma ( $p < 0,001$ ) sowie einer signifikant erhöhten Osmolalität ( $p < 0,001$ ), was auf eine Stimulation des osmoregulatorischen Systems hindeutet. Als Kontrollparameter dient neben Plasma-AVT-Gehalt und Osmolalität auch die Natrium-Konzentration im Blut. Sowohl Hennen als auch Hähne zeigen nach 48 Stunden Wasserentzug eine signifikante Erhöhung ihrer Natrium-Werte ( $p < 0,001$ ). Im Geschlechtervergleich fällt auf, dass normohydrierte Hennen in allen untersuchten Blutparametern deutlich niedrigere Basal-Level aufweisen als normohydrierte Hähne. Nach osmotischer Stimulation ist dieser Unterschied jedoch nicht mehr nachzuweisen. Hierbei erreichen dehydrierte Hennen im Vergleich zu dehydrierten Hähnen sowohl im AVT-Gehalt (Hennen:  $81,45 \pm 0,39$  pg/ml, Hähne:  $71,99 \pm 6,74$  pg/ml) als auch in der Natrium-Konzentration (Hennen:  $174,38 \pm 1,12$  mmol/l, Hähne:  $172,01 \pm 0,31$  mmol/l) höhere Werte. In der Plasma-Osmolalität (Hennen:  $342,55 \pm 1,45$  mosm/l, Hähne:  $333,75 \pm 0,54$  mosm/l) unterscheiden sich die Werte beider Geschlechter signifikant ( $p = 0,006$ ). Die in der vorliegenden Arbeit detektierten basalen AVT-Level im Plasma normohydrierter Hähne ( $22,45 \pm 2,03$  pg/ml) liegen im Vergleich zu bereits veröffentlichten Daten (etwa 10-15 pg/ml) deutlich höher (KÖHLER, 2000; CABUK, 2007). Während CABUK (2007) bei normohydrierten Hähnen eine Osmolalität vergleichbar mit den Werten normohydrierter Hennen nachwies, liegt die Osmolalität der in dieser Arbeit verwendeten Hähne mit  $312,73 \pm 0,49$  mosm/l deutlich höher. KÖHLER (2000) hingegen dokumentierte mit etwa 314 mmosm/l eine vergleichbare Osmolalität bei normohydrierten, adulten Hähnen. Im Gegensatz zu CABUK (2007), deren Experimente (Blutabnahme) um 9 Uhr am Vormittag (3 Stunden nach Beginn des Lichtzyklus) stattfanden, wurde den Tieren in der vorliegenden Arbeit das Blut um 15 Uhr am Nachmittag (neun Stunden nach Beginn des Lichtzyklus) entnommen. Für das Säuger-Analog Arginin-Vasopressin ist bei Ratten ein diurnaler Rhythmus der AVP-Sekretion beschrieben (FORSLING, 1993). Während HUGHES et al. (2006) bei männlichen Salzwasser-Enten im Tagesverlauf einen am Mittag erhöhten Plasma-AVT-Spiegel feststellen konnte, zeigten KISLIUK und GROSSMANN (1995) hingegen für adulte Hähne einen diurnalen

Rhythmus der Plasma-AVT-Konzentration ausschließlich im osmotisch stimulierten System, nicht aber im normohydrierten Zustand der Tiere. Demnach und im direkten Vergleich zu den in dieser Arbeit untersuchten normohydrierten Hennen, muss das AVT-System der hier als Kontrolltiere verwendeten Hähne als bereits aktiviert betrachtet werden. Eine Aktivierung des AVT-Systems kann durch osmotische Stimulation, aber auch durch Stress erreicht werden. Eine osmotische Stimulierung sollte über den freien Zugang der Tiere zu Wasser ausgeschlossen werden, dennoch befinden sich sowohl die Werte der Natriumionenkonzentration des Blutes als auch der Plasmaosmolalität an der oberen Grenze der zu erwartenden basalen Level. Die Aktivierung des AVP/Oxytocin-Systems wird bei Ratten mit unterschiedlichen Arten des Stresses in Verbindung gebracht. Dazu zählt neben physischem Stress, wie zum Beispiel osmotische Stimulation, Hypoglykämie (Unterzuckerung), Blutung und körperliche Anstrengung (FYHRQUIST et al., 1981; BAYLIS und ROBERTSON, 1980; LANDGRAF et al., 1990, JORGENSEN et al., 2002; SAITO und SOYA, 2003), auch psychologischer Stress (WOTJAK et al., 1998; MA et al., 1999, JORGENSEN et al., 2002). Immobilisationsstress oder Zwangsschwimmen kann bei Ratten keinen Anstieg der Plasma-AVT-Konzentration auslösen, führt aber zur Veränderung des hypothalamischen AVT-Expression. Eine gleichzeitige Kombination aus physischem und emotionalen Stress erhöht selektiv die Menge an intracerebral freigesetztem AVP (ENGELMANN et al., 2006). Vergleicht man die gemessenen Werte für Plasma-AVT zwischen Kontrollhähnen ( $22,45 \pm 2,03$  pg/ml) und dehydrierten Hähnen ( $72,00 \pm 6,75$  pg/ml) kann dennoch von einer deutlichen Stimulation des osmoregulatorischen Systems nach 48 Stunden Dehydrierung gesprochen werden. Die Höhe des Plasma-AVT-Gehaltes dehydrierter Hähne unterscheidet sich von bereits veröffentlichten Daten (KÖHLER, 2000; CABUK, 2007). Der Grund dafür könnte im bereits erwähnten diurnalen Rhythmus im stimulierten System liegen. KISLIUK und GROSSMANN (1995) weisen eine Zunahme der Plasma-AVT-Konzentration von morgens (halbe Stunde nach Beginn des Lichtzyklus; Tiefpunkt) bis abends (halbe Stunde vor Beginn des Dunkelzyklus; Höhepunkt) nach. Die gemessene Osmolalität dehydrierter Hähne liegt mit  $333,75 \pm 0,54$  mosml/l etwa 7% höher im Vergleich zur Plasmaosmolalität normohydrierter Hähne. Auch in anderen Untersuchungen konnte bei Hähnen ein Anstieg der Plasmaosmolalität nach 48 Stunden Dehydrierung in ähnlichen Größenordnungen (8-11%) nachgewiesen werden (Köhler, 2000; CABUK, 2007).

Die Resultate des Plasma-AVT-Gehaltes und der Osmolalität normohydrierter Hennen stimmen mit bereits veröffentlichten Daten überein (SAITO und GROSSMANN, 1998).



Einhergehend mit veröffentlichten Daten von NOUWEN et al. (1984) konnte in der vorliegenden Arbeit nach 48 Stunden Dehydrierung weder bei normo- noch bei dehydrierten Tieren beider Geschlechter eine signifikante Korrelation zwischen Plasma-AVT-Gehalt und Osmolalität dokumentiert werden. Andere Autoren hingegen wiesen eine Korrelation der beiden Blutparameter nach Wasserentzug (ARAD et al., 1985; STALLONE and BRAUN, 1986a) bzw. in unbehandelten Tieren (ARNASON et al., 1986; CHATURVEDI et al. 2000; ROBINZON et al. 1990 a, b) nach. Die dokumentierten Korrelationen sind jedoch generell sehr gering. Diese abweichenden Ergebnisse könnten in unterschiedlichen Rassen, Geschlechtern, Alter und Haltungsbedingungen der Tiere begründet sein.

### 6.1.2 Veränderung der AVT- und Galanin-Immunoreaktivität in magnozellulären Neuronen des SON

Nach 48 Stunden Dehydrierung zeigen adulte Hennen eine geringere Intensität in den AVT-immunoreaktiven (AVT-ir) magnozellulären Neuronen des SON verglichen mit normohydrierten Tieren gleichen Geschlechts. Im Vergleich normo- zu dehydrierten Hähnen konnte hingegen kein signifikanter Unterschied in der Intensität AVT-ir Neurone im SON<sub>gesamt</sub> (gemittelt aus allen vier untersuchten Bereichen des SON) nachgewiesen werden. CHATURVEDI et al. (1994) dokumentierte nach 2 bzw. 4 Tagen Wasserentzug bei Hähnen eine geringere AVT-ir im SON. Diese verminderte Immunoreaktivität als Reaktion auf osmotische Stimulation (Dehydrierung, *saltloading*) konnte auch bei Ratten beobachtet werden (CHOY und WATKINS, 1977; MEISTER et al., 1990; AMAYA et al., 1999). REAUX-LE GOAZIGO (2004) wies sowohl nach 24 als auch nach 48 Stunden Dehydrierung eine signifikant geringere AVP-ir im SON und PVN der Ratte nach. Vermutet wird darin ein vermehrter axonaler Transport des synthetisierten Peptids in die Neurohypophyse, um den erhöhten Bedarf zu decken. Im Gegensatz dazu konnte Cabuk (2007) bei adulten Hähnen eine Zunahme der AVT-ir in magnozellulären Neuronen des SON detektieren.

Im Geschlechtervergleich wird deutlich, dass dehydrierte Hennen im SON<sub>gesamt</sub> eine deutliche Verminderung der AVT-ir aufweisen (48%,  $p=0,054$ ), im Gegensatz zu dehydrierten Hähnen (3%,  $p=0,9$ ). NOUWEN et al. (1984) beobachteten, dass die AVT-Konzentration im Plasma adulter Hähne, die nach Beginn der Dehydrierung zunächst ansteigt, nach andauernder Dehydrierung über 72 bis 96 Stunden wieder abfällt. Eine Tatsache, die mit dem verminderten Peptid-Gehalt im SON der dehydrierten Hennen einhergehen könnte. Es ist jedoch auszuschließen, dass die in dieser Arbeit untersuchten Tiere vor Beginn der

experimentellen Dehydrierung für 48 Stunden bereits einer derartig starken osmotischen Stimulation ausgesetzt waren. Dieses Ergebnis, gestützt durch die gewonnenen Daten der Blutparameter-Bestimmung, deutet zum einen darauf hin, dass Hennen verglichen mit Hähnen stärker auf den osmotischen Stimulus reagieren. Der Grund dafür mag die zusätzliche Belastung durch die Eiablage und dem damit einhergehenden Wasserverlust sein. Zum anderen könnte die Ursache der gleich bleibenden Intensität AVT-ir Neurone im SON dehydrierter Hähne in der bereits vermuteten Aktivierung des AVT-Systems der Kontrolltiere liegen.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass nicht alle Bereiche des SON gleich auf den osmotischen Stimulus reagieren. Sowohl bei dehydrierten Hennen als auch bei dehydrierten Hähnen ist verglichen mit den jeweiligen Intensitäten normohydrierter Tiere die Veränderung der AVT-ir (Intensität der Fluoreszenz-Strahlung) in den Bereichen SON2, SON2-3 und SON3 gleichgerichtet. Während die Verminderung der Intensität AVT-ir Neurone in den Bereichen SON2 (64%), SON2-3 (37%) und SON3 (52%) dehydrierter Hennen signifikant ist, vermindert sich die gemittelte Intensität AVT-ir Neurone in den gleichen Bereichen des SON dehydrierter Hähne nur gering (SON2: 12%, SON2-3: 18% und SON3: 29%;  $p > 0,05$ ). Eine Ausnahme bildet der Bereich SONE. Hier kann bei dehydrierten Hennen eine Verminderung der AVT-ir um 38% ( $p = 0,076$ ) nachgewiesen werden, dehydrierte Hähne zeigen in diesem Bereich jedoch eine um 69% ( $p = 0,009$ ) signifikant höhere Intensität verglichen mit Hähnen der Kontrollgruppe. Bisher wurden keine Daten zur AVT-ir speziell im SONE des Huhns, weder unter Kontrollbedingungen noch unter Stimulation, veröffentlicht.

Neben AVT wird auch Galanin in den magnozellulären Neuronen des SON weiblicher und männlicher Hühner synthetisiert. Im SON normohydrierter Hennen können Galanin-immunoreaktive (Galanin-ir) magnozelluläre Neurone nachgewiesen werden. KLEIN et al. (2006) zeigten im SON adulter Legehennen eine signifikant höhere Anzahl Galanin-ir Neurone verglichen zu adulten Hähnen. Auch im SON der männlichen Kontrolltiere kann Galanin-ir in magnozellulären Neuronen nachgewiesen werden. Im Vergleich der Geschlechter unterscheidet sich die durchschnittliche Zellzahl Galanin-ir Neurone im gesamten SON kaum (Hennen: 23 Zellen, Hähne: 25 Zellen). Im Gegensatz dazu konnte CABUK (2007) nur im SON dehydrierter Hähne Galanin-ir Neurone detektieren, während im SON normohydrierter Hähne Galanin-ir in magnozellulären Neuronen völlig fehlte. Diese Diskrepanz könnte einerseits durch eine Aktivierung des Galanin-Systems durch Stress der in dieser Arbeit verwendeten Kontrolltiere erklärt werden. Bei Ratten sind Veränderungen der

Galanin-Expression im Zentralnervensystem, ausgelöst durch unterschiedliche Stressoren, belegt (SWEERTS et al., 1999; SERGEYEV et al., 2005). Andererseits weisen aber auch KLEIN et al. (2006) Galanin-ir Neurone, wenngleich eine deutlich geringere Anzahl, im SON normohydrierter Hähne nach. In beiden Fällen (KLEIN et al. 2006; CABUK, 2007) wurden Hähne am Vormittag etwa drei Stunden nach Beginn des Lichtzyklus untersucht. AKABAYASHI et al. (1994) konnten einen diurnalen Rhythmus der Galanin-Synthese im Gehirn von Ratten nachweisen. Im SON zeigte sich im Galanin-Peptidgehalt ein Anstieg nach Beginn (18 Uhr) des Dunkelzyklus mit einem Höchstwert um 24 Uhr und gefolgt von einer raschen Abnahme mit einem Tiefpunkt um 3 Uhr. Drei Stunden vor und nach Beginn des Lichtzyklus (6 Uhr) blieb der Galanin-Gehalt im SON auf einem niedrigen Level. XU et al. (1999) weisen ebenfalls bei Ratten einen diurnalen Rhythmus in der hypothalamischen Galanin-Transkription nach mit steigenden mRNA-Leveln während des Licht- und fallenden mRNA-Leveln während des Dunkelzyklus. Bei Ratten handelt es sich im Gegensatz zu Hühnern jedoch um nachtaktive Tiere, die vorwiegend nachts Futter und Wasser aufnehmen. Fraglich bleibt, ob tagaktive Hühner, die einen uneingeschränkten Zugang zu Wasser und Futter haben, ebenfalls einen diurnalen Rhythmus in der hypothalamischen Galanin-Synthese aufweisen.

Nach 48 Stunden Dehydrierung zeigen sowohl Hennen als auch Hähne eine etwa 50 prozentige Verminderung der Galanin-ir im SON<sub>gesamt</sub> ( $p \leq 0,19$ ). Auch bei der Ratte wurde nach osmotischer Stimulation eine Verminderung der Galanin-ir in SON und PVN nachgewiesen (KOENIG et al., 1989; SKOFITSCH et al., 1989; MEISTER et al., 1990). CABUK (2007) dokumentiert erst nach einer osmotischen Stimulation von 48 Stunden Galanin-ir Neurone im SON adulter Hähne. Eine Zunahme der Galanin-ir nach Langzeit-Dehydrierung konnte bisher hauptsächlich in Nagern nachgewiesen werden, die in Trockengebieten (Wüste) beheimatet sind (BRIDGES und JAMES, 1982; RAJI und NORDMANN, 1994). So zeigten LACAS-GERVAIS et al. (2003) bei der kleinen Nacktsohlenrennmaus (*Taterillus gracilis*), die während der trockensten Monate einen Pseudo-Sommerschlag hält, nicht nur für Galanin, sondern auch für AVP eine Zunahme der Immunoreaktivität nach acht Tagen Dehydrierung. Wohingegen die nordwestliche Fettmaus (*Steatomys caurinus*), die ebenfalls in afrikanischen Trockengebieten beheimatet ist, nach acht Tagen Dehydrierung ebenso wie Ratten eine Verminderung der AVP- und Galanin-ir in den magnozellularen Neuronen des SON aufweist (LACAS-GERVAIS et al., 2003).

Für Galanin fanden ebenfalls genauere Untersuchungen in den einzelnen Bereichen des SON statt. Wie schon in AVT-ir Neuronen ist auch in Galanin-ir Neuronen der Bereiche SON2,

SON2-3 und SON3 die Veränderung der gemittelten Intensitäten in beiden Geschlechtern gleichgerichtet. Dehydrierte Tiere beider Geschlechter zeigen eine Verminderung der Galanin-ir. Hennen weisen nach 48 Stunden Wasserentzug im SON2 (15%) und SON3 (28%) eine signifikant geringere Intensität Galanin-ir Neurone auf ( $p \leq 0,018$ ). Während sich die gemittelte Intensität im SON2-3 hingegen kaum (95%,  $p=0,88$ ) verändert, kann auch im SONE (67%) dehydrierter Hennen eine geringere Intensität Galanin-ir Neurone nachgewiesen werden. Diese erreicht jedoch aufgrund individueller Schwankungen der Einzeltiere keine Signifikanz. Dehydrierte Hähne zeigen im Vergleich zu normohydrierten Hähnen eine geringe Verminderung der Galanin-ir im SON2 (77%,  $p=0,53$ ), eine signifikante Verminderung jedoch in SON2-3 (11%,  $p=0,001$ ) und SON3 (25%,  $p=0,001$ ). Ebenso wie für die Intensität AVT-ir Neurone kann im SONE dehydrierter Hähne eine Erhöhung der Intensität Galanin-ir Neurone um etwa 107% ( $p=0,08$ ) verglichen mit Hähnen der Kontrollgruppe festgestellt werden.

Neben den Intensitätsmessungen wurde zusätzlich die Zellzahl Galanin-ir Neurone in den einzelnen Bereichen des SON bestimmt. Hierbei zeigt der Wasserentzug für 48 Stunden erneut bei Hennen (23 Zellen CO, 5 Zellen DH) eine größere Wirkung im Vergleich zu Hähnen (25 Zellen CO, 10 Zellen DH). Der Geschlechtsdimorphismus im Bereich SONE, der sich in den unterschiedlich gerichteten Immunreaktivitäten beider Peptide zeigt, setzt sich auch in der Zellzahl Galanin-ir Neurone fort. Während normohydrierte Hennen im SONE durchschnittlich acht Galanin-ir Zellen aufweisen, sinkt die durchschnittliche Anzahl jener Zellen in dehydrierten Hennen auf 4. Hingegen steigt die Zahl Galanin-ir Neurone bei Hähnen von 5 (normohydriert) auf 10 (dehydriert) im gleichen Bereich des SON. Auch bezüglich der Galanin-Synthese wurden bisher keine Daten veröffentlicht, die sich explizit auf die Neuronengruppe im SONE des Huhns beziehen. Die bereits zitierten Arbeiten von CABUK (2007) und KLEIN et al. (2006) untersuchen ausschließlich den SONvm auf AVT- und Galanin-Peptid-Gehalt, nicht aber den SONE.

Die Resultate der vorliegenden Arbeit zeigen, dass es beim Huhn in der Galanin/AVT-Peptid-Synthese im Bereich des SONE einen sexuellen Dimorphismus gibt. Ein Geschlechtsdimorphismus im AVT/Galanin-System wurde für das Huhn bereits im BSTM (*bed nucleus of the stria terminalis medialis*) festgestellt (JURKEVICH et al., 1999; GROSSMANN et al., 2002; KLEIN et al., 2006). Während adulte Hähne sowohl AVT als auch Galanin im BSTM synthetisieren, kann dort keines der beiden Peptide in adulten Hennen

nachgewiesen werden. Eine osmotische Stimulation hat keinerlei Auswirkungen auf die Peptidsynthese im BSTM beider Geschlechter. Während der Geschlechtsdimorphismus im BSTM also unter Normalbedingungen vorhanden ist, wird der Unterschied zwischen den Geschlechtern im SONE erst nach osmotischer Stimulation erkennbar. Normohydrierte Hennen und Hähne weisen im SONE eine durchschnittlich schwächere AVT-ir als in SON2 und SON2-3, hingegen eine stärkere AVT-ir als in SON3 auf. Auch die durchschnittliche Galanin-ir ist bei beiden Geschlechtern im SONE der Kontrolltiere sehr gering.

Bleibt die Frage, ob die Erhöhung der AVT- und Galanin-ir im SONE dehydrierter Hähne durch osmotische Stimulation hervorgerufen wird. Im aufregulierten AVT-System der osmotisch stimulierten Hähne kann anhand der Plasma-AVT-Konzentrationen nicht nachvollzogen werden, ob diese Tiere zusätzlichem Stress ausgesetzt waren oder nicht. Zukünftige Untersuchungen zur Regulation des AVT/Galanin-Systems durch andere physiologische Stimulationen wie Oviposition oder Futterentzug, sowie Untersuchungen zur Auswirkung unterschiedlicher Stressoren auf die AVT- und Galanin-Expression sollten den SON pars externalis mit einbeziehen.

Der Vergleich der einzelnen Regionen des SON innerhalb einer Versuchsgruppe (eines Geschlechts) zeigt, dass nicht alle Bereiche, die gleiche Intensität AVT- bzw. Galanin-ir Neurone aufweisen, und dass eine osmotische Stimulation unterschiedliche Auswirkungen auf die einzelnen Bereiche hat. Sowohl in normo- als auch in dehydrierten Hennen existiert zwischen SON3 und SON2-3 ein signifikanter Unterschied in der Intensität AVT-ir Neurone ( $p \leq 0,002$ ). Der in normohydrierten Hennen signifikante Unterschied zwischen den Bereichen SON3 und SON2 ( $p = 0,018$ ), geht im aufregulierten AVT-System verloren. Betrachtet man im SON2 hierzu vergleichend die Intensität AVT-ir Neurone beider Versuchsgruppen, stellt man fest, dass hier die größte Differenz zu verzeichnen ist. Bei Hennen verändert sich die AVT-ir nach 48stündiger Dehydrierung somit am stärksten im SON2. In der Intensität Galanin-ir Neurone lässt sich hingegen weder bei normo- noch bei dehydrierten Hennen eindeutige Unterschiede zwischen den Bereichen des SON feststellen. Zwar lassen sich rechnerisch Differenzen der gemittelten Intensitäten bestimmen, doch ist die individuelle Schwankung zwischen den Einzeltieren einer Gruppe zu groß, um signifikante Unterschiede zu erreichen.

Die Intensität AVT-ir Neurone normohydrierter Hähne unterscheidet sich zwischen den Bereichen SON2 bzw. SON2-3 und den Bereichen SON3 bzw. SONE signifikant ( $p \leq 0,001$ ). Im osmotisch stimulierten AVT-System geht der Unterschied zwischen SONE und den

Bereichen SON2 bzw. SON2-3 verloren. Auch für die Intensität Galanin-ir Neurone lassen sich sowohl bei normo- als auch bei dehydrierten Hähnen signifikante Differenzen einzelner Bereiche feststellen. Während sich bei normohydrierten Hähnen der SON2-3 von den Bereichen SON3 bzw. SONE unterscheidet, geht der Unterschied zwischen SON2-3 und SON3 nach 48 Stunden Dehydrierung verloren. In dehydrierten Hähnen unterscheidet sich stattdessen der SONE zusätzlich vom SON3. Im Gegensatz zu Hennen kann bei Hähnen nach osmotischer Stimulation in den Bereichen SON2, SON2-3 und SON3 keine eindeutige Änderung der Intensitätsverhältnisse zueinander festgestellt werden. Die Verminderung der Intensität Galanin-ir Neurone ist im SON2-3 dehydrierter Hähne verglichen mit den anderen Bereichen am höchsten. Eine Ausnahme bildet auch hier die gegensätzliche Veränderung AVT- und Galanin-ir Neurone im SONE verglichen mit den anderen Bereichen des SON dehydrierter Hähne.

### 6.1.3 Veränderung der AVT- und Galanin-Genexpression im Hypothalamus

Mittels *realtime* PCR und Northern Blot Analyse wurde in der vorliegenden Arbeit die Veränderung der AVT- und Galanin-mRNA nach 48 Stunden Dehydrierung sowohl im weiblichen als auch im männlichen Hypothalamus des Huhns untersucht. Hierbei zeigte sich, dass Hennen auf den Wasserentzug mit einer signifikanten Erhöhung der Galanin-mRNA (21%) und der GalR1-mRNA (27%) reagieren. Eine Erhöhung der AVT-mRNA um gemittelte 40% konnte jedoch nicht statistisch abgesichert werden ( $p > 0,05$ ). Die Northern Blot Analyse der Gesamt-RNA des weiblichen Hypothalamus zeigt ebenfalls eine Erhöhung der AVT mRNA um 42,4%. Jedoch sind auch hierbei die individuellen Schwankungen zu groß, um eine Signifikanz zu erreichen ( $p > 0,05$ ). Für Galanin mRNA kann mittels Northern Blot-Analyse, verglichen mit der *realtime* PCR, eine deutlich stärkere Veränderung (Erhöhung um 44,7%) dokumentiert werden. Im Gegensatz zur *realtime* PCR wird hierbei jedoch keine Signifikanz erreicht ( $p > 0,05$ ).

Auch bei den Hähnen wird mittels *realtime* PCR für AVT-mRNA keine signifikante Veränderung nachgewiesen. Der hypothalamische AVT-mRNA-Gehalt dehydrierter Tiere im Northern Blot ist sogar um 26,6% ( $p = 0,28$ ) geringer verglichen mit normohydrierten Tieren. Eine eindeutige Veränderung des Galaninens kann weder über PCR (Erhöhung des mRNA-Gehaltes um 38% bei  $p = 0,11$ ) noch über Northern Blot (Verminderung des mRNA-Gehaltes

um 13,4% bei  $p=0,98$ ) nachgewiesen werden. Die individuellen Schwankungen sind für eine gesicherte Aussage zu groß.

Es bleibt festzustellen, dass in den Resultaten eine Diskrepanz zwischen den eingesetzten Nachweisverfahren herrscht. Während sich bei Hennen die Ergebnisse aus beiden verwendeten Methoden im Nachweis der AVT mRNA ähneln, gibt es deutliche Unterschiede für die Veränderungen des hypothalamischen Galanin mRNA-Gehaltes. Bei Hähnen kann weder mittels Realtime PCR noch mittels Northern Blot-Analyse eine signifikante Veränderung der beiden Zielgene festgestellt werden. Hierbei schwanken die Einzeltiermessungen um rechnerische Mittelwerte jedoch in unterschiedliche Richtungen. Die Ursachen hierfür könnten zum einen in der unterschiedlichen Sensibilität der Methoden gesucht werden, zum anderen in den verwendeten Referenzgenen. Während die *realtime* PCR bereits kleinste Unterschiede in der Genregulation sichtbar macht, stützt sich zusätzlich die Normalisierung der Zielgene auf die mRNA zweier unterschiedlicher Referenzgene. Die Northern Blot Analyse hingegen bediente sich in diesem Fall nur eines Referenzgens, wobei es sich zudem um ribosomale RNA handelt. Als Referenzgene werden grundsätzlich solche eingesetzt, deren Expression a) in jeder Zelle des zu untersuchenden Gewebes auf gleichem Niveau zu erwarten ist und b) unter den gewählten Versuchsbedingungen nicht reguliert wird. Dies trifft für alle in der vorliegenden Arbeit klonierten/verwendeten Referenzgene zu. Für die Analyse mittels *realtime* PCR wurde zusätzlich darauf geachtet, dass der mRNA-Gehalt der Referenzgene in einem ähnlichen Bereich des mRNA-Gehaltes der Zielgene liegt. Für die Northern Blot Analyse hingegen wurde ein Referenzgen ausgewählt, von dem in erster Linie ein eindeutiges (starkes) Signal zu erwarten war. Um eine bessere Vergleichsmöglichkeit zu haben, könnte eine zukünftige Northern Blot Analyse entweder mit einem geringer exprimierten Referenzgen oder gar mit mehreren Referenzgenen durchgeführt werden.

Veränderungen der AVT-Genexpression nach osmotischen Stimuli wurden beim Vogel bereits von mehreren Autoren dokumentiert. Osmotischer Stress verursacht durch sowohl Dehydratation als auch *saltloading* resultiert in einem Anstieg hypothalamischer AVT-mRNA (MÜHLBAUER et al., 1992; CHATURVEDI et al., 1996 und 1997; SETH et al., 2004). Mittels *In Situ*-Hybridisierung wurde eine Zunahme AVT exprimierender Neurone sowohl im SON als auch im PVN adulter Hühner nachgewiesen, nachdem diese zwei bzw. vier Tage eine 2%ige Kochsalzlösung zu trinken bekamen (CHATURVEDI et al. 1997). Neben der erhöhten Neuronenzahl, zeigte sich im PVN auch eine erhöhte Menge an AVT-mRNA pro Neuron. MÜHLBAUER et al. (1992) wiesen mittels Northern Blot-Analyse bei Legehennen einen

60%igen Anstieg der AVT-mRNA nach zwei Tagen Dehydration und einen 40%igen Anstieg nach 5 Tagen *saltloading* (2% NaCl) nach.

In der vorliegenden Arbeit zeigt sich ein Unterschied in der AVT-Genexpression zwischen den Geschlechtern. Hennen reagieren nach 48 Stunden Wasserentzug mit einem Anstieg der AVT-mRNA im Hypothalamus, während bei Hähnen keine Veränderung des mRNA-Gehaltes festgestellt werden kann. CHATURVEDI et al. (2000) wiesen einen Geschlechtsdimorphismus in der AVT-Genexpression nach Dehydrierung in der japanischen Wachtel nach. 4 Tage Wasserentzug führten bei weiblichen Wachteln zu einem 3,5fachen Anstieg der hypothalamischen AVT-mRNA, während bei männlichen Wachteln nur ein 2,5facher Anstieg zu verzeichnen war. Ursächlich für diesen Unterschied könnte die zusätzliche Belastung der Henne durch die Eiablage und einem damit einhergehenden erhöhten Wasserverlust sein. Die Aufregulation der AVT-Genexpression erfolgt bereits nach wenigen Stunden. SAITO und GROSSMANN (1998) konnten in adulten Legehennen nach 8 Stunden Dehydrierung parallel zu einem Anstieg der Plasma-AVT-Konzentrationen einen Anstieg der hypothalamischen AVT-mRNA nachweisen. Neben der Vermehrung der AVT-mRNA als Reaktion auf einen osmotischen Stimulus wird die mRNA durch eine Poly-A-Schwanz-Verlängerung zusätzlich stabilisiert. CHATURVEDI et al. (1997) wies bei dehydrierten Hähnen neben einem 2,3fachen Anstieg der AVT-mRNA gleichzeitig ein um 100bp verlängertes AVT-Transkript nach. In der vorliegenden Arbeit zeigen Hähne nach 48 Stunden Dehydrierung jedoch keine signifikante Änderung der AVT-Expression. Das legt die Vermutung nahe, dass es sich bei den verwendeten Kontrolltieren tatsächlich um Tiere handelte, deren AVT-System bereits aktiviert war. Ein weiteres Indiz dafür ist das Ergebnis der Einzeltiermessung im Northern Blot. Hier schwankt der Gehalt an AVT mRNA normohydrierter Hähne zwischen 65 und 160% (Mittelwert der Gruppe = 100%).

Die Galanin-Genexpression nach osmotischer Stimulation wurde auf Transkriptebeine beim Vogel bisher noch nicht untersucht. Auch hier stellt die vorliegende Arbeit einen Unterschied zwischen den Geschlechtern fest. Während Hähne für Galanin nach 48 Stunden keine eindeutige Regulation erkennen lassen, zeigen Hennen einen signifikanten Anstieg der hypothalamischen Galanin-mRNA. Die fehlende Zunahme des hypothalmischen Galanin mRNA-Gehaltes dehydrierter Hähne im Vergleich zu den Kontrolltieren lässt auch hier eine Aktivierung des AVT/Galanin-System der Kontrolltiere zum Zeitpunkt des Versuchs vermuten.



Eine osmotisch stimulierte Veränderung der Galanin-Genexpression wurde indes ausführlich am Säuger untersucht. Galanin-mRNA und Galanin-Peptid sind im ZNS der Ratte weit verbreitet. Auch in magnozellulären, AVP-synthetisierenden Neuronen des SON und PVN kann Galanin nachgewiesen werden (MELANDER et al., 1986, SKOFITSCH et al., 1989). Zudem stehen die magnozellulären Neurone mit Galanin-haltigen Fasern über Synapsen in Kontakt (LANDRY et al., 2000). Galanin inhibiert die elektrische Aktivität dieser Neurone (PAPAS und BOURQUE, 1997) und damit die durch osmotische Stimulation indizierte AVP-Sekretion und Biosynthese (KONDO et al., 1993; LANDRY et al., 1995). Gleichzeitig ist sowohl nach Dehydrierung als auch nach *saltloading* ein Anstieg der Galanin-Transkripte (MEISTER et al., 1990, SKOFITSCH et al., 1989) und eine Erhöhung der GalR1-mRNA in PVN und SON der Ratte zu beobachten (LANDRY et al., 1998; BURAZIN et al., 2001). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass nach osmotischer Stimulation Galanin über einen negativen Feedback-Mechanismus die AVP-Abgabe moduliert.

Um zu überprüfen, inwieweit das hypothalamische Galanin-System des Huhns auf einen osmotischen Stimulus reagiert, wurde neben der Galanin mRNA zusätzlich die mRNA der Galanin-Rezeptor Subtypen 1 und 2 nachgewiesen. Während dehydrierte Hähne im Vergleich zu den männlichen Kontrolltieren erneut keine signifikante Änderung beider Rezeptoren nachweisen, erhöht sich nach 48 Stunden Dehydrierung der Gehalt an Gal-R1-mRNA im weiblichen Hypothalamus signifikant um 27 Prozent. Jedoch wird Gal-R2-mRNA auch in weiblichen Hypothalamus nicht signifikant verändert, was mit den Ergebnissen BURAZIN et al. (2001) übereinstimmt: Sie konnten eine Veränderung der Gal-R2-mRNA, die ausschließlich im parvozellulären PVN vorkommt, nach 4 Tagen Futterentzug, nicht aber nach 4 Tagen Wasserentzug in der männlichen Ratte nachweisen. BURAZIN et al. (2001) dokumentierten außerdem einen Anstieg der Gal-R1-mRNA im magnozellulären SON und im sowohl magnozellulären als auch parvozellulären Teil des PVN nach 4 Tagen Dehydrierung bzw. 4 Tagen *saltloading* (2% NaCl im Trinkwasser).

Aus den bisher dargestellten Ergebnissen ergibt sich die Frage, welche Funktion Galanin in der Regulation des Wasserhaushaltes übernimmt. CABUK (2007) zeigte als Erste einen Anstieg des Galanin-Peptidgehaltes in magnozellulären Neuronen des SON adulter Hähne nach 48 Stunden Dehydrierung. Im SON normohydrierter Hähne konnte sie jedoch keine Galanin-Immunoreaktivität nachweisen. Gleichzeitig dokumentierte CABUK (2007) einen deutlichen Anstieg des AVT-Peptid-Gehaltes im SON dehydrierter Hähne. Im Gegensatz dazu konnte in der vorliegenden Arbeit bei dehydrierten Hähnen keine Veränderung der

AVT-ir, aber eine Verminderung der Galanin-ir im SON<sub>gesamt</sub> nachgewiesen werden. Hennen zeigen sowohl für AVT als auch für Galanin eine Verminderung der Immunoreaktivität nach 48 Stunden Wasserentzug. Auffällig ist, dass sowohl bei CABUK (2007) als auch in der vorliegenden Arbeit die Änderung der Immunoreaktivitäten für AVT und Galanin gleichgerichtet verlaufen. Eine gleichgerichtete Veränderung der beiden Peptide nach osmotischer Stimulation konnte auch bei Afrikanischen Wüsten-Nagern (LACAS-GERVAIS et al., 2003) und Ratten (Meister et al., 1990) nachgewiesen werden. Gleichzeitig zur verminderten AVT- und Galanin-Immunoreaktivität wurde in der vorliegenden Arbeit eine signifikante Aufregulation der Galanin und Galanin-Rezeptor Subtyp 1 (GalR1) mRNA im Hypothalamus dehydrierter Hennen nachgewiesen. Auch bei der Ratte konnte eine Aufregulation der Galanin- und GalR1-Genexpression nach osmotischer Stimulation beobachtet werden (MEISTER et al., 1990).

Beim Säuger haben zahlreiche Untersuchungen zur Funktion des AVT/Galanin-Systems stattgefunden. LANDRY et al (2000) zeigten eine reduzierte Wasseraufnahme bei Ratten nach zentraler Galanin-Induktion. Desweiteren konnte mit der gleichen Methode für Galanin eine Inhibition der AVP-Expression in SON und PVN und eine Reduktion der AVP-Freigabe (KONDO et al., 1993) dokumentiert werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen vermuten, dass Galanin im Kontrolltier inhibierend auf die AVT-Freisetzung im SON wirken könnte. Nach osmotischer Stimulation zeigen dehydrierter Hennen, neben einer verminderten AVT-ir, auch eine verminderte Galanin-ir in den magnozellulären Neuronen des SON. Während beim Säuger durch Galanin-Injektion, d.h. einer Erhöhung des Galanin-Peptidgehaltes eine Reduktion der Vasopressin-Freisetzung bewirkt wird, könnte im Umkehrschluss die verminderte Galanin-ir im SON dehydrierter Hennen, eine verstärkte Freisetzung des AVT aus diesem Bereich ermöglichen: Der deutlich erhöhte Plasma-AVT-Gehalt nach 48 Stunden Dehydrierung könnte einen erhöhten Transport des Vasotocins aus dem Soma der magnozellulären Neurone des SON in die Endterminalen der Neurohypophyse bedeuten, was die verminderte AVT-ir im SON dehydrierter Hennen erklären würde. Um eine solche Aussage zu stützen, müssten weiterführenden Untersuchungen zum axonalen Transport der beiden Neuropeptide in die Neurohypophyse normo- bzw dehydrierter Tiere durchgeführt werden. MEISTER et al (1990) wiesen bei Ratten nach 4 Tagen *saltloading* eine Verminderung der AVT- und Galanin-ir sowohl im SON und PVN als auch in der Neurohypophyse nach. Gleichzeitig stellten sie eine Erhöhung des mRNA-Gehaltes beider Gene in SON und PVN fest. In Ratten konnte nach 7 Tagen *saltloading* eine deutliche Verminderung der AVP-ir nicht nur im Soma, sondern auch in den Axonen magnozellulärer

Neurone des SON und PVN festgestellt werden (DELLMANN et al., 1988). MINK et al. (1986) wiesen bei Ratten (nach Adrenalectomie) nach einer osmotischen Stimulation eine deutlich verminderte AVP- und Oxytocin-ir in der inneren Zone der Eminentia mediana nach.

Desweiteren könnten Untersuchungen zur Rehydrierung nach osmotischer Stimulation weitere Erklärungen zur Funktion des Galanin in der Modulation des AVT-Systems liefern.

## **6.2 Einfluss der Dehydrierung auf Ovulation/Ovipositionszyklus der Henne**

Im weiblichen Tier reguliert Arginin-Vasotocin nicht nur den Wasserhaushalt, sondern auch die Eiablage. Mehrere Autoren konnten nachweisen, dass die Oviposition bei der Henne mit einem kurzfristigen Anstieg des Plasma-AVT-Gehaltes assoziiert ist (JURKEVICH et al., 2001; PANZICA et al., 2001; NOUWEN et al., 1984; TANAKA et al., 1984, SHIMADA et al., 1986). Schon RZASA (1978) beschrieb eine Kontraktion der Uterusmuskulatur als Reaktion auf AVT, die vermutlich über die Bindung des Hormons an seinen Rezeptor ausgelöst wird. Die Frage ist, ob sich der aufgrund eines osmotischen Stimulus erhöhte Plasma-AVT-Gehalt zusätzlich auf die Oviposition auswirkt. Während sich die Eier der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Kontrolltiere 9 Stunden nach Beginn des Lichtzyklus alle bereits in oder kurz vor der Schalendrüse befanden, konnte bei 50% der dehydrierten Hennen eine Verzögerung des Ovipositionszyklus bzw. der Ovulation festgestellt werden: Bei einer der acht dehydrierten Hennen befand sich das Ei (Eidotter + Eiklar) noch im Magnum, bei drei dehydrierten Hennen hatte noch keine erneute Ovulation stattgefunden. Eine natürliche Legepause dieser Tiere ist nicht grundsätzlich auszuschließen, doch nach Beobachtung ihrer Legeleistung seit Legebeginn eher unwahrscheinlich. Neben der Regulation der Oviposition vermutet man für AVT auch eine Funktion im Zusammenhang mit der Ovulation. SHIMADA et al. (1986) wiesen nach Induktion einer Ovulation durch Lutinisierendes Hormon-Releasing Hormon (LH-RH) einen signifikanten Anstieg des AVT-Gehaltes im Blut nach. Dieser blieb jedoch unterhalb des Oviposition-auslösenden Levels.

Gleichzeitig ist bekannt, dass sowohl im Uterus als auch im Ovar legender Hennen AVT lokal gebildet wird (SETH et al., 2004; SAITO et al., 1990). SAITO und GROSSMANN (1999) wiesen mittels RT-PCR geringe Mengen AVT mRNA in Ovar und Uterus nach. Bisher ist jedoch unklar, inwieweit das im Reproduktionstrakt synthetisierte AVT gemeinsam mit dem zirkulierenden Peptid Einfluss auf Ovulation und Oviposition nimmt, oder ausschließlich als parakriner Regulator des Reproduktionssystems agiert. KLEIN und GROSSMANN (2008)

zeigten im SON adulter Legehennen kurz vor der Oviposition einen deutlichen Anstieg und nach der Oviposition einen erneuten Abfall der AVT-Immunoreaktivität. Kurz nach der Oviposition konnten sie zudem eine erhöhte Kolo-kalisation der Galanin- und AVT-Immunoreaktivität in den magnozellulareren Neuronen des SON feststellen. SETH et al (2004) konnten parallel zu einem Anstieg der hypothalamischen AVT-mRNA einen Anstieg der AVT-Rezeptor 1 (VT1) mRNA im Uterus kurz nach der Oviposition nachweisen. Neben einer signifikanten Erhöhung des Plasma-AVT-Gehaltes zum Zeitpunkt der Oviposition, war hierbei keine Veränderung der Osmolalität nachzuweisen.

Trotz einer Erhöhung des Plasma-AVT-Spiegels dehydrierter Hennen kann während den ersten 11 bis 35 Stunden ohne Zugang zu Wasser keine eindeutige Unregelmäßigkeit in der Eiablage beobachtet werden. Dennoch bleibt eine Langzeitwirkung des permanent erhöhten AVT-Gehaltes im Blut dehydrierter Hennen nicht auszuschließen. Neben dem hormonellen Einfluss des AVT auf Ovulation/Oviposition während einer Dehydrierung, steigt mit der Eiablage zusätzlich der Wasserverlust. Nicht nur das Eidotter besteht zu 50% aus Wasser; zur Bildung der Kalkschale in der Schalendrüse wird ebenfalls Wasser benötigt. Es scheint somit unabdingbar, mit fortlaufender Dauer eines Wassermangels auf Sparmaßnahmen zurückzugreifen und die Reproduktion zu verlangsamen, wenn nicht gar einzustellen. Derart progressive Dehydrierungen von bis zu 96 Stunden wurden bisher nur an Hähnen durchgeführt (NOUWEN et al., 1984; ROBINZON et al. 1990). Somit gibt es bisher keine Daten über eine Veränderung der Legetätigkeit im weiteren Zeitverlauf einer Dehydrierung.

### **6.3 Nachweis der Galanin-Rezeptoren Typ 1 und Typ 2 in unterschiedlichen Geweben**

Das Vorkommen der Galanin Rezeptoren Typ 1 (GalR1) und Typ 2 (GalR2) in unterschiedlichen Geweben wurden bislang am ausführlichsten in der Ratte untersucht. In der vorliegenden Arbeit werden erstmals GalR1 und GalR2 mRNA des Huhns (*Gallus gallus*) in unterschiedlichen Geweben nachgewiesen.

Beim Huhn kann GalR1 mRNA im Gehirn, genauer im Hypothalamus, aber auch in Niere, Leber, Hoden und Nebenhoden nachgewiesen werden. Während in der vorliegenden Arbeit GalR1 mRNA ebenfalls in der Hypophyse des Huhns detektiert werden kann, weisen FATHI et al. (1997) ausschließlich GalR2 mRNA aber keine GalR1 mRNA in der Adenohypophyse der Ratte nach. Dieser Unterschied könnte auf das Vorhandensein von GalR1 mRNA in der

Neurohypophyse schließen lassen, da es sich bei der Untersuchung am Huhn um die RNA-Extraktion der Gesamt-Hypophyse handelte. Bemerkenswert ist zudem der Gehalt an GalR1 mRNA in der Hypophyse des Huhns. Er ist um ein 15,6faches höher verglichen zum Hypothalamus desselben Tieres. In zukünftigen Untersuchungen muss anhand einzelner Extraktionen der Adeno- bzw. Neurohypophyse die vermeintliche Diskrepanz der GalR1 mRNA-Expression innerhalb der Hypophyse zwischen Ratte und Huhn geklärt werden.

GalR2 mRNA lässt sich beim Huhn in allen in dieser Arbeit untersuchten Geweben nachweisen: Hypothalamus, Hypophyse, Muskel, Leber, Niere, Ovar und Tertiärfollikel des Huhns und Hoden und Nebenhoden des Hahns. Hierbei zeigen sich gewebeabhängige Unterschiede in der Menge vorhandener mRNA. Den höchsten Gehalt GalR2 mRNA findet man im Brustmuskel der Henne (cp 24), gefolgt von Leber (cp 26,5) und Hypophyse (cp 28,3), den geringsten dagegen im Hypothalamus (cp 35,5). Auch bei der Ratte kommt der Galanin Rezeptor Subtyp 2 in fast allen bisher untersuchten Geweben vor, darunter Gehirn, Adenohypophyse, Vas deferens, Prostata, Uterus, Ovar, Lunge, Nebenniere, Magen, Darm und Pankreas-Zellen (WYNICK et al., 1993; STEN SHI et al., 1997; SMITH et al., 1997; HOWARD et al., 1997, ANDREIS et al., 2007).

#### **6.4 Zusätzliche Transkriptvariante des Galanin beim Huhn (*Gallus gallus*)**

Zum Nachweis einer zusätzlichen Galanin-Transkriptvariante beim Huhn wurde in der vorliegenden Arbeit ein Primerpaar konstruiert, welches zwar im Galanin-Precursor aber außerhalb der Galanin-codierenden Sequenz liegt (Primerpaar Gal12). Nach einer 2,5 stündigen Auftrennung bei 50 Volt auf einem 2,5%igem Agarosegel wurde oberhalb einer deutlich abgegrenzten Galanin-mRNA Bande eine um ca. 70bp längere schwache Bande sichtbar. Die Sequenzierung der PCR-Produkte und der Vergleich mit der genomischen Sequenz des Huhns (Genome Sequencing Center, Washington Medical School, 2004) bestätigte die Vermutung, dass es sich bei der schwächeren Bande um eine zweite, um 69bp verlängerte Galanin-Transkriptvariante handelt.

Im Gegensatz zum 5kb langen Galanin-Gen der Ratte, welches aus 6 Exons und 5 Introns besteht, weist die genomische Sequenz des Huhns eine Länge von über 8kb auf, die sich aus 7 Exons und 6 Introns zusammensetzt. Vermutlich befindet sich auch hier, verglichen mit dem Galanin-Gen der Ratte (KAPLAN et al., 1988), der Transkriptionsstart auf Exon 1 (evtl. CATA-Box). Der Galanin-Precursor des Huhns beginnt ebenfalls auf Exon 2 und endet auf

dem siebten Exon, hier der Vergleichbarkeit wegen ebenfalls als Exon 6 bezeichnet. Das zusätzliche Exon 3b liegt innerhalb der Galanin-codierenden Sequenz. Die Aminosäure Histidin (H) an Stelle 14 des Galanins wird über das Basentriplett „cau“ codiert, wobei sich das „c“ auf Exon 3 und „au“ auf Exon 4 befinden. Durch Einschub des Exons 3b ändert sich die Triplettssequenz zu „cgt“ und damit zu Arginin (R). Das zusätzliche Exon hat eine Länge von 69bp und codiert für 25 Aminosäuren.

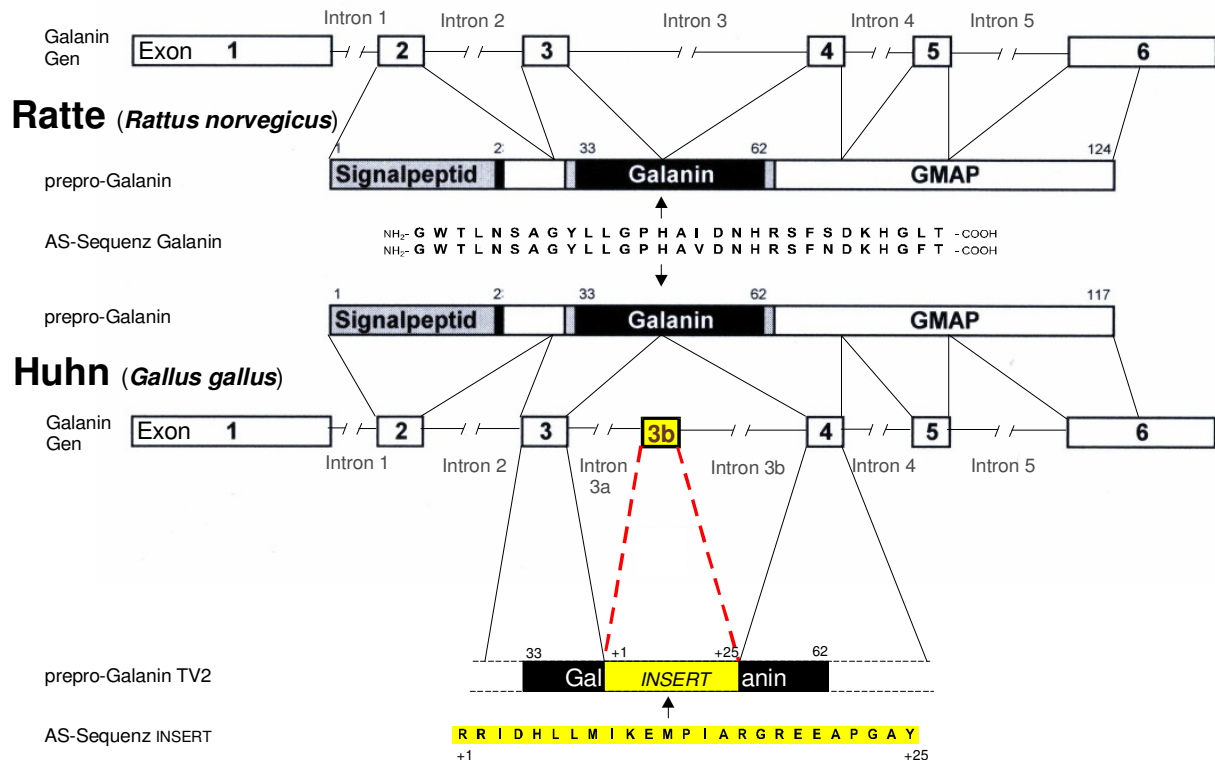


Abb. 6.1.: Vergleich Galanin-Genstruktur zwischen Ratte und Huhn

KOHCHI und TSUTSUI (2000) haben für die Wachtel ebenfalls ein verlängertes Galanin-Transkript nachgewiesen (Insert: 66bp). Auch hier wird Histidin durch Arginin ersetzt, was vermuten lässt, dass es sich bei der zusätzlichen Nukleotidsequenz ebenfalls um ein weiteres Exon handelt. Der Vergleich genomischer Sequenzen von Ratte, Maus, Mensch, Schimpanse, Hund, Rind, Huhn, und Zebrafisch (bereitetgestellt über die Datenbank des NCBI) zeigt, dass Huhn und Zebrafisch über das zusätzliche Exon (3b) verfügen, dieses bei Säugern jedoch fehlt. UNNIAPPAN et al. (2003) konnten insgesamt fünf Preprogalanin-Varianten auf zwei unterschiedlichen Galanin-Genen beim Goldfisch nachweisen, darunter auch die Varianten 1B und 2B, deren Aminosäuresequenzen eine etwa 60 prozentige Homologie zum Gal-TV2 des Huhns aufweisen. Bei der Schildkröte (*Pelodiscus sinensis*) wurde bisher

ausschließlich die Transkriptvariante des Galanins nachgewiesen, die sich auch bei Säugetieren finden lässt (YU et al., 2006). WANG et al. (1994) isolierten Galanin aus dem Magen des Alligators (*Alligator mississippiensis*). Das aus 29 Aminosäuren bestehende Peptid ist in den Aminosäuren 1-22 homolog zum Galanin des Schweins, des Schafs und der Ratte. Obwohl Vögel und Krokodile phylogenetisch enger verwandt sind, weist das Galanin des Alligators eine größere Homologie zum Galanin des Schafes auf (3 Aminosäure-Substitutionen) als zum Galanin des Huhns (4 Aminosäure-Substitutionen). Bisher gibt es keinen Hinweis auf das Vorkommen der zweiten Galanin-Transkriptvariante beim Alligator.

AS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24			
Huhn	5'-	R	R	I	D	H	L	L	M	I	K	E	M	P	I	A	R	G	R	E	E	A	P	G	A	Y	-3'
Wachtel	5'-	R	R	I	D	H	L	L	M	I	K	E	M	P	I	A	R	G	-	E	E	A	P	G	A	Y	-3'
Zebraberbling	5'-	R	R	I	D	H	L	I	Q	I	K	D	T	P	S	A	R	G	R	E	D	L	L	D	-	-	-3'
Goldfisch	5'-	R	R	I	D	H	L	I	Q	I	K	D	S	P	S	A	R	G	R	E	D	L	L	G	Q	Y	-3'

Abb. 6.2.: Aminosäuren-Sequenzvergleich des Galanin-Inserts (Exon 3b)

#### 6.4.1 Nachweis der beiden Galanin-Transkriptvarianten in verschiedenen Geweben

KOHCHI und TSUTSUI (2000) beschrieben als erste und bisher einzige das Vorkommen der zweiten Galanin-Transkriptvariante in unterschiedlichen Geweben der Wachtel. Mittels *realtime* PCR wiesen sie Galanin-mRNA in Gehirn, Darm, Ovar, Uterus und in geringeren Mengen in Leber und Eileiter nach. Gal-TV2 hingegen konnte nur in Gehirn, Darm, Ovar und Uterus gefunden werden. Der quantitativen Northern Blot Analyse zufolge kann die um das Insert verlängerte Gal-TV2 jedoch nur im Ovar nachgewiesen werden. Strittig bleibt zudem das Verhältnis Galanin-mRNA zu Gal-TV2-mRNA innerhalb eines Gewebes. Die Autoren geben nach Auswertung der Bandenintensitäten (Auftrennung auf einem 1,5% Agarosegel) ein Verhältnis Galanin/Gal-TV2 im Gehirn von 1:0,3, im Darm von 1:0,2, im Ovar von 1:0,6 und im Uterus von 1:0,1 an. Die Northern Blot Analyse zeigt hingegen ein deutlich stärkeres Signal für Gal-TV2 im Ovar als für Galanin. Leider gehen KOHCHI und TSUTSUI (2000) hierbei nicht auf einen Intensitätsvergleich ein und bieten keinerlei Erklärung für die unterschiedlichen Resultate der beiden verwendeten Methoden.

Nach dem Nachweis des Gal-TV2 mit dem Primerpaar Gal12 im Hypothalamus des Huhns und einem vergleichbaren Resultat zur Wachtel (starke Galanin-mRNA Bande, schwache Gal-TV2-mRNA Bande) wurde anhand der bekannten Sequenzdaten Primerpaare konstruiert,

die spezifisch Galanin-mRNA oder Gal-TV2-mRNA nachweisen konnten (Galanin: Gal52; Gal-TV2: Gal62). Der Vorteil eines Primerpaares für beide Transkriptvarianten ist die exakt gleiche Ausgangsmenge an cDNA, da die Reaktionen im gleichen Reaktionsansatz stattfinden. Der Nachteil dieser Methode jedoch ist, dass die gewählten Reaktionsbedingungen für eines der entstehenden PCR-Produkte optimaler eingestellt sein können als für das andere Produkt. Zudem könnte das unter den gegebenen Bedingungen schneller amplifizierte Produkt die Vervielfältigung des anderen Produkts hemmen. Mittels *realtime* PCR (Light Cycler, Roche Applied Science, Mannheim) wurden beide Transkriptvarianten einzeln nachgewiesen. Der relative Abgleich der eingesetzten cDNA Menge wurde hierbei über das Referenzgen 18S rRNA bestimmt. Die Galanin-mRNA des Huhns ließ sich in folgenden Geweben nachweisen: Hypothalamus, Hypophyse, Ovar und Niere der Henne, Hoden und Nebenhoden des Hahns. In allen beschriebenen Geweben außer dem Hoden fand sich ebenfalls die zweite Transkriptvariante des Galanins. In Muskel, Leber und Tertiärfollikel der Henne hingegen konnte keine der beiden Transkriptvarianten nachgewiesen werden. Relativ zu 18S-rRNA wurde stets mehr Galanin-mRNA amplifiziert als Gal-TV2. Der Gehalt an amplifizierter mRNA wurde hierbei über die Zyklenzahl definiert, nach deren Erreichen die Zunahme an mRNA exponentiell ansteigt (*crossing point*, *cp*). Je kleiner die Zyklenzahl, desto größer die Ausgangsmenge an vorhandener mRNA. Die größte Menge Galanin-mRNA findet man im Hypothalamus (*cp* 27,78), die geringste im Hoden (41,77). Die größte Menge Gal-TV2-mRNA kann ebenfalls im Hypothalamus nachgewiesen werden (*cp* 30,59), die geringste im Ovar (41,83). Die Zyklendifferenz zwischen Galanin und Gal-TV2 beträgt im Schnitt 2,45. Das bedeutet bei einer idealen PCR, in der mit jedem Zyklus eine Verdopplung der mRNA-Menge einhergeht, eine im Schnitt  $2^{2,45}$ -fach größere Menge Galanin-mRNA im Gewebe im Vergleich zu Gal-TV2. Ins Verhältnis gesetzt bedeutet das eine durchschnittliche Ratio von 1:0,18 Galanin-/Gal-TV2-mRNA. Im einzelnen ergeben sich folgende Verhältnisse: Hypothalamus 1:0,14, Hypophyse 1:0,2, Ovar 1:0,15, Niere 1:0,35 und Nebenhoden 1:0,14. Die abweichenden Verhältnisse für das Ovar zwischen der vorliegenden Arbeit und den veröffentlichten Daten bei der Wachtel (KOHCHI und TSUTSUI, 2000), könnten in der Gewinnung des Gewebes begründet sein. In der vorliegenden Arbeit wurden dem Ovar der Henne je zwei Follikel der drei Entwicklungsstadien entnommen und diese gemeinsam extrahiert. Auch die für den Hypothalamus gemessene Menge Gal-TV2-mRNA, lässt sich nicht direkt mit der für das gesamte Gehirn der Wachtel nachgewiesenen mRNA-Menge vergleichen. Die Tatsache, dass Galanin und Gal-TV2 in Ovar und Nebenhoden nachgewiesen werden konnten lässt



vermuten, dass beide Varianten einen Einfluss auf Follikel- bzw. Spermienreifung nehmen könnten. Das Fehlen beider Galaninvarianten im verwendeten Tertiärfollikel könnte am eventuellen Fehlen der Granulosazellen liegen. Weiterführende Versuche meiner Arbeitsgruppe legen die Vermutung nahe, dass Tertiärfollikel mit Granulosazellen Galanin und Gal-TV2 mRNA aufweisen, während bei Follikeln ohne Granulosazellen die Menge Galanin-mRNA an der Grenze der Nachweisbarkeit und Gal-TV2 nicht nachweisbar ist.

#### **6.4.2 Veränderung des mRNA-Gehaltes der Galanin-Transkriptvarianten nach osmotischer Stimulation**

Weder bei dehydrierten Hennen noch bei dehydrierten Hähnen kann eine signifikante Änderung der zweiten Galanin-Transkriptvariante nachgewiesen werden. Interessant ist jedoch, dass sich im Einzelnachweis der Gal-TV1 ebenfalls keine signifikante Regulation nachweisen lässt. Werden hingegen beide Transkriptvarianten gleichzeitig nachgewiesen, lässt sich im weiblichen Hypothalamus eine signifikante Aufregulation der Galanin mRNA feststellen. Es stellt sich die Frage, inwieweit Gal-TV2 überhaupt funktionell wirksam ist, zumal den in der Evolution später entwickelten Säugern diese Variante fehlt. Weiterführende Experimente sollten die Expression der zweiten Galanin-Transkriptvariante zum einen unter anderen physiologischen Stimulationen (z.B. Futterentzug), zum anderen in unterschiedlichen Geweben untersuchen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass osmotische Stimulation beim Vogel zu einer Aktivierung des AVT-Systems führt, wobei eine Erhöhung des Plasma-AVT-Gehaltes, eine Aufregulation der AVT-RNA im Hypothalamus und eine gleichzeitige Verminderung der AVT-ir im SON adulter Hennen nachgewiesen wird. 48 Stunden Dehydrierung resultiert ebenfalls in einer Veränderung des Galanin-Systems: Dehydrierte Hennen zeigen eine Erhöhung der hypothalamischen Galanin- und Galanin-Rezeptor Subtyp 1-mRNA und eine Verminderung der Galanin-ir in magnozellulären Neuronen des SON. Eine differenzierte Betrachtung des SON zeigt, dass einzelne Bereiche des Nukleus unterschiedlich auf osmotische Stimulation reagieren. Zukünftige Aussagen über Veränderungen innerhalb des untersuchten Systems sollten demnach um die vergleichende Betrachtung der einzelnen Bereiche inklusive des SON pars externalis ergänzt werden.

Aus dem Nachweis der Galanin-Rezeptor Subtypen 1 und 2, sowie einer zusätzlichen Galanin-Transkriptvariante ergeben sich zukünftig weitere Möglichkeiten, die Funktion des Neuropeptids Galanin als Modulator des AVT-Systems unter unterschiedlichen

physiologischen Stimuli zu untersuchen. Auch für die Interpretation bisher durchgeführter Untersuchungen wäre es wichtig, zu klären, ob die zusätzliche Galanin-Transkriptvariante (Gal-TV2) ausschließlich als mRNA vorliegt, oder ob sie zu einem aktiven Neuropeptid translatiert wird. Zudem bleibt die Frage zu klären, ob Gal-TV2-mRNA bzw. ein eventuelles Galanin-TV2-Peptid unter verschiedenen physiologischen Bedingungen funktionell wirksam ist.

## 7 Zusammenfassung

Das aus neun Aminosäuren bestehende Neuropeptid Arginin-Vasotocin (AVT) des Vogels wird in neurosekretorischen Neuronen des Hypothalamus synthetisiert und axonal in die Neurohypophyse transportiert, um von dort in das Blut sezerniert zu werden. Wie sein Säuger-Analog Arginin-Vasopressin reguliert AVT beim Huhn (*Gallus gallus*) die Homöostase des Wasserhaushaltes. Zudem übernimmt es regulatorische Funktion bei der Oviposition, die im Säuger bei Geburt und Laktation dem Oxytocin zugeschrieben werden. Neben AVT kann auch Galanin in magnozellulären Neuronen des SON unter unterschiedlichen physiologischen Bedingungen nachgewiesen werden. Galanin ist ein aus 29 Aminosäuren bestehendes Neuropeptid, das im Zentralnervensystem (ZNS) vor allem in ventralen Gehirnregionen (u.a. Amygdala, Hypothalamus) nachgewiesen wurde. Galanin moduliert im ZNS die Regulation des Neuroendokrinen Systems über die Bindung an spezifische Rezeptoren.

Eine Kolokalisation der beiden Neuropeptide AVT und Galanin in magnozellulären Neuronen des SON wurde bisher a) bei adulten Hennen kurz nach der Oviposition und b) bei adulten Hähnen nach osmotischer Stimulation nachgewiesen.

Ziel dieser Arbeit war es, die Auswirkungen einer osmotischen Stimulation durch Wasserentzug auf die Expression der beiden Neuropeptide AVT und Galanin zu klären. Dabei sollten zum einen der Peptidgehalt beider Peptide sowie ihre Kolokalisation im SON, zum anderen die Regulation der Genexpression der Neuropeptide und der spezifischen Galanin-Rezeptoren im Hypothalamus untersucht werden. Um zu klären, ob sich, aufgrund der zusätzlich oxytocinergen Wirkung des AVT, die Reaktionen auf einen osmotischen Stimulus zwischen den Geschlechtern unterscheidet, wurden die Experimente sowohl an adulten Hennen als auch an adulten Hähnen der Rasse LSL (Lohmann selected White Leghorn) durchgeführt. Um die Tiere osmotisch zu stimulieren, wurden sie einem 48stündigen Wasserentzug (Dehydrierung) ausgesetzt. Die Wirkung der Dehydratation wurden über die Bestimmung der Plasma Osmolalität, sowie Natrium- und AVT-Konzentrationen ermittelt. Zum Nachweis beider Peptide im SON sowie ihre Kolokalisation wurde eine immunhistochemische Methode unter Verwendung von Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern (Doppelfärbung) mit der Laser-Raster-Mikroskopie kombiniert. Die Ergebnisse zeigen nach 48 Stunden Dehydrierung eine verminderte AVT-Immunoreaktivität im SON weiblicher Tiere und eine Verminderung der Galanin-Immunoreaktivität im SON verbunden mit einer verminderten Kolokalisation beider Peptide in beiden Geschlechtern. Zur genaueren

Betrachtung wurde der SON in fünf morphologisch differenzierbare Regionen unterteilt. Hierbei konnte im SON pars externalis (SONe) ein Geschlechtsdimorphismus im stimulierten System beobachtet werden. Mittels *realtime* PCR wurde im weiblichen Hypothalamus eine Aufregulation sowohl der Galanin-Expression als auch der Expression des Galanin Rezeptors Subtyp 1 nachgewiesen. Aufgrund der individuellen Schwankungen erreichte die Aufregulation der AVT-Expression jedoch keine Signifikanz. Bei Hähnen konnte in keiner der untersuchten Genexpressionen eine signifikante Veränderung nachgewiesen werden. Um eine Aussage über den Einfluss der osmotischen Stimulation auf den Ovipositionszyklus zu erhalten, wurde der Legedarm normo- und dehydrierter Hennen auf die Position des darin befindlichen Eies hin untersucht. 50% der dehydrierten Hennen zeigten eine Verzögerung des Ovipositionszyklus.

Da die Galanin-Rezeptoren Subtyp 1 und 2 des Huhns bisher auf Transkriptebene noch nicht beschrieben sind, sie zudem bei der Ratte nachweislich nicht nur im ZNS, sondern auch in peripheren Geweben exprimiert werden, wurden ihr Vorkommen mittels *realtime* PCR in unterschiedlichen Geweben des Huhns untersucht. Der Galanin Rezeptor Subtyp 1 kann in Hypothalamus, Hypophyse, Hoden, Leber, Niere und Nebenhoden nachgewiesen werden, Galanin Rezeptor Subtyp 2 zusätzlich in Ovar, Muskel und Follikel.

Nachdem sowohl bei der Wachtel als auch beim Goldfisch eine zweite Transkriptvariante des Galanin-Vorläuferhormons nachgewiesen wurde, sollte festgestellt werden, ob auch das Huhn über eine solche Transkriptvariante verfügt. Die Ergebnisse bestätigen, dass beim Huhn a) ebenfalls eine zweite Transkriptvariante (Gal-TV2) des Galanin-Precursors existiert und b) die zusätzliche Sequenz (Insert) der Transkriptvariante ebenfalls auf einem eigenen Exon (3b) liegt. Beide Transkriptvarianten wurden anschließend spezifisch auf ihr Vorkommen in unterschiedlichen Geweben hin untersucht. Sowohl Galanin (Transkriptvariante 1) als auch Gal-TV2 sind in Hypothalamus, Hypophyse, Ovar, Niere und Nebenhoden nachweisbar. Im Hoden kann ausschließlich Galanin, nicht aber Gal-TV2 nachgewiesen werden. Während die gesamt-Galanin-Expression (beide Transkriptvarianten gleichzeitig nachgewiesen) im weiblichen Hypothalamus nach osmotischer Stimulation signifikant aufreguliert ist, erreicht die Expression der spezifisch nachgewiesenen Transkriptvarianten keine Signifikanz.

## 8 Summary

The avian neuropeptide arginine-vasotocin (AVT) consists of nine amino acids and is synthesized in neurosecretory neurons of the hypothalamus. By axonal transport it reaches the neuronal lobe of the pituitary gland to be secreted in the blood. Similar to its mammalian analogue arginine-vasopressin (AVP) AVT regulates homeostasis of water balance. Furthermore, it acts as regulator of reproduction, especially oviposition-control.

Galanin is another neuropeptide proven in magnocellular neurons of SON under different physiological conditions as well as ventral brain regions (namely amygdala or hypothalamus). It contains 29 amino acids and is involved in the regulation of neuroendocrine system by binding to specific receptors.

Both neuropeptides can be found co-localized in the brain of a) adult hens shortly after oviposition and b) adult cocks as a result of osmotic stimulation.

Aim of this study was to analyze effects of osmotic stimulation by water deprivation on expression of AVT and Galanin. To this end, the content of both peptides in the supraoptic nucleus (SON) as well as their co-localization was examined. Another experimental focus laid on investigation of the regulation of gene-expression of these two neuropeptides and additionally of the two galanin receptor-subtypes in the hypothalamus.

All experiments were performed in male and female chickens (*Gallus gallus*) of Lohmann selected White Leghorn strain (LSL) to answer the question whether a possible sex dimorphism in regulation of water balance exists.

Osmotic stimulation was performed by dehydration for 48 hours. Blood sodium concentration, plasma osmolality and plasma AVT concentrations confirmed the physiological effects of dehydration. Double-labelling immunohistochemistry with fluorescent antibodies in combination with laser-scanning-microscopy were used to show co-localization of the two neuropeptides in magnocellular neurons of the SON.

After 48 hours of dehydration a decrease of AVT-immunoreactivity (in hens) as well as a decrease of Galanin-immunoreactivity involving a reduced co-localization of these peptides (in both sexes) within the SON was apparent compared to controls (normohydrated animals of both sexes).

A sexdimorphism was evident in the SON pars externalis (SONe) in the osmotically stimulated animals. By *realtime* PCR experiments a significant up regulation of galanin as well as of its receptor subtype 1 and a small upregulation of AVT-expression in female chicken was found. In contrast osmotic stimulation affected neither galanin nor AVT

expression significantly in males. The position of ovulated follicles within the oviduct reflects the influence of osmotic stimulation: compared to normohydrated hens, 50% of the dehydrated hens showed a delay in the oviposition cycle identified via ovulated follicles being late in development.

This study shows for the first time expression of galanin receptors on transcriptional level in chicken: *realtime* PCR shows galanin receptor subtype 1 being expressed in hypothalamus, pituitary gland, liver, kidney, testis und epididymis and subtype 2 being expressed in ovary, muscle and follicles. These results are in accordance with findings in the rat, where both galanin receptor subtypes (1 and 2) are located not only in the CNS but also in other tissues.

Likewise results in quail and goldfish concerning a splicing variant of Galanin mRNA a second transcriptional variant of the galanin precursor (GAL-TV2) exists and the additional sequence (insert) of this transcript is located on an additional exon (3b). Both transcript variants, galanin (GAL-TV1) as well as GAL-TV2 were detectable in the following tissues: hypothalamus, pituitary gland, ovary, kidney and epididymis, except the testis, where only GAL-TV1 was found. While the entire galanin expression of both transcript variants (GAL-TV1+GAL-TV2) significantly increased in the female hypothalamus after osmotic stimulation, a significant difference in expression of neither TV1 nor of TV 2 was evident.

## 9 Literaturverzeichnis

**Acher R, Chauvet J und Chauvet MT (1970):**

Phylogeny of the neurohypophysial hormones. The avian active peptides.  
Eur J Biochem 17 (3):509-513.

**Acher R (1980):**

Molecular evolution of biologically active polypeptides.  
Proc Royal Society, London B210:21-43.

**Acher R (1985):**

The nonmammalian-mammalian transition through neurohypophysial peptides.  
Peptides 6 (3):309-314.

**Acher R and Chauvet J (1988):**

Structure, processing and evolution of the neurohypophysial hormone-neurophysin precursors.  
Biochimie 70 (9):1197-1207.

**Acher R (1993):**

Neurohypophysial peptide systems: processing machinery, hydrosmotic regulation, adaptation and evolution.  
Regul Pept 45 (1-2):1-13.

**Acher R (1996):**

Molecular evolution of fish neurohypophysial hormones: neutral and selective evolutionary mechanisms.  
Gen Comp Endocrinol 102 (2):157-172.

**Akabayashi A, Zaia CTBV, Koenig JI, Gabriel SM, Silva I und Leibowitz SF (1994):**

Diurnal rhythm of galanin-like immunoreactivity in the paraventricular and suprachiasmatic nuclei and other hypothalamic areas.  
Peptides 15 (8):1437-1444.

**Albeck DS, Hastings NB und McEwen BS (1994):**

Effects of adrenalectomy and type I or type II glucocorticoid receptor activation on AVP and CRH mRNA in the rat hypothalamus.  
Mol Brain Res 26 (1-2):129-134.

**Alting-Mees MA und Short JM (1989):**

pBluescript II: gene mapping vectors.  
Nucl.Acids Res. 17 (22):9494.

**Alwine JC, Kemp DJ und Stark GR (1977):**

Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes.  
Proc Natl Acad Sci USA 74 (12):5350-5354.

**Amaya F, Tanaka M, Tamada Y, Tanaka Y, Nilaver G und Iyata Y (1999):**

The influence of salt loading on vasopressin gene expression in magno- and parvocellular hypothalamic neurons: An immunocytochemical and in situ hybridization analysis.  
Neuroscience 89 (2):515-523.

**Andreis PG, Malendowicz LK, Rebuffat P, Spinazzi R, Ziolkowska A und Nussdorfer GG** (2007):

Galanin enhances corticosterone secretion from dispersed rat adrenocortical cells through the activation of GAL-R1 and GAL-R2 receptors coupled to the adenylate cyclase-dependent signaling cascade.

Int J Mol Med 19 (1):149-155.

**Appenrodt E, Schnabel R und Schwarzberg H** (1998):

Vasopressin administration modulates anxiety-related behavior in rats.

Physiol Behav 64 (4):543-547.

**Arad Z und Skadhauge E** (1984):

Plasma hormone (arginine vasotocin, prolactin, aldosterone, corticosterone) in relation to hydration state.

J Exp Zool 232:707-714.

**Arad Z, Arnason SS, Chadwick A und Skadhauge E** (1985):

Osmotic and hormonal responses to heat and dehydration in the fowl.

J Comp Physiol 155B:227-234.

**Armstrong WE, Scholer J und McNeill TH** (1982):

Immunocytochemical, Golgi and electron microscopic characterization of putative dendrites in the ventral glial lamina of the rat supraoptic nucleus.

Neuroscience 7 (3):679-694.

**Arnason SS, Rice GE, Chadwick A und Skadhauge E** (1986):

Plasma levels of arginine vasotocin, prolactin, aldosterone and corticosterone during prolonged dehydration in the domestic fowl: effect of dietary NaCl.

J Comp Physiol B 156B:383-397.

**Barakat Y, Pape JR, Boutahricht M, El Ouezzani S, Alaoui A, Chaigniau M, Barakat L, Tramu G und Magoul R** (2006):

Vasopressin-containing neurons of the hypothalamic parvocellular paraventricular nucleus of the jerboa: plasticity related to immobilization stress.

Neuroendocrinology 84 (6):396-404.

**Barat C, Simpson L und Breslow E** (2004):

Properties of Human Vasopressin Precursor Constructs: Inefficient Monomer Folding in the Absence of Copeptin as a Potential Contributor to Diabetes Insipidus.

Biochemistry 43 (25):8191-8203.

**Bartfai T, Hökfelt T und Langel U** (1993):

Galanin - a neuroendocrine peptide.

Crit Rev Neurobiol 7 (3-4):229-274.

**Barth SW, Bathgate RA, Mess A, Parry LJ, Ivell R und Grossmann R** (1997):

Mesotocin gene expression in the diencephalon of domestic fowl: cloning and sequencing of the MT cDNA and distribution of MT gene expressing neurons in the chicken hypothalamus.

J Neuroendocrinol 9 (10):777-787.

**Barth SW und Grossmann R** (2000):

Localization of arginine vasotocin (AVT) mRNA in extrasomal compartments of magnocellular neurons in the chicken hypothalamo-neurohypophysial system.

Comp Biochem Physiol 125B (2):189-195.



**Baylis PH und Robertson GL** (1980):

Plasma vasopressin response to hypertonic saline infusion to assess posterior pituitary function. *J R Soc Med* 73 (4):255-260.

**Beck B, Kozak R, Moar KM und Mercer JG** (2006):

Hypothalamic orexigenic peptides are overexpressed in young Long-Evans rats after early life exposure to fat-rich diets. *Biochem Biophys Res Commun* 342 (2):452-458.

**Bernroider G und Leutgeb S** (1994):

V1-receptor mediated effects of vasotocin on motivational, mnemonic and aversive components of sexual learning in quail. *Soc Neurosci Abst* 20:1602-1610.

**Bourque CW, Oliet SH und Richard D** (1994):

Osmoreceptors, osmoreception and osmoregulation. *Front Neuroendocrinol* 15:231-274.

**Branchek TA, Smith KE, Gerald C und Walker MW** (2000):

Galanin receptor subtypes. *Trends Pharmacol Sci* 21 (3):109-117.

**Brewer G und Ross J** (1988):

Poly(A) shortening and degradation of the 3' A+U-rich sequences of human c-myc mRNA in a cell-free system. *Mol Cell Biol* 8 (4):1697-1708.

**Bridges TE und James NV** (1982):

The hypothalamo-neurohypophysial system of native Australian desert rodents. The vasopressin and oxytocin contents of hypothalamus and posterior pituitary of *Notomys alexis* and *Pseudomys australis* compared with those of the laboratory rat and mouse in different states of water balance. *Aust J Exp Biol Med Sci* 60 (3):265-283.

**Burazin TCD, Larm JA und Gundlach AL** (2001):

Regulation by Osmotic Stimuli of Galanin-R1 Receptor Expression in Magnocellular Neurons of the Paraventricular and Supraoptic Nuclei of the Rat. *J Neuroendocrinol* 13 (4):358-370.

**Burbach JP, Luckman SM, Murphy D und Gainer H** (2001):

Gene Regulation in the Magnocellular Hypothalamo-Neurohypophysial System. *Physiol Rev* 81 (3):1197-1267.

**Cabuk S** (2007):

Upregulation and changes in expression pattern of Arg-vasotocin and galanin after water deprivation in male chickens. Dissertation, Tiermedizinische Hochschule Hannover.

**Cajal S** (1894):

Algunas contribuciones al conocimiento de los ganglios del encefalo. *An de la Soc Esp Hist Nat* 23:214.

**Caldwell H und Young W** (2006):

Oxytocin and Vasopressin: Genetics and Behavioral Implications. *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology* Verlag: Springer US:573-607.

**Carrazana EJ, Pasiaka KB und Majzoub JA (1988):**

The vasopressin mRNA poly(A) tract is unusually long and increases during stimulation of vasopressin gene expression in vivo.

Mol Cell Biol 8 (6):2267-2274.

**Carter DA und Murphy D (1989):**

Independent regulation of neuropeptide mRNA level and poly(A) tail length.

J Biol Chem 264 (12):6601-6603.

**Carter DA und Murphy D (1991):**

Rapid changes in poly (A) tail length of vasopressin and oxytocin mRNAs form a common early component of neurohypophyseal peptide gene activation following physiological stimulation.

Neuroendocrinology 53 (1):1-6.

**Castel M, Gainer H und Dellmann HD (1984):**

Neuronal secretory systems.

Int Rev Cytol 88:303-459.

**Chaturvedi CM, Newton BW, Cornett LE und Koike TI (1994):**

An in situ hybridization and immunohistochemical study of vasotocin neurons in the hypothalamus of water-deprived chickens.

Peptides 15 (7):1179-1187.

**Chaturvedi CM, Zheng Z, Shimada K, Cornett LE und Koike TI (1996):**

Changes in poly(A) tail length of arginine vasotocin messenger ribonucleic acid in the hypothalamus of water-deprived chickens.

Gen Comp Endocrinol 103 (3):316-322.

**Chaturvedi CM, Cornett LE und Koike TI (1997):**

Arginine vasotocin gene expression in hypothalamic neurons is up-regulated in chickens drinking hypertonic saline: an in situ hybridization study.

Peptides 18 (9):1383-1388.

**Chaturvedi CM, Chowdhary A, Wall PT, Koike TI und Cornett LE (2000):**

A Sexual Dimorphism in Hypothalamic Arginine Vasotocin (AVT) Gene Expression and AVT Plasma Levels in the Japanese Quail (*Coturnix coturnix japonica*) in Response to Water Deprivation.

Gen Comp Endocrinol 117 (1):129-137.

**Choy VJ und Watkins WB (1977):**

Immunocytochemical study of the hypothalamo-neurohypophysial system. II. Distribution of neurophysin, vasopressin and oxytocin in the normal and osmotically stimulated rat.

Cell Tissue Res 180 (4):467-490.

**Cisowska-Maciejewska A und Ciosek J (2006):**

Galanin influences vasopressin and oxytocin release from the hypothalamo-neurohypophysial system of salt loaded rats.

J Physiol Pharmacol 56 (4):673-688.

**Corness J, Stevens B, Fields RD und Hökfelt T (1998):**

NGF and LIF both regulate galanin gene expression in primary DRG cultures.

Neuroreport 9 (7):1533-1536.

**de Bree FM** (2000):

Trafficking of the Vasopressin and Oxytocin Prohormone Through the Regulated Secretory Pathway.  
J Neuroendocrinol 12 (6):589-594.

**De Wied D** (1965):

The influence of the posterior and intermediate lobe of the pituitary and pituitary peptides on the maintenance of a conditioned avoidance in rats.  
Int J Neuropharmacol 4:157-167.

**Degerman A, Chun D, Nguyen TB, Bravo DT, Alanis J, Rokäeus A und Waschek JA** (2002):

Local action of estrogen and thyroid hormone on vasoactive intestinal peptide (VIP) and galanin gene expression in the rat anterior pituitary.  
Neuropeptides 36 (1):50-57.

**Dellmann HD, Rodriguez EM, Pena P und Siegmand I** (1988):

Immunohistochemical investigation of the magnocellular peptidergic hypothalamo-neurohypophysial system of the rat chronically stimulated by long-term administration of hypertonic saline.  
Neuroendocrinology 47 (4):335-342.

**du Vigneaud V, Ressler C und Trippett S** (1953):

The sequence of amino acids in Oxytocin, with a proposal for the structure of oxytocin.  
J Biol Chem 205 (2):949-957.

**Dudley HW** (1919):

Some observations on the active principles of the pituitary gland.  
J Pharma Expl Therap 14 (4):295-312.

**Dudley HW** (1923):

On the active principles of the pituitary gland.  
J Pharma Exp Therap 21 (2):103-122.

**Engelmann M, Ebner K, Landgraf R und Wotjak CT** (2006):

Effects of Morris water maze testing on the neuroendocrine stress response and intrahypothalamic release of vasopressin and oxytocin in the rat.  
Horm Behav 50 (3):496-501.

**Erhard A, Müller MB, Rodel A., Welt T, Ohi F, Holsboer F und Keck ME** (2008):

Consequences of chronic social stress on behaviour and vasopressin gene expression in the PVN of DBA/2OlaHsd mice - influence of treatment with the CRHR1-antagonist R121919/NBI 30775.  
J Psychopharmacol (online veröffentlicht).

**Eriksson M, Ceccatelli S, Uvnäs-Moberg K, Iadarola M und Hökfelt T** (1996):

Expression of Fos-related antigens, oxytocin, dynorphin and galanin in the paraventricular and supraoptic nuclei of lactating rats.  
Neuroendocrinology 63 (4):356-367.

**Evans HF und Shine J** (1991):

Human galanin: molecular cloning reveals a unique structure.  
Endocrinology 129 (3):1682-1684.

**Fathi Z, Cunningham AM, Iben LG, Battaglini PB, Ward SA, Nichol KA, Pine KA, Wang J, Goldstein ME, Iismaa TP und Zimanyi IA (1997):**

Cloning, pharmacological characterization and distribution of a novel galanin receptor.  
Mol Brain Res 51 (1-2):49-59.

**Faure-Virelizier C, Croix D, Bouret S, Prevot V, Reig S, Beauvillain JC und Mitchell V (1998):**

Effects of Estrous Cyclicity on the Expression of the Galanin Receptor Gal-R1 in the Rat Preoptic Area: A Comparison with the Male.  
Endocrinology 139 (10):4127-4139.

**Feinberg AP und Vogelstein B (1983):**

A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity.  
Anal Biochem 132 (1):6-13.

**Fyhrquist F, Tikkanen I und Linkola J (1981):**

Plasma vasopressin concentration and renin in the rat: effect of hydration and hemorrhage.  
Acta Physiol Scand 113 (4):507-510.

**Gai WP, Geffen LB und Blessing WW (1990):**

Galanin immunoreactive neurons in the human hypothalamus: colocalization with vasopressin-containing neurons.  
J Comp Neurol 298 (3):265-280.

**Gainer H (1983):**

Precursors of vasopressin and oxytocin.  
Prog Brain Res 60:205-215.

**Gainer H und Wray S (1992):**

Oxytocin and vasopressin. From genes to peptides.  
Ann N Y Acad Sci 12 (652):14-28.

**Gentleman SM, Falkai P, Bogerts B, Herrero MT, Polak JM und Roberts GW (1989):**

Distribution of galanin-like immunoreactivity in the human brain.  
Brain Res 505 (2):311-315.

**Glasgow E, Kusano K, Chin H, Mezey É, Young III WS und Gainer H (1999):**

Single Cell Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction Analysis of Rat Supraoptic Magnocellular Neurons: Neuropeptide Phenotypes and High Voltage-Gated Calcium Channel Subtypes.  
Endocrinology 140 (11):5391-5401.

**Gray D und Simon C (1983):**

Mammalian and avian antidiuretic hormone: studies related to possible species variation in osmoregulatory systems.  
J Comp Physiol 151B:241-246.

**Gray DA und Simon E (1987):**

Dehydration and arginine vasotocin and angiotensin II in CSF and plasma of pekin ducks.  
Am J Physiol 253 (2):R285-R291.

**Gray DA und Erasmus T (1988):**

Plasma arginine vasotocin and angiotensin II in the water deprived Kelp gull (*Larus dominicanus*), Cape gannet (*Sula capensis*) and Jackass penguin (*Spheniscus demersus*).  
Comp Biochem Physiol 91A (4):727-732.

**Grossmann R, Jurkevich A und Köhler A (2002):**

Sex dimorphism in the avian arginine vasotocin system with special emphasis to the bed nucleus of the stria terminalis.

Comp Biochem Physiol 131:833-837.

**Gundlach AL, Burazin TCD und Larm JA (2001):**

Distribution, regulation and role of hypothalamic galanin systems: Renewed interest in a pleiotropic peptide family.

Clin Exp Pharm Physiol 28 (1-2):100-105.

**Gustafson EL, Smith KE, Durkin MM, Gerald C und Branchek TA (1996):**

Distribution of a rat galanin receptor mRNA in rat brain.

Neuroreport 7 (4):953-957.

**Habert-Ortoli E, Amiranoff B, Loquet I, Laburthe M und Mayaux J (1994):**

Molecular Cloning of a Functional Human Galanin Receptor.

Proc Natl Acad Sci USA 91 (21):9780-9783.

**Hamann D, Hunt N und Ivell R (1992):**

The Chicken Vasotocin Gene.

J Neuroendocrinol 4 (4):505-513.

**Hassinen E, Pyörnilä A und Hissa R (1999):**

Cardiovascular and thermoregulatory responses to vasotocin and angiotensin II in the pigeon.

Comp Biochem Physiol 123A (3):279-285.

**Hatton GI, Perlmutter LS, Salm AK und Tweedle CD (1984):**

Dynamic neuronal-glia interactions in hypothalamus and pituitary: Implications for control of hormone synthesis and release.

Peptides 5 (Supplement 1):121-138.

**Hatton GI und Yang QZ. (1996):**

Synaptically released histamine increases dye coupling among vasopressinergic neurons of the supraoptic nucleus: mediation by H1 receptors and cyclic nucleotides.

J Neurosci 16 (1):123-129.

**Heller H (1939):**

The effect of the hydrogen-ion concentration on the stability of the antidiuretic and vasopressor activities of posterior pituitary extracts.

J Physiol 96 (3):337-347.

**Helmreich DL, Watkins LR, Deak T, Maier SF, Akil H und Watson SJ (1999):**

The effect of stressor controllability on stress-induced neuropeptide mRNA expression within the paraventricular nucleus of the hypothalamus.

J Neuroendocrinol 11 (2):121-128.

**Hemingway A und Peterson JM (1929):**

The anti-diuretic effect of the separated principles of the pituitary body.

J Physiol 68 (3):238-246.

**Herman JP, Wiegand SJ und Watson SJ (1990):**

Regulation of basal corticotropin-releasing hormone and arginine vasopressin messenger ribonucleic acid expression in the paraventricular nucleus: effects of selective hypothalamic deafferentations.

Endocrinology 127 (5):2408-2417.

**Hinton GE** (1992):

Wie neuronale Netze aus Erfahrung lernen.  
Spektrum der Wissenschaft 11:142.

**Ho MY und Murphy D** (2002):

The vasopressin gene non-canonical Hogness box: effect on protein binding and promoter function.  
Mol Cell Endocrinol 186 (1):17-25.

**Howard A., Tan C, Shiao LL, Palyha OC, McKee KK, Weinberg DH, Feighner SD, Cascieri MA, Smith RG, Van Der Ploeg LHT und Sullivan KA** (1997):

Molecular cloning and characterization of a new receptor for galanin.  
FEBS Letters 405 (3):285-290.

**Hughes MR, Bennett DC, Gray DA, Sharp PJ und Poon AM** (2006):

Influences of sex and saline intake on diurnal changes in plasma melatonin and osmoregulatory hormones of Pekin ducks (*Anas platyrhynchos*).  
Gen Comp Endocrinol 149 (2):124-133.

**Husain MK, Fernando N, Shapiro M, Kagan A und Glick SM** (1973):

Radioimmunoassay of arginine vasopressin in human plasma.  
J Clin Endocrinol 87 (2):616.

**Hwang IK, Yoo KY, Kim DS, Do SG, Oh YS, Kang TC, Han BH, Kim JS und Won MH** (2004):

Expression and changes of galanin in neurons and microglia in the hippocampus after transient forebrain ischemia in gerbils.  
Brain Res 1023 (2):193-199.

**Iismaa TP und Shine J** (1999):

Galanin and galanin receptors.  
Results Probl Cell Differ 26:257-291.

**Ivanyi T, Wiegand VM und De Wied D** (1991):

Distal effects of emotional and physical stress on the central and peripheral secretion of neurohypophysial hormones in male rats.  
Life Sci 48:1309-1316.

**Ivanyi T, Dohanics J und Verbalis JG** (1995):

Effect of chronic hyponatremia on the central and peripheral oxytocin and vasopressin secretion in rats.  
Neuroendocrinology 61:412-420.

**Ivell R, Schmale H und Richter D** (1983):

Vasopressin and oxytocin precursors as model prohormones.  
Neuroendocrinology 37 (3):235-240.

**Ivell R und Richter D** (1984):

The gene for the hypothalamic peptide hormone oxytocin is highly expressed in the bovine corpus luteum: biosynthesis, structure and sequence analysis.  
EMBO J 3 (10):2351-2354.

**Jirikowski GF, Sanna PP und Bloom FE** (1990):

mRNA coding for oxytocin is present in axons of the hypothalamo-neurohypophysial tract.  
Proc Natl Acad Sci USA 87 (19):7400-7404.

**Jorgensen H, Knigge U, Kjaer A und Warberg J (2002):**

Serotonergic involvement in stress-induced vasopressin and oxytocin secretion.  
Eur J Endocrinol 147 (6):815-824.

**Jozsa R und Mess B (1993):**

Galanin-like immunoreactivity in the chicken brain.  
Cell Tissue Res 273 (2):391-399.

**Jurkevich A, Barth SW und Grossmann R (1997):**

Sexual dimorphism of Arg-vasotocin expressing neurons in the telencephalon and dorsal diencephalons of domestic fowl: immunocytochemical and in situ hybridisation study.  
Cell Tissue Res 287:69-77.

**Jurkevich A, Barth SW, Kuenzel WJ, Köhler A und Grossmann R (1999):**

Development of sexually dimorphic vasotocinergic system in the bed nucleus of stria terminalis in chickens.  
J Comp Neurol 408 (1):46-60.

**Jurkevich A, Grossmann R, Balthazart J und Viglietti-Panzica C (2001):**

Gender-Related Changes in the Avian Vasotocin System During Ontogeny.  
Micro Res Tech 55:27-36.

**Kalimo H (1975):**

Ultrastructural studies on the hypothalamic neurosecretory neurons of the rat.  
Cell Tissue Res 163 (2):151-168.

**Kamm O, Aldrich TB, Grote IW, Rowe LW und Bugbee EP (1928):**

The active principles of the posterior lobe of the pituitary gland. 1 I. The demonstration of the presence of two active principles. II. the separation of the two principles and their concentration in the form of potent solid.  
J Am Chem Soc 50 (2):573-601.

**Kaplan LM, Spindel ER, Isselbacher KJ und Chin WW (1988):**

Tissue-Specific Expression of the Rat Galanin Gene.  
Proc Natl Acad Sci USA 85 (4):1065-1069.

**Kihlström JE und Danninge I (1972):**

Neurohypophysial hormones and sexual behavior in males of the domestic fowl (*Gallus domesticus* L.) and the pigeon (*Columba livia* Gmel.).  
Gen Comp Endocrinol 18 (1):115-120.

**Kisliuk SM und Grossmann R (1995):**

The arginine vasotocin system in chickens exhibits a diurnal rhythm only during dehydration.  
J Physiol 483:48.

**Klein S, Jurkevich A und Grossmann R (2006):**

Sexually dimorphic immunoreactivity of galanin and colocalization with arginine vasotocin in the chicken brain (*Gallus gallus domesticus*).  
J Comp Neurol 499 (5):828-839.

**Klein S und Grossmann R (2008):**

Galanin immunoreactivity increased in chicken supraoptic neurons after activation of the vasotocin system at oviposition.  
Comp Biochem Physiol 149A (4):411-419.

- Kleine B, Wolfahrt S, Lotsch M, Gantner T und Rossmannith WG** (2001):  
Expression of galanin in human placenta.  
Mol Hum Reprod 7 (4):379-385.
- Koenig JI, Hooi S, Gabriel SM und Martin JB** (1989):  
Potential involvement of galanin in the regulation of fluid homeostasis in the rat.  
Regul Pept 24 (1):81-86.
- Kohchi C und Tsutsui K** (2000):  
Avian galanin: cloning of complementary DNAs and characterization of transcripts in different tissues.  
J Exp Zool 287 (2):183-190.
- Koike TI, Shimada K und Cornett LE** (1988):  
Plasma levels of immunoreactive mesotocin and vasotocin during oviposition in chickens: relationship to oxytocic action of the peptides in vitro and peptide interaction with myometrial membrane binding sites.  
Gen Comp Endocrinol 70 (1):119-126.
- Kolakowski LF, O'Neill GP, Howard AD, Broussard SR, Sullivan KA, Feighner SD, Sawzdargo M, Nguyen T, Kargman S, Shiao LL, Hreniuk DL, Tan CP, Evans J, Abramovitz M, Chateaufneuf A, Coulombe N, Ng G, Johnson MP, Tharian A, Khoshbouei H, George SR, Smith RG und O'Dowd BF** (1998):  
Molecular Characterization and Expression of Cloned Human Galanin Receptors GALR2 and GALR3.  
J Neurochem 71 (6):2239-2251.
- Kondo K, Murase T, Otake K, Ito M, Kurimoto F und Oiso Y** (1993):  
Galanin as a physiological neurotransmitter in hemodynamic control of arginine vasopressin release in rats.  
Neuroendocrinology 57 (2):224-229.
- Köhler A** (2000):  
Molekularbiologische Untersuchungen der Genexpression der Nonapeptid-Hormone Mesotocin and Arginin-Vasotocin beim Huhn.  
PhD Thesis: Tiermedizinische Hochschule Hannover.
- Kuenzel WJ und Masson M** (1988):  
A stereotactic atlas of the brain of the chick (*Gallus domesticus*).  
Baltimore, Maryland, John Hopkins University Press, 166 pages.
- Kuraishi Y, Kawabata S, Matsumoto T, Nakamura A, Fujita H und Satoh M** (1991):  
Involvement of substance P in hyperalgesia induced by intrathecal galanin.  
Neurosci Res 11 (4):276-285.
- Lacas-Gervais S, Maurel D, Hubert F, Allevard AM, Doukary A, Maggi V, Siaud P, Gharib C, Sicard B, Calas A und Hardin-Pouzet H** (2003):  
Vasopressin and galanin expression in the hypothalamus of two African rodents, *Taterillus gracilis* and *Steatomys caurinus*, subjected to water-restriction.  
Gen Comp Endocrinol 133 (1):132-145.
- Landgraf R, Malkinson TJ, Veale WL, Lederis K und Pittman QJ** (1990):  
Vasopressin and oxytocin in rat brain in response to prostaglandin fever.  
Am J Physiol 259 (5 Pt 2):R1056-R1062.



- Landry M, Roche D und Calas A (1995):**  
Short-Term Effects of Centrally Administered Galanin on the Hyperosmotically Stimulated Expression of Vasopressin in the Rat Hypothalamus.  
Neuroendocrinology 61:393-404.
- Landry M, Roche D, Angelova E und Calas A (1997):**  
Expression of galanin in hypothalamic magnocellular neurones of lactating rats: co-existence with vasopressin and oxytocin.  
J Endocrinol 155 (3):467-481.
- Landry M und Hökfelt T (1998):**  
Subcellular localization of preprogalanin messenger RNA in perikarya and axons of hypothalamo-posthypophyseal magnocellular neurons: an in situ hybridization study.  
Neuroscience 84 (3):897-912.
- Landry M, Aman K und Hökfelt T (1998):**  
Galanin-R1 Receptor in Anterior and Mid-Hypothalamus: Distribution and Regulation.  
J Comp Neuro 399:321-340.
- Landry M, Roche D, Vila-Porcile E und Calas A (2000):**  
Effects of centrally administered galanin (1-16) on galanin expression in the rat hypothalamus.  
Peptides 21 (11):1725-1733.
- Legross J.J und Geenen V (1996):**  
Neurophysins in central diabetes insipidus.  
Horm Res 45 (3-5):182-186.
- Li D, Tsutsui K, Muneoka Y, Minakata H und Nomoto K (1996):**  
An oviposition-inducing peptide: isolation, localization, and function of avian galanin in the quail oviduct.  
Endocrinology 137 (5):1618-1626.
- Loo YT (1931):**  
The forbrain of the opossum *Didelphis virginiana*. II. Histology.  
J Comp Neurol 521-148.
- Lopez FJ, Merchenthaler I, Ching M, Wisniewski MG und Negro-Vilar A (1991):**  
Galanin: a hypothalamic-hypophysiotropic hormone modulating reproductive functions.  
Proc Natl Acad Sci USA 88 (10):4508-4512.
- Lorimer DD und Benya RV (1996):**  
Cloning and quantification of galanin-1 receptor expression by mucosal cells lining the human gastrointestinal tract.  
Biochem Biophys Res Commun 222 (2):379-385.
- Ludwig M (1998):**  
Dendritic Release of Vasopressin and Oxytocin.  
J Neuroendoc 10 (12):881-895.
- Ma XM, Lightman SL und Aguilera G (1999):**  
Vasopressin and corticotropin-releasing hormone gene responses to novel stress in rats adapted to repeated restraint.  
Endocrinology 140 (8):3623-3632.

- McDonald AC, Schuijers JA, Shen PJ, Gundlach AL und Grills BL (2003):**  
Expression of galanin and galanin receptor-1 in normal bone and during fracture repair in the rat. *Bone* 33 (5):788-797.
- Meister B, Cortes R, Villar MJ, Schalling M und Hökfelt T (1990):**  
Peptides and transmitter enzymes in hypothalamic magnocellular neurons after administration of hyperosmotic stimuli: comparison between messenger RNA and peptide/protein levels. *Cell Tissue Res* 260 (2):279-297.
- Melander T, Hökfelt T und Rokäeus A (1986):**  
Distribution of galaninlike immunoreactivity in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 248 (4):475-517.
- Melander T und Staines WA (2008):**  
A galanin-like peptide coexists in putative cholinergic somata of the septum-basal forebrain complex and in acetylcholinesterase-containing fibers and varicosities within the hippocampus in the owl monkey (*Aotus trivirgatus*). *Neurosci Lett* 68 (1):17-22.
- Merchenthaler I, Lopez FJ und Negro-Vilar A (1990):**  
Colocalization of galanin and luteinizing hormone-releasing hormone in a subset of preoptic hypothalamic neurons: anatomical and functional correlates. *Proc Natl Acad Sci USA* 87 (16):6326-6330.
- Merchenthaler I (1991):**  
The hypophysiotropic galanin system of the rat brain. *Neuroscience* 44 (3):643-654.
- Merchenthaler I, López FJ, Lennard DE und Negro-Vilar A (1991):**  
Sexual Differences in the Distribution of Neurons Coexpressing Galanin and Luteinizing Hormone-Releasing Hormone in the Rat Brain. *Endocrinology* 129 (4):1977-1986.
- Merchenthaler I, Lopez FJ und Negro-Vilar A (1993):**  
Anatomy and physiology of central galanin-containing pathways. *Prog Neurobiol* 40 (6):711-769.
- Mink D, Lang RE, Ostermann E und Bock R (1986):**  
Effect of salt loading and salt deprivation on the vasopressin and oxytocin content of the median eminence and the neural lobe in adrenalectomized rats. *Cell Tissue Res* 246 (2):413-423.
- Mitchell PJ und Tjian R (2008):**  
Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science* 245 (4916):371-378.
- Mohr E, Schmitz E und Richter D (1988):**  
A single rat genomic DNA fragment encodes both the oxytocin and vasopressin genes separated by 11 kilobases and oriented in opposite transcriptional directions. *Biochimie* 70 (5):649-654.
- Mohr E und Richter D (2003):**  
Molecular determinants and physiological relevance of extrasomatic RNA localization in neurons. *Front Neuroendocrinol* 24 (2):128-139.

**Mohr E und Richter D (2004):**

Subcellular Vasopressin mRNA Trafficking and Local Translation in Dendrites.  
J Neuroendocrinol 16 (4):333-339.

**Möhring J, Schoun J, Simon-Oppermann C und Simon E (1980):**

RIA for AVT in serum of Pekin ducks: AVT concentrations after adaptation to fresh water and salt water.  
Pflügers Archiv 387:91-97.

**Munsick RA (1960):**

Effect of magnesium ion on the response of the rat uterus to neurohypophysial hormones and analogues.  
Endocrinology 6:451-457.

**Mühlbauer E, Hamann D, Xu B, Ivell R, Udovic B, Ellendorff F und Grossmann R (1993):**

Arginine vasotocin gene expression and hormone synthesis during ontogeny of the chicken embryo and the newborn chick.  
J Neuroendocrinol 5 (3):281-288.

**Nauta WJ und Haymarker W (1969)**

Hypothalamic nuclei and fiber connections.

In: *The Hypothalamus*, edited by Anderson, Haymarker, Nauta and Thomas.  
Springfield, p. 136-209.

**Neumann I, Douglas AJ, Pittman QJ, Russell JA und Landgraf R (1996):**

Oxytocin Released within the Supraoptic Nucleus of the Rat Brain by Positive Feedback Action is Involved in Parturition-Related Events.  
J Neuroendocrinol 8 (3):227-233.

**Niimi M, Takahara J, Sato M und Kawanishi K (1990):**

Immunohistochemical Identification of Galanin and Growth Hormone-Releasing Factor-Containing Neurons Projecting to the Median Eminence of the Rat.  
Neuroendocrinology 51 (5):572-575.

**Nilsson T, Arkhammar P, Rorsman P und Berggren PO (1989):**

Suppression of insulin release by galanin and somatostatin is mediated by a G-protein. An effect involving repolarization and reduction in cytoplasmic free Ca<sup>2+</sup> concentration.  
J Biol Chem 264 (2):973-980.

**Njörkstrand E, Hulting AL, Meister B und Uvnäs-Moberg K (2008):**

Effect of galanin on plasma levels of oxytocin and cholecystokinin.  
Neuroreport 4 (1):10-12.

**Norberg A, Sillard R, Carlquist M, Jornvall H und Mutt V (1991):**

Chemical detection of natural peptides by specific structures Isolation of chicken galanin by monitoring for its N-terminal dipeptide, and determination of the amino acid sequence.  
FEBS Letters 288 (1-2):151-153.

**Nouwen EJ, Decuypere E, Kuhn ER, Michels H, Hall TR und Chadwick A (1984):**

Effect of dehydration, haemorrhage and oviposition on serum concentrations of vasotocin, mesotocin and prolactin in the chicken.  
J Endocrinol 102 (3):345-351.

**Oldfield BJ, Hou-Yu A und Silverman A-J** (1985):

A combined electron microscopic HRP and immunocytochemical study of the limbic projections to rat hypothalamic nuclei containing vasopressin and oxytocin neurons.  
J Comp Neurol 231 (2):221-231.

**Pak TR, Chung WC, Hinds LR und Handa RJ** (2007):

Estrogen receptor-beta mediates dihydrotestosterone-induced stimulation of the arginine vasopressin promoter in neuronal cells.  
Endocrinology 148 (7):3371-3382.

**Palatnik CM, Wilkins C und Jacobson A** (1984):

Translational control during early dictyostelium development: Possible involvement of poly(A) sequences.  
Cell 36 (4):1017-1025.

**Panzica GC, Aste N, Castagna C, Viglietti-Panzica C und Balthazart J** (2001):

Steroid-induced plasticity in the sexually dimorphic vasotocinergic innervation of the avian brain: behavioral implications.  
Brain Res Rev 37 (1-3):178-200.

**Papas S und Bourque CW** (1997):

Galanin Inhibits Continuous and Phasic Firing in Rat Hypothalamic Magnocellular Neurosecretory Cells.  
J Neurosci 17 (16):6048-6056.

**Parker EM, Izzarelli DG, Nowak HP, Mahle CD, Iben LG, Wang J und Goldstein ME** (1995):

Cloning and characterization of the rat GALR1 galanin receptor from Rin14B insulinoma cells.  
Mol Brain Res 34 (2):179-189.

**Perumal P und Vrontakis ME** (2003):

Transgenic mice over-expressing galanin exhibit pituitary adenomas and increased secretion of galanin, prolactin and growth hormone.  
J Endocrinol 179 (2):145-154.

**Pham T, Guerrini S, Wong H, Reeve J Jr und Sternini C** (2002):

Distribution of galanin receptor 1 immunoreactivity in the rat stomach and small intestine.  
J Comp Neurol 450 (3):292-302.

**Pirnik Z, Mravec B und Kiss A** (2004):

Fos protein expression in mouse hypothalamic paraventricular (PVN) and supraoptic (SON) nuclei upon osmotic stimulus: colocalization with vasopressin, oxytocin, and tyrosine hydroxylase.  
Neurochem Int 45 (5):597-607.

**Pittman QJ und Wilkinson MF** (1992):

Central arginine vasopressin and endogenous antipyresis.  
Can J Physiol Pharmacol 70 (5):786-790.

**Plotsky PM und Sawchenko PE** (1987):

Hypophysial-portal plasma levels, median eminence content, and immunohistochemical staining of corticotropin-releasing factor, arginine vasopressin, and oxytocin after pharmacological adrenalectomy.  
Endocrinology 120 (4):1361-1369.

- Pu LP, van Leeuwen FW, Tracer HL, Sonnemans MAF und Loh YP (1995):**  
Localization of vasopressin mRNA and immunoreactivity in pituicytes of pituitary stalk-transected rats after osmotic stimulation.  
Proc Natl Acad Sci USA 92 (10653):10657.
- Raji A und Nordmann JJ (1994):**  
Synthesis, turnover, and release of peptides from the neurohypophysis of the Jerboa *Jaculus orientalis*.  
Gen Comp Endocrinol 93 (3):345-356.
- Ramieri G und Panzica GC (1989):**  
Comparative neuroanatomical aspects of the salt and water balance in birds and mammals.  
J Endocrinol Invest 12 (1):59-74.
- Ramon y Cajal S (1911):**  
Histologie du système nerveux.  
Madrid, C. S. I. C. Instituto Cajal,
- Reaux-Le Goazigo A, Morinville A, Bulet A, Llorens-Cortes C und Beaudet A (2004):**  
Dehydration-Induced Cross-Regulation of Apelin and Vasopressin Immunoreactivity Levels in Magnocellular Hypothalamic Neurons.  
Endocrinology 145 (9):4392-4400.
- Rhodes CH, Morell JI und Pfaff DW (1981):**  
Distribution of Estrogen-Concentrating, Neurophysin-Containing Magnocellular Neurons in the Rat Hypothalamus as Demonstrated by a Technique Combining Steroid Autoradiography and Immunohistology in the Same Tissue.  
Neuroendocrinology 33 (1):18-23.
- Robinson B, Koike TI, Kinzler SL und Neldon HL (1990a):**  
Arginine vasotocin and mesotocin in the anterior hypothalamus, neurohypophysis, proventriculus and plasma of White Leghorn cockerels during dehydration.  
Br Poult Sci 31 (3):651-659.
- Robinson B, Sayang N, Koike TI, Kinzler SL und Neldon HL (1990b):**  
Effects of sex and gonadal steroids on arginine vasotocin and mesotocin in the pineal gland and neurohypophysis of the White Leghorn fowls.  
Br Poult Sci 31:843-849.
- Rose JP, Wu CK, Hsiao CD, Breslow E und Wang BC (1996):**  
Crystal structure of the neurophysin-oxytocin complex.  
Nat Struct Biol 3 (2):163-169.
- Rouillé Y, Chauvet M-T, Chauvet J und Acher R (1985):**  
Relations évolutives entre Marsupiaux américaines et australiens décelées par des neuropeptides marqueurs: identification de la mésotocine et de l'arginine vasopressine chez les Dasyuridés australiens.  
Comptes Rendus de l'Academie des Seances Serie III - Sciences de la Vie, 301:839-842.
- Rouillé Y, Chauvet M-T, Chauvet J und Acher R (1988):**  
Dual duplication of neurohypophysial hormones in an Australian marsupial: mesotocin, oxytocin, lysine vasopressin and arginine vasopressin in a single gland of the northern bandicoot (*Isodon macrourus*).  
Biochem Biophys Res Commun 154:346-350.

**Rökaeus A und Brownstein MJ (1986):**

Construction of a porcine adrenal medullary cDNA library and nucleotide sequence analysis of two clones encoding a galanin precursor.  
Proc Natl Acad Sci USA 83:6287-6291.

**Rökaeus A und Carlquist M (1988):**

Nucleotide sequence analysis of cDNAs encoding a bovine galanin precursor protein in the adrenal medulla and chemical isolation of bovine gut galanin.  
FEBS Letters 234 (2):400-406.

**Rzasa J und Ewy Z (1970):**

Effect of vasotocin and oxytocin on oviposition in the hen.  
J Reprod Fertil 21 (3):549-550.

**Rzasa J (1978):**

Effects of arginine vasotocin and prostaglandin E1 on the hen uterus.  
Prostaglandins 16 (3):357-372.

**Sachs H und Takabatake Y (1964):**

Evidence for a precursor in vasopressin biosynthesis.  
Endocrinology 75:943-948.

**Saito N, Kinzler SL und Koike TI (1990):**

Arginine vasotocin and mesotocin levels in theca and granulosa layers of the ovary during the oviposition cycle in hens (*Gallus domesticus*).  
Gen Comp Endocrinol 79 (1):54-63.

**Saito N und Koike TI (1992):**

Alterations in uterine contractility during the oviposition cycle in domestic hens.  
Br Poult Sci 33 (3):671-676.

**Saito N und Grossmann R (1998):**

Effects of short-term dehydration on plasma osmolality, levels of arginine vasotocin and its hypothalamic gene expression in the laying hen.  
Comp Biochem Physiol 121A (3):235-239.

**Saito N und Grossmann R (1999):**

Gene expression of arginine vasotocin in ovarian and uterine tissues of the chicken.  
Asian-Aust J Anim Sci 12 (5):695.

**Saito T und Soya H (2004):**

Delineation of responsive AVP-containing neurons to running stress in the hypothalamus.  
Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 286 (3):R484-R490.

**Saito N, Furuse M, Sasaki T, Arakawa K und Shimada K (1999):**

Effects of naloxone on neurohypophyseal peptide release by hypertonic stimulation in chicks.  
Gen Comp Endocrinol 115 (2):228-235.

**Scharrer E (1937):**

Über sekretorisch tätige Nervenzellen bei wirbellosen Tieren.  
Naturwiss 25:131-138.

**Schuman EM (1999):**

mRNA Trafficking and Local Protein Synthesis at the Synapse.  
Neuron 23 (4):645-648.

**Sergeyev V, Fetissoff S, Mathe AA, Jimenez PA, Bartfai T, Mortas P, Gaudet L, Moreau JL und Hökfelt T (2005):**

Neuropeptide expression in rats exposed to chronic mild stresses.  
Psychopharmacology (Berl) 178 (2-3):115-124.

**Seth R, Xu YX, Grossmann R und Chaturvedi CM (2004):**

Changes in expression of AVT and AVT receptor (VT1) gene in hypothalamus and shell gland in relation to egg laying in white leghorn hen.  
Gen Comp Endocrinol 137 (2):177-186.

**Seth R, Köhler A, Grossmann R und Chaturvedi CM (2004):**

Expression of hypothalamic arginine vasotocin gene in response to water deprivation and sex steroid administration in female Japanese quail.  
J Exp Biol 207 (17):3025-3033.

**Sherlock DA, Field PM und Raisman G (1975):**

Retrograde transport of horseradish peroxidase in the magnocellular neurosecretory system of the rat.  
Brain Res 88 (3):403-414.

**Shimada K, Neldon HL und Koike TI (1986):**

Arginine vasotocin (AVT) release in relation to uterine contractility in the hen.  
Gen Comp Endocrinol 64 (3):362-367.

**Sillard R, Langel U und Jornvall H (1991):**

Isolation and characterization of galanin from sheep brain.  
Peptides 12 (4):855-859.

**Simmons DR, Spike RC und Todd AJ (1995):**

Galanin is contained in GABAergic neurons in the rat spinal dorsal horn.  
Neurosci Lett 187 (2):119-122.

**Simon-Oppermann C, Simon E und Gray DA (1988):**

Central and systemic antidiuretic hormone and angiotensin II in salt and fluid balance of birds as compared to mammals.  
Comp Biochem. Physiol A 90 (4):789-803.

**Skofitsch G, Jacobowitz DM, Amann R und Lembeck F (1989):**

Galanin and vasopressin coexist in the rat hypothalamo-neurohypophyseal system.  
Neuroendocrinology 49 (4):419-427.

**Smith KE, Forray C, Walker MW, Jones KA, Tamm JA, Bard J, Branchek TA, Linemeyer DL und Gerald C (1997):**

Expression Cloning of a Rat Hypothalamic Galanin Receptor Coupled to Phosphoinositide Turnover.  
J Biol Chem 272 (39):24612-24616.

**Smith KE, Walker MW, Artymyshyn R, Bard J, Borowsky B, Tamm JA, Yao WJ, Vaysse PJ-J, Branchek TA, Gerald C und Jones KA (1998):**

Cloned Human and Rat Galanin GALR3 Receptors. Pharmacology and activation of G-protein inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels.  
J Biol Chem 273 (36):23321-23326.

**Stallone JN und Braun EJ (1986):**

Regulation of plasma arginine vasotocin in conscious water-deprived domestic fowl.  
Am J Physiol 250 (4 Pt 2):R658-R664.

**Stallone JN und Braun EJ (1986):**

Osmotic and volemic regulation of plasma arginine vasotocin in conscious domestic fowl.  
Am J Physiol 250 (4 Pt 2):R644-R657.

**Sten Shi TJ, Zhang X, Holmberg K, Xu ZQD und Hökfelt T (1997):**

Expression and regulation of galanin-R2 receptors in rat primary sensory neurons: effect of axotomy and inflammation.  
Neurosci Lett 237 (2-3):57-60.

**Steward O und Worley PF (2001):**

A cellular mechanism for targeting newly synthesized mRNAs to synaptic sites on dendrites.  
Proc Natl Acad Sci USA 98 (13):7062-7068.

**Steward O und Schuman EM (2001):**

Protein synthesis at synaptic sites on dendrites.  
Ann Rev Neurosci 24 (1):299-325.

**Steward O und Worley PF (2002):**

Local Synthesis of Proteins at Synaptic Sites on Dendrites: Role in Synaptic Plasticity and Memory Consolidation  
Neurobiol Learn Mem 78 (3):508-527.

**Suzuki H., Yamamoto T, Inenaga M und Uemura H (2000):**

Galanin-immunoreactive neuronal system and colocalization with serotonin in the optic lobe and peduncle complex of the octopus (*Octopus vulgaris*).  
Brain Res 865 (2):168-176.

**Swanson LW und Kuypers HG (1980):**

The paraventricular nucleus of the hypothalamus: cytoarchitectonic subdivisions and organization of projections to the pituitary, dorsal vagal complex, and spinal cord as demonstrated by retrograde fluorescence double-labeling methods.  
J Comp Neurol 194 (3):555-570.

**Sweerts BW, Jarrott B und Lawrence AJ (1999):**

Expression of preprogalanin mRNA following acute and chronic restraint stress in brains of normotensive and hypertensive rats.  
Mol Brain Res 69 (1):113-123.

**Sykes AH (1953):**

Some observations on oviposition in the fowl.  
Q J Exp Physiol Cogn Med Sci 38 (2):61-68.

**Szczepanska-Sadowska E, Simon-Oppermann C, Gray DA und Simon E (1985):**

Blood pressure and arginine vasotocin in normonatremic and hypernatremic ducks.  
Basic Res Cardiol 80 (2):116-125.

**Takahashi T und Kawashima M (2003):**

Arginine vasotocin induces bearing down for oviposition in the hen.  
Poult Sci 82 (2):345-346.



- Tanaka K, Goto K, Yoshioka T, Terao T und Koga O (1984):**  
Changes in the plasma concentration of immunoreactive arginine vasotocin during oviposition in the domestic fowl.  
Br Poult Sci 25 (4):589-595.
- Tatemoto K, Rökaeus A, Jornvall H, McDonald T und Mutt V (1983):**  
Galanin - a novel biologically active peptide from porcine intestine.  
FEBS Letters 164 (1):124-128.
- Theodosios DT (1985):**  
Oxytocin-immunoreactive terminals synapse on oxytocin neurones in the supraoptic nucleus.  
Nature 313 (6004):682-684.
- Theodosios DT und Poulain DA (1992):**  
Neuronal-glia and synaptic remodelling in the adult hypothalamus in response to physiological stimuli.  
Ciba Foand Symp 168:209-225.
- Trembleau A, Morales M und Bloom FE (1996):**  
Differential compartmentalization of vasopressin messenger RNA and neuropeptide within the rat hypothalamo-neurohypophysial axonal tracts: Light and electron microscopic evidence.  
Neuroscience 70 (1):113-125.
- Tsutsui K, Li D, Ukena K, Kikuchi M und Ishii S (1998):**  
Developmental Changes in Galanin Receptors in the Quail Oviduct and the Effect of Ovarian Sex Steroids on Galanin Receptor Induction.  
Endocrinology 139 (10):4230-4236.
- Unniappan S, Lin X und Peter RE (2003):**  
Characterization of complementary deoxyribonucleic acids encoding preprogalanin and its alternative splice variants in the goldfish.  
Mol Cell Endocrinol 200 (1-2):177-187.
- Viglietti-Panzica C, Anselmetti GC, Balthazart J, Aste N und Panzica GC (1992):**  
Vasotocinergic innervation of the septal region in the Japanese quail: sexual differences and influence of testosterone.  
Cell Tissue Res 267:261-265.
- Voorhuis TAM, De Kloet ER und De Wied D (1991):**  
Effect of a vasotocin analog on singing behavior in the canary.  
Horm Behav 25 (4):549-559.
- Vrontakis ME, Peden LM, Duckworth ML und Friesen HG (1987):**  
Isolation and characterization of a complementary DNA (galanin) clone from estrogen-induced pituitary tumor messenger RNA.  
J Biol Chem 262 (35):16755-16758.
- Vrontakis ME, Schroedter IC, Cosby H und Friesen HG (1992):**  
Expression and secretion of galanin during pregnancy in the rat.  
Endocrinology 130 (1):458-464.
- Wang S, He C, Hashemi T und Bayne M (1997):**  
Cloning and Expressional Characterization of a Novel Galanin Receptor. Identifikation of different pharmacophores within galanin for the three galanin receptor subtypes.

J Biol Chem 272 (51):31949-31952.

**Wang S, He C, Maguire MT, Clemmons AL., Burrier RE, Guzzi MF, Strader CD, Parker EM und Bayne ML** (1997):

Genomic organization and functional characterization of the mouse GalR1 galanin receptor. FEBS Letters 411 (2-3):225-230.

**Wang Z** (1994):

Testosterone effects on development of vasopressin messenger RNA expression in the bed nucleus of the stria terminalis and medial amygdaloid nucleus in male rats. Dev Brain Res 79 (1):147-150.

**Waters SM und Krause JE** (2000):

Distribution of galanin-1, -2 and -3 receptor messenger RNAs in central and peripheral rat tissues. Neuroscience 95 (1):265-271.

**Wotjak CT, Kubota M, Liebsch G, Montkowski A, Holsboer F, Neumann I und Landgraf R** (1996):

Release of vasopressin within the rat paraventricular nucleus in response to emotional stress: a novel mechanism of regulating adrenocorticotrophic hormone secretion? J Neurosci 16 (23):7725-7732.

**Wotjak CT, Ganster J, Kohl G, Holsboer F, Landgraf R und Engelmann M** (1998):

Dissociated central and peripheral release of vasopressin, but not oxytocin, in response to repeated swim stress: new insights into the secretory capacities of peptidergic neurons. Neuroscience 85 (4):1209-1222.

**Wynick D, Smith DM, Ghatei M, Akinsanya K, Bhogal R, Purkiss P, Byfield P, Yanaihara N, und Bloom SR** (1993):

Characterization of a high-affinity galanin receptor in the rat anterior pituitary: absence of biological effect and reduced membrane binding of the antagonist M15 differentiate it from the brain/gut receptor. Proc Natl Acad Sci USA 90 (9):4231-4235.

**Xu B** (1991):

Studien zur funktionellen Reifung and der Beteiligung der endogenen Opiode an der Regulation des hypothalamo-neurohypophysären Systems beim Huhn - Ein Beitrag zur Regulation des Wasserhaushaltes. Dissertation: Georg-August-Universität zu Göttingen.

**Xu B, Kalra PS, Farmerie WG und Kalra SP** (1999):

Daily Changes in Hypothalamic Gene Expression of Neuropeptide Y, Galanin, Proopiomelanocortin, and Adipocyte Leptin Gene Expression and Secretion: Effects of Food Restriction. Endocrinology 140 (6):2868-2875.

**Yagita K, Okamura H und Iyata Y** (1994):

Rehydration process from salt-loading: recovery of vasopressin and its coexisting galanin, dynorphin and tyrosine hydroxylase immunoreactivities in the supraoptic and paraventricular nuclei. Brain Res 667 (1):13-23.

**Yang J, Yang Y, Chen JM, Xu HT, Liu WY, Wang CH und Lin BC** (2007):

Arginine vasopressin is an important regulator in antinociceptive modulation of hypothalamic paraventricular nucleus in the rat.  
Neuropeptides 41 (3):165-176.

**Young LJ, Wang Z und Insel TR (1998):**  
Neuroendocrine bases of monogamy.  
Trend Neurosci 21 (2):71-75.

**Young LJ, Lim MM, Gingrich B und Insel TR (2001):**  
Cellular mechanisms of social attachment.  
Horm Behav 40 (2):133-138.

**Yu JY, Pon CH, Ku HC, Wang CT und Kao YH (2007):**  
A preprogalanin cDNA from the turtle pituitary and regulation of its gene expression.  
Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 292 (4):R1649-R1656.

## 10 Abbildungs-/Tabellenverzeichnis

### **Abbildungen**

#### **Kapitel 2 Literaturübersicht**

- Abb. 2-1 :** Schematische Darstellung des Hypothalamo-Neurohypophysären Systems beim Menschen modifiziert nach ECKERT (1986).
- Abb. 2-2:** Schematischer Aufbau einer Nervenzelle modifiziert nach HINTON (1992).
- Abb. 2-3:** Nonapeptide der Vasopressin-Linie und Oxytocin-Linie modifiziert nach CALDWELL und YOUNG (2006)
- Abb. 2-4:** Genstruktur des Vasotocin-Neurophysin II-Gens modifiziert nach HAMANN et al. (1992)
- Abb. 2-5:** Lage der Nonapeptidgene bei der Ratte modifiziert nach RICHTER (1988)
- Abb. 2-6:** Schematische Darstellung eines neurosekretorischen Neurons nach BURBACH (2001)
- Abb. 2-7:** Aminosäuren-Sequenzvergleich Galanin
- Abb. 2-8:** Schematische Darstellung des prepro-Galanin von Schwein und Ratte (modifiziert nach MERCHENTHALER et al., 1993)
- Abb. 2-9:** Schematische Darstellung des Galanin-Gens der Ratte

#### **Kapitel 4 Material & Methoden**

- Abb. 4-1:** pGEM-Teasy Vektor-Karte und Sequenz-Referenz-Punkte.
- Abb. 4-2:** p*Bluescript* KS plus Vektor-Karte modifiziert nach Alting-MESS und SHORT (1989)
- Abb. 4-3:** Schematischer Aufbau eines einseitig gerichteten Kapillarblots.
- Abb. 4-4:** Schematische Darstellung der Lage der verwendeten Primer bzw. der klonierten PCR-Fragmente für Galanin, GalR1 und GalR2 des Huhns (*Gallus gallus*).
- Abb. 4-5:** Temperaturverteilung im Gradientencycler, als Beispiel ein gewählter Gradient von 53 bis 63°C.
- Abb. 4-6:** PCR-Programm verwendet im Gradienten-Cycler.
- Abb. 4-7:** PCR-Programm verwendet im Light-Cycler<sup>®</sup>.
- Abb. 4-8:** Eine Schnittebene (schematische Darstellung) des Hühnergehirns modifiziert nach KUENZEL und MASSON (1988).

- Abb. 4-9:** Schematische Darstellung immunhistochemischer Nachweismethoden: **A** direkte Methode, **B** indirekte Methode.
- Abb. 4-10:** Schematische Darstellung der Adsorptions- und Emissionsspektren der Fluorochrome FITC und A555

### **Kapitel 5 Ergebnisse**

- Abb. 5-1:** Vergleich einzelner Blutparameter zwischen normohydrierten (CO) und dehydrierten (DH) Hennen bzw. Hähnen.
- Abb. 5-2:** Position der Eier normohydrierter und dehydrierter Hennen im Legedarm.
- Abb. 5-3:** Darstellung der absoluten Genregulation nach Dehydrierung für AVT, Galanin, GalR1 und GalR2 im weiblichen und männlichen Hypothalamus des Huhns
- Abb. 5-4:** Schematische Darstellung der Lage der klonierten cDNA-Sonde zum Nachweis des Galanin im Hypothalamus des Huhns (*Gallus gallus*) mittels Northern Blot Analyse.
- Abb. 5-5:** Northern Blot Analyse des AVT- und Galanin-mRNA-Gehaltes männlicher und weiblicher Hypothalami nach Dehydrierung.
- Abb. 5-6:** Darstellung der mRNA-Expression für GalR1 und GalR2 des Huhns (*Gallus gallus*) in unterschiedlichen Geweben, normalisiert auf 18S
- Abb. 5-7:** Schematische Darstellung der Lage des klonierten Galanin-PCR-Fragments zum Nachweis mittels konventioneller PCR
- Abb. 5-8:** Nachweis einer zweiten Transkriptvariante für Galanin beim Huhn (*Gallus gallus*) mittels PCR.
- Abb. 5-9:** Schematische Darstellung der Lage der klonierten PCR-Fragmente für Galanin- und Gal-TV2-mRNA.
- Abb. 5-10:** Sequenzvergleich der klonierten PCR-Produkte für Galanin des Huhns (*Gallus gallus*).
- Abb. 5-11:** Darstellung der mRNA-Expression für Galanin und Gal-TV2 des Huhns (*Gallus gallus*) in unterschiedlichen Geweben, normalisiert auf 18S.
- Abb. 5-12:** Schematische Darstellung der Lage des klonierten PCR-Fragments G11 in beiden Galanin-Transkriptvarianten
- Abb. 5-13:** Darstellung der absoluten Genregulation nach Dehydrierung für AVT, gesamt-Galanin (G11) und dessen beiden Transkriptvarianten.

- Abb. 5-14:** Differentieller Interferenz Kontrast (DIC) und schematische Darstellung eines coronalen Schnittes modifiziert nach KUENZEL und MASSON (1988).
- Abb. 5-15:** Darstellung AVT- und Galanin-immunoreaktiver Neurone im SON 2 normo- und dehydrierter Hennen.
- Abb. 5-16:** Darstellung AVT- und Galanin-immunoreaktiver Neurone im SON 2-3 normo- und dehydrierter Hennen.
- Abb. 5-17:** Darstellung AVT- und Galanin-immunoreaktiver Neurone im SON 3 normo- und dehydrierter Hennen.
- Abb. 5-18:** Darstellung AVT- und Galanin-immunoreaktiver Neurone im SONE normo- und dehydrierter Hennen.
- Abb. 5-19:** Intensitätsvergleich für AVT und Galanin in magnozellulären Neuronen des SON2, SON2-3, SON3 und SONE normohydrierter und dehydrierter Hennen.
- Abb. 5-20:** Gemittelter Intensitätsvergleich für AVT und Galanin in magnozellulären Neuronen des SON<sub>gesamt</sub> normohydrierter und dehydrierter Hennen.
- Abb. 5-21:** Vergleich der absoluten Zellzahl Galanin-ir magnozellulärer Neurone im SON2, SON2-3, SON3 und SONE normohydrierter und dehydrierter Hennen.
- Abb. 5-22:** Darstellung AVT- und Galanin-immunoreaktiver Neurone im SON 2 normo- und dehydrierter Hähne.
- Abb. 5-23:** Darstellung AVT- und Galanin-immunoreaktiver Neurone im SON 2-3 normo- und dehydrierter Hähne.
- Abb. 5-24:** Darstellung AVT- und Galanin-immunoreaktiver Neurone im SON 3 normo- und dehydrierter Hähne.
- Abb. 5-25:** Darstellung AVT- und Galanin-immunoreaktiver Neurone im SONE normo- und dehydrierter Hähne.
- Abb. 5-26:** Intensitätsvergleich für AVT und Galanin in magnozellulären Neuronen des SON2, SON2-3, SON3 und SONE normohydrierter und dehydrierter Hähne.
- Abb. 5-27:** Gemittelter Intensitätsvergleich für AVT und Galanin in magnozellulären Neuronen des SON<sub>gesamt</sub> normohydrierter und dehydrierter Hähne.
- Abb. 5-28:** Vergleich der absoluten Zellzahl Galanin-ir magnozellulärer Neurone im SON2, SON2-3, SON3 und SONE normohydrierter und dehydrierter Hähne.
- Abb. 5-29:** Prozentualer Intensitätsvergleich für AVT und Galanin in magnozellulären Neuronen des SON<sub>gesamt</sub> normohydrierter und dehydrierter Hennen bzw. Hähnen.

### **Kapitel 6 Diskussion**

- Abb. 6-1:** Vergleich Galanin-Genstruktur zwischen Ratte und Huhn  
**Abb. 6-2:** Aminosäuren-Sequenzvergleich des Galanin-Inserts (Exon 3b)

### **Kapitel 11 Anhang**

- Abb. 11-1:** Bereiche des Supraoptischen Nucleus (schematische Darstellung)

### ***Tabellen***

### **Kapitel 5 Ergebnisse**

- Tab. 5-1:** Plasma-AVT-Gehalt, Natrium-Konzentration und Osmolalität normo- und dehydrierter Tiere im Vergleich der Geschlechter.
- Tab. 5-2:** Vergleich der Intensität AVT-ir Neurone zwischen einzelnen Bereichen des SON normo- (CO) und dehydrierter (DH) Hennen.
- Tab. 5-3** Vergleich der Intensität Galanin-ir Neurone zwischen einzelnen Bereichen des SON normo- (CO) und dehydrierter (DH) Hennen.
- Tab. 5-4** Vergleich der Intensität AVT-ir Neurone zwischen einzelnen Bereichen des SON normo- (CO) und dehydrierter (DH) Hähne.
- Tab. 5-5** Vergleich der Intensität Galanin-ir Neurone zwischen einzelnen Bereichen des SON normo- (CO) und dehydrierter (DH) Hähne.
- Tab. 5-6:** Durchschnittliche Zellzahl Galanin-ir Neurone des SON<sub>gesamt</sub> normohydrierter und dehydrierter Hennen bzw. Hähne.

## 11 Anhang

### 11.1 Geräte

Gerät	Gerätebezeichnung	Vertrieb
Analysenwaage	MP 8	Satorius 37075 Göttingen
Analysenwaage	Typ L2200 S	Satorius 37075 Göttingen
Autoklav	Autoklav Typ C	Webeco GmbH 23611 Bad Schwartau
Autoklav	Autoklav Typ A	Webeco GmbH 23611 Bad Schwartau
Beta-Counter	Wallac 1410 Liquidscintillationcounter	Pharmacia, Freiburg
Biofuge	fresco	Heraeus Instruments, 37250 Osterode
Blutgasanalysator	Rapidlab 865 Bayer	Bayer Vital GmbH 35463 Fernwald
Brutschrank	Typ 80	MELAG 10829 Berlin
Brutschrank	Typ 85	MELAG 10829 Berlin
Clene Cab		Herolab GmbH 69168 Wiesloch
Clene Cab		Herolab GmbH 69168 Wiesloch
Eismaschine	ZBE 70-35	Ziegra, 30916 Isernhagen
Gamma-Counter	1277 Gamma Master	LKB Wallac
Gelkammer	Agargel Midi Wide	Biometra 37079 Göttingen
Gelkammer	Agargel Maxi	Biometra 37079 Göttingen
Gelkammer	GNA 100	Pharmacia Biotech Uppsala SE-75184 Sweden
GS Gene Linker	UV Chamber	Bio-Rad 80939 München
Homogenisator/Potter	Typ 853 202	B. Braun AG 34212 Melsungen
Hybridisierungssofen	3032	GFL 30938 Burgwedel
Hybridisierungssofen	7601	GFL 30938 Burgwedel
Konfokales Laser-Raster-Mikroskop	Laserscanning Microscope LSM 510	Carl Zeiss 07745 Jena
Kryostat	2800 Frigocut E	Reichert-Jung, Cambridge Instruments GmbH 35578 Wetzlar
Kühlplatte	Co Typ20	Reichert-Jung, Cambridge Instruments GmbH 35578 Wetzlar
Laminar flow	HERA safe	Heraeus Instruments, 37250 Osterode
Laminar flow	Clean Bench BiohazardTyp DLF	Clean Air Deutschland GmbH 40724 Hilden
Light Cycler		Roche Diagnostics GmbH 68305 Mannheim
Magnetrührer mit Heizplatte	MR 30001 K	Omnilab CH - 8932 Mettmenstetten



Gerät	Gerätebezeichnung	Vertrieb
Magnetrührer mit Heizplatte	IKA COMBIMAG RET	IKA -Werke GmbH und Co KG 79219 Staufen
Mikrowelle	Lunik 850 N,	Aldi
Mikrozentrifuge	Combi-Spin FVL 2400 N	Kisker 48543 Steinfurth
Molekular Imager FX	Appendix B, Chemi Doc	Bio-Rad 80939 München
NanoDrop Spectrophotometer	ND-100	peqlab Biotechnologie GmbH 91052 Erlangen
Osmometer Wescor	Vapro Pressure Osmometer 5520	Kreienbaum 40764 Langenfeld
Peltier Thermal Cycler	Ptc-200	Biozym 31833 Hessisch Oldendorf
pH Meter	Typ 537	WTW 82362 Weilheim
Programmable Thermal Controller	PTC-100 TM	MJ. Research,INC, Watertown, MA 02172, USA
Schüttler	SM25, Typ 91.25B	Edmund Bühler, 72070 Tübingen
Thermomixer	Typ 5436 B	Eppendorf 22339 Hamburg
Thermomixer	5436	Eppendorf 22339 Hamburg
Trio Thermoblock		Biometra 37079 Göttingen
Trockenschrank	Zentrifuge Function line, Typ T12	Heraeus Instruments, 37250 Osterode
Trockenschrank	Modell UE 600	Memmert GmbH & Co KG, 91126 Schwabach
Vortex- Genie 2	Model G-560E	Scientific Industries, INC New York 11716, USA
Waage	Typ 3719 MP	Satorius 37075 Göttingen
Wärmebad	Schüttelwasserbad, groß, 1086	GFL 30938 Burgwedel
Wärmeschrank		GFL 30938 Burgwedel
Wasseraufbereitung	Wasseraufbereitungsanlage Direkt-Q UV 3	Millipore GmbH, 65824 Schwalbach
Zentrifuge	Minifuge T	Heraeus Instruments, 37250 Osterode
Zentrifuge	Biofuge 15	Heraeus Sepatech 37250 Osterode
Zentrifuge	Kühlzentrifuge Sigma 4 K 10	B. Braun Biotech International 34212 Melsungen
Zentrifuge	Biofuge 15	Heraeus Sepatech 37250 Osterode
Zentrifuge	Biofuge A	Heraeus Sepatech 37250 Osterode
Zentrifuge	Megafuge1.0 R	Heraeus Sepatech 37250 Osterode
Zentrifuge 3K	Kühlzentrifuge Sigma 3 K 30	B. Braun Biotech International 34212 Melsungen

## 11.2 Chemikalien

Bezeichnung	Firma	Zusatz
2-Mercaptoethanol	Sigma	M3148
Agarose	Applichem + GIBCO / BRL	
Ampicillin	Applichem	A 0839
Bacto-Hefeextract	DIFCO	0127-17-9
Bacto-trypton	DIFCO	0123-17-3
BSA	Sigma	A 7808
Chloroform	Sigma	3691
Dextransulfat	Applichem	A2250
di-Natriumcitratdihydrat	Applichem	A3567
di-Natriumhydrogenphosphat	Merck	
DTT	Applichem	A1101
Eisessig	Fluka	45883
Ethanol	Roth	9065.2
Ethidiumbromid	Sigma	E2515
Ficoll	Sigma	
Formaldehyd	Merck	104.002
Formamid	Applichem	871
GTC	Roth	0017.2
Isoamylalkohol	Roth	8930.1
Isopropanol	Applichem	A 3928
Kaliumchlorid	Roth	A 6781.1
MOPS	Sigma	M1254
Natriumchlorid	Applichem	
Natriumdihydrogenphosphat-1- hydrat	Merck	A 672046
Natriumhydroxid	Roth	
N-Laurosylsarcosin	Sigma	L-5125
Paraformaldehyd	VWR	UN 2213
Phenol	Applichem	1578
Polyvinylpyrolidon PVP 40	Sigma	
Resin	BioRad	
Serdolit	Serva	17001
Sodiumodecylsulfat	Fluka	71727
Titriplex III /EDTA	Merck	108.421
Tris	Applichem	A1086
Triton X-100	Sigma	T 8787

### 11.3 Referenz der Sequenzdaten

<b>Protein/Gen</b>	<b>Abkürzung</b>	<b>Art</b>	<b>Nukleotide/ Protein</b>	<b>NCBI Acces.No.</b>
<b>18S rRNA</b>	18S	Gallus gallus	Nucleotide	AF173612.
<b>Arginin-Vasotocin</b>	AVT	Gallus gallus	Nukleotide	X55130; NM_205185
<b>β-Actin</b>	Act	Gallus gallus	Nukleotide	L08165
<b>Galanin</b>	Gal	Gallus gallus	Protein	S17147
<b>Galanin (Transkriptvariante 1)</b>	Gal (-TV1)	Gallus gallus	Nukleotide	CR386974
<b>Galanin Transkriptvariante 2</b>	Gal-TV2	Gallus gallus	Nukleotide	XM_421049
<b>Galanin Rezeptor Subtyp 1</b>	Gal-R1	Gallus gallus	Nukleotide	NC_006098
<b>Galanin Rezeptor Subtyp 2</b>	Gal-R2	Gallus gallus	Nukleotide	NC_006105
<b>Glyceraldehyd-3-phosphat Dehydrogenase</b>	GAPDH	Gallus gallus	Nukleotide	NM_204305
<b>Histon 2α</b>	His	Gallus gallus	Nukleotide	U38932
<b>RNA-Polymerase II</b>	RPII	Gallus gallus	Nukleotide	NM_001006448
<b>TATA-Box binding protein</b>	TBP	Gallus gallus	Nukleotide	NM_205103

<b>genomische Sequenz</b>	<b>Abkürzung</b>	<b>Art</b>	<b>Nukleotide</b>	<b>NCBI Acces.No.</b>
<b>Chromosom 2</b>	C2	Gallus gallus	Nukleotide	NW_001471639
<b>Chromosom 5</b>	C5	Gallus gallus	Nukleotide	NW_001471700
<b>Chromosom 11</b>	C11	Gallus gallus	Nukleotide	NW_001471434

## 11.4 Plasmawerte der Einzeltiere

### 11.4.1 Hähne

Tier-Nr.	Gruppe	Natrium [mmol/l]	Osmolalität [mosml/l]	AVT [pg/ml]
66	CO	157,4	308,0	25,7
68	CO	155,4	306,0	16,6
70	CO	154,8	306,0	14,2
72	CO	153,1	301,0	15,7
74	CO	153,5	308,5	13,7
10	CO	158,3	314,0	20,0
12	CO	153,9	309,5	30,2
14	CO	159,0	312,0	33,1
16	CO	161,3	325,0	26,8
18	CO	167,6	325,0	26,6
19	CO	159,1	325,0	24,1
67	DH	170,5	329,0	63,6
69	DH	168,0	326,5	64,3
71	DH	170,4	330,0	102,2
73	DH	181,2	344,5	50,5
75	DH	173,1	315,0	69,9
9	DH	169,9	335,0	70,8
11	DH	169,3	330,5	104,7
13	DH	171,2	335,0	91,5
15	DH	174,1	346,0	39,8
17	DH	176,6	346,0	62,7

## 10.4.2 Hennen

Tier-Nr.	Gruppe	Natrium [mmol/l]	Osmolalität [mosml/l]	AVT [pg/ml]
76	CO	150,9	305	5,2
78	CO	148,9	296,5	5,2
80	CO	148,5	299,5	4,9
82	CO	155,9	312,5	2,1
84	CO	150	298,5	5,6
20	CO	147,2	296,5	13,5
22	CO	148,7	297,5	16,7
25	CO	149,2	291,5	11,8
27	CO	150,1	300	7,6
29	CO	144,5	288	10,2
77	DH	178,6	342,5	62,3
79	DH	176,5	342	69,2
81	DH	180,5	345	75,8
83	DH	177,2	348,5	108,0
85	DH	178,7	342	74,3
21	DH	168,8	338	74,4
23	DH	170,7	343	97,4
24	DH	163,8	332	62,8
26	DH	172,4	344	83,5
28	DH	176,6	348,5	107,0

### 11.5 Northern Blot Auswertung

Geschlecht	Gruppe	Tier-Nr.	AVT normalisiert auf 18S [counts*mm <sup>2</sup> ]	AVT [%]	AVT MW [%]	Galanin normalisiert auf 18S [counts*mm <sup>2</sup> ]	Galanin [%]	Galanin MW [%]
männlich	CO	66	63386191873543	74,75	100,00	48008244411618	89,87	100,00
männlich	CO	68	136062798317732	160,45		53560408332201	100,26	
männlich	CO	70	84887594180970	100,10		51229575900258	95,90	
männlich	CO	72	54861604328199	64,70		60885093337369	113,97	
männlich	DH	67	71954992020895	84,85	73,44	50152682661268	93,88	86,61
männlich	DH	69	64882724000601	76,51		48945782940317	91,62	
männlich	DH	73	65585937132955	77,34		46657215903228	87,34	
männlich	DH	75	46695725185293	55,07		39312886879212	73,59	
weiblich	CO	76	29316874755548	78,15	100,00	35854309014960	98,28	100,00
weiblich	CO	78	39195296337028	104,49		34752171016096	95,26	
weiblich	CO	82	38936232134715	103,80		40964994925896	112,29	
weiblich	CO	84	42597430021323	113,56		34360576089051	94,18	
weiblich	DH	77	76733330540705	204,56	142,44	39486012142025	108,23	144,70
weiblich	DH	79	48623477313765	129,62		43636219726589	119,61	
weiblich	DH	81	51634361298070	137,65		48628756161813	133,29	
weiblich	DH	85	36729587280972	97,92		79405471537198	217,65	

## 11.6 Realtime PCR – Crossing Points (CPs)

Bei den in den nachfolgenden Tabellen aufgeführten CP-Werten je Gen handelt es sich um Mittelwerte einer Doppelbestimmung pro Tier.

### 11.6.1 Hähne

Tier-Nr.	Gruppe	Act	TBP	AVT	Gal11	Gal52	Gal62	GalR1	GalR2
66	CO	18,91	29,50	21,87	25,29	26,80	29,66	31,09	34,71
68	CO	18,92	29,90	22,03	25,47	26,59	29,09	32,06	33,56
70	CO	19,66	29,74	23,23	26,09	27,04	29,98	31,96	34,86
72	CO	19,24	30,02	23,09	26,49	27,49	30,15	32,65	n.d.
67	DH	20,12	30,70	23,94	26,96	28,05	31,55	32,57	35,48
69	DH	19,26	29,41	22,93	26,02	26,88	29,92	30,90	35,50
73	DH	19,67	30,65	22,38	26,50	27,88	30,38	31,74	35,07
75	DH	19,70	30,30	23,04	26,52	27,85	30,65	32,14	34,18

Effizienz      1,80      1,67      1,72      1,81      1,75      1,88      1,78      1,75

### 11.6.2 Hennen

Tier-Nr.	Gruppe	Act	TBP	AVT	Gal11	Gal52	Gal62	GalR1	GalR2
76	CO	20,44	31,91	23,89	27,53	28,99	31,40	32,78	34,55
78	CO	19,02	29,97	23,45	26,01	27,02	29,65	31,305	36,29
82	CO	19,09	29,54	23,68	26,60	28,33	30,47	30,69	35,68
84	CO	19,28	30,38	23,59	26,62	28,06	30,19	31,55	33,35
77	DH	19,92	30,70	22,81	26,67	28,28	30,71	31,24	34,44
79	DH	19,17	29,73	22,89	25,97	27,40	30,01	30,715	35,80
81	DH	20,34	30,87	23,19	27,01	28,55	30,69	32,075	35,01
85	DH	19,83	30,91	24,18	26,71	28,26	30,60	31,58	34,47

Effizienz      1,80      1,67      1,72      1,81      1,75      1,88      1,78      1,75

Die Auswertung der Daten erfolgte durch das Excel-Makro *Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test* © von Dr. Michael Pfaffl.

## 11.7 Intensitätsbestimmung – Laser-Raster-Mikroskopie

### 11.7.1 Hähne

#### 11.7.1.1 Bereich SON2

Tier	Gruppe			Intensität AVT			Intensität GAL		
		HG GAL	HG AVT	starke Zellen	mittlere Zellen	schwache Zellen	starke Zellen	mittlere Zellen	schwache Zellen
10	CO	50	50	990	750	210	480	270	140
		50	50	980	810	270	470	300	140
		50	50	1010	510	280	420	240	120
10	CO	50	50	1010	490	270	310	170	110
		50	50	1000	460	200	290	170	100
		50	50	970	420	260	260	210	100
16	CO	100	100	1750	1250	610	600	490	290
		100	100	1790	1200	600	580	480	260
		100	100	1520	1150	580	590	430	280
16	CO	150	200	2930	1200	630	880	470	360
		150	200	2880	1220	570	890	440	340
		150	200	1990	1230	580	770	460	330
18	CO	150	150	3260	2230	660	690	460	330
		150	150	2980	2140	720	560	420	360
		150	150	2650	1880	730	530	480	340
18	CO	150	100	3980	1820	560	520	470	190
		150	100	3350	2180	600	540	460	210
		150	100	2890	1470	590	500	410	200
13	DH	100	50	1750	1100	520	400	310	170
		100	50	1520	970	440	410	250	190
		100	50	1280	1060	480	340	290	180
13	DH	150	150	1800	1300	510	590	450	220
		150	150	1920	1180	460	530	400	280
		150	150	2100	1230	540	620	430	290
17	DH	50	50	2650	1190	590	670	420	160
		50	50	1270	930	580	640	380	210
		50	50	1210	1010	560	490	430	180
17	DH	50	50	1060	890	430	270	210	170
		50	50	1040	900	400	260	190	180
		50	50	940	610	440	240	210	170
9	DH	50	50	620	310	120	240	190	80
		50	50	430	280	120	200	200	110
		50	50	400	250	90	200	130	110



## 11.7.1.2 Bereich SON2-3

Tier	Gruppe			Intensität AVT			Intensität GAL		
		HG GAL	HG AVT	starke Zellen	mittlere Zellen	schwache Zellen	starke Zellen	mittlere Zellen	schwache Zellen
10	CO	50	100	1630	870	360	420	250	100
		50	100	1070	840	420	440	300	80
		50	100	1060	840	350	430	290	100
10	CO	50	100	1440	600	260	500	250	70
		50	100	970	680	300	430	280	70
		50	100	930	620	230	500	330	140
16	CO	100	100	1700	1270	420	2330	550	180
		100	100	1760	1030	390	1220	560	220
		100	100	1860	1060	410	950	550	150
16	CO	100	100	2720	1210	230	1060	450	270
		100	100	1870	1170	260	750	570	180
		100	100	1890	1560	280	740	500	200
18	CO	100	100	2000	1180	320	390	200	100
		100	100	1840	1000	320	440	210	140
		100	100	1950	1440	410	460	260	130
11	DH	100	100	1020	470	170	340	220	150
		100	100	1230	630	240	330	250	160
		100	100	1100	490	200	290	280	170
11	DH	100	100	850	670	260	380	300	110
		100	100	860	500	270	360	230	150
		100	100	910	530	290	320	210	170
13	DH	100	50	1010	580	250	350	200	110
		100	50	890	570	220	370	240	100
		100	50	790	610	230	340	260	130
13	DH	100	50	1670	720	270	740	250	140
		100	50	1650	500	310	410	270	180
		100	50	1240	610	260	440	290	190
17	DH	50	50	800	550	230	210	110	80
		50	50	920	640	230	220	100	90
		50	50	850	520	230	150	100	90
17	DH	50	100	1040	370	190	210	150	110
		50	100	760	580	210	270	180	110
		50	100	890	570	190	240	160	80
9	DH	50	150	2450	1570	810	70	0	0
		50	150	2450	1680	810	70	0	0
		50	150	2100	1940	870	80	0	0
9	DH	150	150	2480	1410	540	550	370	180
		150	150	2010	1440	650	530	380	180
		150	150	2450	1470	780	430	200	200

## 11.7.1.3 Bereich SON3

Tier	Gruppe			Intensität AVT			Intensität GAL		
		HG GAL	HG AVT	starke Zellen	mittlere Zellen	schwache Zellen	starke Zellen	mittlere Zellen	schwache Zellen
10	CO	50	100	1290	490	250	460	340	80
		50	100	1600	910	280	410	260	100
		50	100	1120	560	370	370	200	110
10	CO	50	100	980	280	160	300	170	90
		50	100	720	340	170	310	200	80
		50	100	560	360	210	300	240	110
16	CO	50	100	1040	850	420	550	290	110
		50	100	1030	580	290	410	330	140
		50	100	890	740	310	450	240	100
16	CO	50	100	990	710	310	490	240	170
		50	100	990	670	210	450	310	180
		50	100	940	590	200	420	220	100
18	CO	100	100	1030	560	340	570	360	150
		100	100	850	740	410	460	320	160
		100	100	770	660	350	440	300	170
18	CO	100	100	1050	750	230	400	220	120
		100	100	980	640	270	360	290	170
		100	100	800	460	190	300	230	200
11	DH	100	200	1030	530	320	330	280	150
		100	200	770	570	270	420	250	180
		100	200	760	480	360	300	240	160
13	DH	50	50	460	340	190	210	190	130
		50	50	410	350	150	240	160	100
		50	50	420	270	170	210	190	80
17	DH	50	50	1040	360	210	430	130	100
		50	50	590	470	200	250	160	50
		50	50	720	480	190	240	180	90
17	DH	50	50	420	260	80	160	110	50
		50	50	520	280	130	170	100	80
		50	50	450	220	100	170	120	80
9	DH	100	200	1710	1090	470	350	280	90
		100	200	1560	1080	630	321	220	80
		100	200	1500	1080	490	310	270	100

## 11.7.1.4 Bereich SONE

Tier	Gruppe			Intensität AVT			Intensität GAL		
		HG GAL	HG AVT	starke Zellen	mittlere Zellen	schwache Zellen	starke Zellen	mittlere Zellen	schwache Zellen
10	CO	50	50	770	350	270	290	250	90
		50	50	840	500	150	360	260	110
		50	50	770	510	170	250	230	180
10	CO	50	50	800	400	170	200	180	90
		50	50	780	290	110	170	140	70
		50	50	470	280	260	190	100	100
16	CO	50	50	2770	630	250	370	170	120
		50	50	1980	650	290	340	230	120
		50	50	1070	600	220	240	200	110
16	CO	50	50	800	600	190	210	100	60
		50	50	840	660	170	190	110	60
		50	50	790	470	150	190	150	60
18	CO	50	50	1000	420	170	320	210	110
		50	50	650	410	250	260	150	120
		50	50	740	360	280	250	130	120
18	CO	50	50	940	370	210	330	150	100
		50	50	640	290	210	300	140	100
		50	50	630	460	250	270	150	90
13	DH	50	50	1220	470	190	1410	230	120
		50	50	1120	760	260	270	160	140
		50	50	830	680	270	270	180	110
13	DH	50	50	1170	540	210	410	210	100
		50	50	1060	650	360	310	260	140
		50	50	930	570	260	360	200	180
17	DH	50	50	880	430	100	210	130	80
		50	50	720	400	190	170	150	90
		50	50	590	300	140	160	140	100
17	DH	50	50	1040	530	250	400	230	120
		50	50	980	760	250	320	250	140
		50	50	880	720	160	260	180	140
9	DH	50	50	2050	1750	590	1150	230	140
		50	50	1840	1060	940	380	270	140
		50	50	2020	1610	600	340	250	180
9	DH	75	50	1720	940	680	320	190	170
		75	50	1560	1200	860	330	200	170
		75	50	1940	1130	610	310	200	180

## 11.7.2 Hennen

### 11.7.2.1 Bereich SON2

Tier	Gruppe			Intensität AVT			Intensität GAL		
		HG GAL	HG AVT	starke Zellen	mittlere Zellen	schwache Zellen	starke Zellen	mittlere Zellen	schwache Zellen
20	CO	125	150	1150	900	560	780	400	300
		125	150	1100	800	500	750	370	200
		125	150	1050	700	440	720	340	100
20	CO	150	100	2100	1600	1000	550	410	380
		150	100	2050	1530	970	520	400	350
22	CO	75	75	950	460	330	480	220	160
		75	75	750	490	270	380	210	170
		75	75	700	340	280	360	200	130
22	CO	100	110	1600	900	290	350	270	190
		100	110	1650	960	380	370	260	180
		100	110	1100	950	270	360	260	160
21	DH	75	50	710	300	280	320	200	80
		75	50	690	290	270	300	180	70
		75	50	670	280	260	280	160	70
21	DH	75	75	650	410	210	220	180	80
		75	75	640	410	200	220	170	80
23	DH	100	300	760	390	280	510	200	155
		100	300	580	290	220	440	230	0
		100	300	780	440	220	230	155	0
23	DH	100	300	1100	520	290	460	230	160
		100	300	620	450	310	470	230	180
		100	300	570	370	330	890	200	160

## 11.7.2.2 Bereich SON2-3

Tier	Gruppe			Intensität AVT			Intensität GAL		
		HG GAL	HG AVT	starke Zellen	mittlere Zellen	schwache Zellen	starke Zellen	mittlere Zellen	schwache Zellen
20	CO	150	100	1950	1000	650	290	270	220
		150	100	1250	750	420	320	280	250
		150	100	1380	850	510	350	280	260
20	CO	200	100	1990	920	650	500	280	250
		200	100	2200	1100	410	410	310	250
		200	100	1750	880	560	490	290	200
22	CO	150	110	1950	870	460	710	320	190
		150	110	1250	790	470	570	310	240
		150	110	1290	780	390	510	300	220
22	CO	100	100	1850	840	410	450	300	260
		100	100	1650	850	370	410	270	200
		100	100	1420	700	380	390	290	270
25	CO	150	150	1610	920	430	970	460	370
		150	150	1550	830	510	600	490	220
		150	150	1190	690	550	650	470	280
25	CO	200	175	1490	880	780	810	520	440
		200	175	1320	960	640	710	510	390
		200	175	1280	980	590	790	510	420
28	DH	125	150	610	490	280	440	350	290
		125	150	740	470	190	410	340	310
		125	150	510	420	270	410	380	320
28	DH	100	125	570	420	300	960	290	210
		100	125	680	450	270	340	270	150
		100	125	540	390	210	320	240	220
21	DH	150	75	1600	1000	650	650	390	170
		150	75	1690	810	490	550	380	290
		150	75	2000	1100	470	510	390	290
21	DH	150	100	1300	900	410	390	290	210
		150	100	1150	1100	480	370	280	250
		150	100	1200	740	490	380	290	240
23	DH	150	100	1000	540	420	520	240	150
		150	100	1200	510	320	390	280	190
		150	100	980	610	250	320	270	180
23	DH	100	100	1150	670	290	480	280	180
		100	100	990	810	400	460	290	190
		100	100	1100	650	350	400	300	210

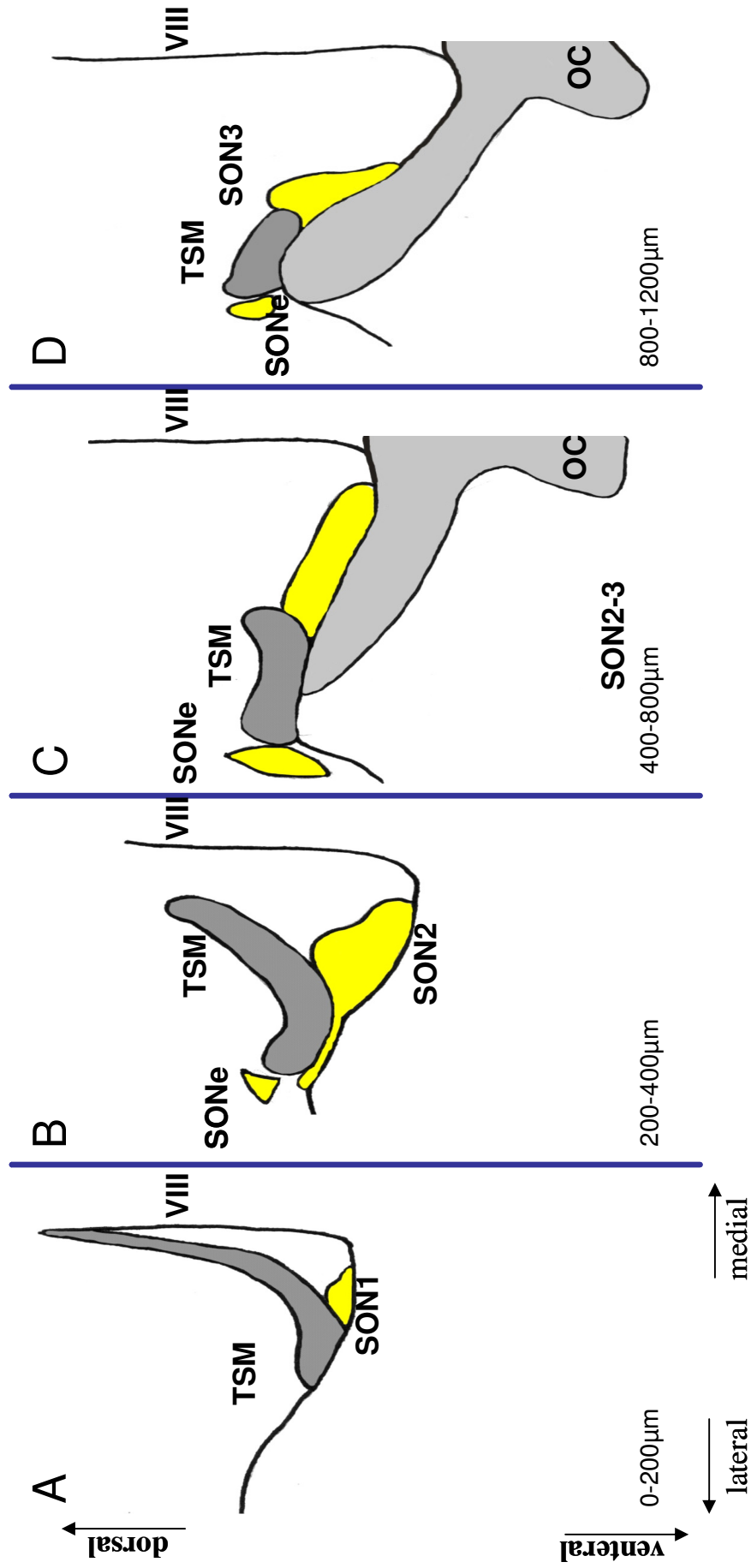
## 11.7.2.3 Bereich SON3

Tier	Gruppe			Intensität AVT			Intensität GAL		
		HG GAL	HG AVT	starke Zellen	mittlere Zellen	schwache Zellen	starke Zellen	mittlere Zellen	schwache Zellen
20	CO	125	100	860	650	490	420	280	250
		125	100	950	800	590	320	280	250
		125	100	1010	750	740	390	290	180
20	CO	150	150	820	490	250	720	530	300
		150	150	580	480	240	760	580	420
		150	150	550	350	220	660	480	350
22	CO	150	200	1600	720	490	1900	570	380
		150	200	1100	620	390	1070	550	380
		150	200	1150	950	380	690	590	450
22	CO	150	200	1590	690	250	1190	710	460
		150	200	1290	990	410	1090	690	460
		150	200	1200	720	380	920	660	420
25	CO	175	150	760	440	350	610	420	280
		175	150	750	570	360	720	430	280
		175	150	600	420	260	590	390	310
25	CO	200	175	690	560	350	870	400	250
		200	175	890	620	460	680	330	260
		200	175	720	510	370	780	370	290
28	DH	125	150	690	390	290	600	440	180
		125	150	710	320	200	580	360	260
		125	150	580	390	220	570	340	280
28	DH	100	100	530	310	170	240	210	160
		100	100	520	340	190	240	190	160
		100	100	480	270	190	210	170	150
21	DH	125	125	510	290	260	410	290	290
		125	125	530	300	170	400	380	280
		125	125	480	310	180	390	320	210
21	DH	150	125	1150	690	260	700	290	210
		150	125	1100	770	270	530	320	230
		150	125	1000	640	250	510	340	280
23	DH	175	150	1150	490	200	590	440	240
		175	150	990	390	350	450	380	320
		175	150	620	460	270	590	380	250
23	DH	150	150	550	270	220	560	440	340
		150	150	530	300	220	580	420	350
		150	150	430	270	190	540	390	310

## 11.7.2.4 Bereich SONE

Tier	Gruppe			Intensität AVT			Intensität GAL		
		HG GAL	HG AVT	starke Zellen	mittlere Zellen	schwache Zellen	starke Zellen	mittlere Zellen	schwache Zellen
20	CO	100	150	1780	990	690	560	490	270
		100	150	2250	940	610	530	360	240
		100	150	1600	780	490	520	450	340
20	CO	75	150	340	320	170	520	390	250
		75	150	380	200	0	430	390	320
		75	150	580	190	0	410	380	330
22	CO	100	100	1350	390	280	420	330	190
		100	100	1050	540	370	400	340	190
		100	100	740	520	230	390	250	240
22	CO	100	150	260	180	150	310	260	220
		100	150	210	180	0	290	260	220
		100	150	220	170	0	270	250	240
25	CO	75	150	840	540	490	1090	470	220
		75	150	790	650	460	670	350	240
		75	150	860	490	480	620	360	260
25	CO	75	125	1400	825	280	1000	590	320
		75	125	1250	800	385	645	575	265
		75	125	1250	820	525	600	595	375
28	DH	75	175	400	310	190	0	0	0
		75	175	340	290	260	0	0	0
		75	175	360	250	240	0	0	0
28	DH	50	125	480	360	150	580	340	190
		50	125	460	370	210	510	270	210
		50	125	390	360	200	390	270	220
21	DH	100	100	1080	400	290	300	250	190
		100	100	750	640	350	300	250	180
		100	100	830	610	280	260	220	170
21	DH	100	100	1950	650	290	290	270	0
		100	100	670	630	320	280	200	0
		100	100	660	480	370	270	0	0
23	DH	100	100	890	590	340	480	300	290
		100	100	660	640	200	390	290	250
		100	100	1150	460	290	380	320	200
23	DH	100	100	610	470	330	630	580	250
		100	100	660	480	340	610	520	260
		100	100	710	360	340	710	420	280

# Bereiche des SON



**Abb. 11-1:** Bereiche des Supraoptischen Nukleus (schematische Darstellung): SON = Nucleus supraopticus, TSM = Tractus septomesencephalicus; VIII = dritter Ventrikel





## Erklärung zur Dissertation

Hierdurch erkläre ich, dass die Dissertation \_\_\_\_\_

“Untersuchung der Vasotocin- und Galanin-Expression nach osmotischer Stimulation

im Hühnergehirn“\_\_\_\_\_

selbstständig verfasst und alle benutzten Hilfsmittel sowie evtl. zur Hilfeleistung herangezogene Institutionen vollständig angegeben wurden.

Die Dissertation wurde nicht schon als Diplom- oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet.

Hannover, den 05. Oktober 2008

Sandra Kriegelstein

(Unterschrift)

Name: Sandra Kriegelstein

# CURRICULUM VITAE

## Persönliche Daten

---

Name: **Sandra Kriegelstein**  
Anschrift: Tonstr. 6  
30449 Hannover  
Telefon: 0511/2135351  
Email: *kstein@tzv.fal.de*  
geboren: 06. Juni 1976  
Staatsangehörigkeit: deutsch

## Berufserfahrung

---

- Dezember 2008 Abschluss des Promotionsverfahrens  
Titel der Dissertation: „**Untersuchung der Vasotocin- und Galanin-Expression nach osmotischer Stimulation im Hühnergehirn**“  
unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. Nahid Parvizi
- Juni 2003 - Wissenschaftliche Mitarbeiterin (Doktorandin) des  
Dezember 2008 Friedrich-Löffler-Institutes, Bundesforschungsinstitut für  
Tiergesundheit, Institut für Nutztiergenetik, Mariensee  
Abteilung: Funktionelle Genetik und Bioregulation,  
Dir. & Prof. Dr. Roland Grossmann

## Universitäre Ausbildung

---

- 2001- 2002 Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für experimentelle  
Endokrinologie in Hannover;  
Abteilung: Neuroendokrinologie; Prof. K. Bauer  
Titel der Diplomarbeit: „**Die Entwicklung des männlichen Genitaltrakts und testikulärer Funktionen in Abhängigkeit vom Schilddrüsenhormonspiegel der Maus**“
- 1995-2002 Studium der Biologie (Diplom) an der Universität Osnabrück

## Schulische Ausbildung

---

- 1995 Abitur  
1986-1995 Ulrich-von-Hutten-Gymnasium, Schlüchtern  
1982-1986 Bergwinkel Grundschule, Schlüchtern

## Praktika

---

- August 1998 vierwöchiges Praktikum am Max-Planck-Institut für  
Limnologie in Plön  
Abteilung: Ökophysiologie; Dr. K. Jürgens
- August-  
September 2000 sechswöchiges Laborpraktikum am Max-Planck-Institut für  
Biophysikalische Chemie in Göttingen  
Abteilung: Neurobiologie; Prof. Dr. R. Jahn