

## Inhalt

Verwendete Abkürzungen .....	1
1. Einleitung .....	3
2. Literaturübersicht.....	4
2.1. Zur embryonalen Entwicklung des Huhnes .....	4
2.2. Entwicklung des Herz-Kreislaufsystems und dessen Energiegewinnung.....	5
2.2.1.1. Der Einfluss der Temperatur.....	6
2.2.1.2. Entwicklung des Herzstoffwechsels.....	6
2.3. Das vaskuläre System.....	8
2.4. Entwicklung der Sauerstoffversorgung .....	9
2.5. Sauerstoffmangel.....	11
2.5.1. Zeitliche Einteilung der Adaptationsphasen an Sauerstoffmangel .....	12
2.5.2. Regionale Unterschiede bei Sauerstoffmangel.....	13
2.6. Adaptation.....	13
2.6.1. Adaptation an Sauerstoffmangel .....	14
2.6.1.1. Hypoxia Inducible Factor (HIF) .....	14
2.6.1.2. Auswirkungen des Sauerstoffmangels auf das Herz-Kreislauf-System .....	18
2.6.1.3. Auswirkungen des Sauerstoffmangels auf den Stoffwechsel .....	21
2.6.2. Adaptation des embryonalen Herz-Kreislaufsystems an erhöhte Temperaturen .....	26
2.6.3. Adaptation des embryonalen Herz-Kreislaufsystems an Sauerstoffmangel kombiniert mit erhöhten Temperaturen .....	30
2.7. Zusammenfassung der Literaturübersicht .....	31
3. Material und Methoden.....	33
3.1. Herkunft der Hühnereier .....	33
3.2. Inkubationsbedingungen .....	33
3.2.1. Temperatur.....	34
3.2.2. Luftfeuchte .....	34
3.2.3. Sauerstoffgehalt .....	34
3.3. Gewinnung und Aufbereitung der Proben.....	35
3.3.1. Präparation der Herzen .....	35
3.3.2. Stabilisierung und Konservierung der Proben.....	35
3.4. Morphologische Untersuchungen.....	35
3.4.1. Bestimmung der Körpermasse .....	35
3.4.2. Bestimmung der Herzmasse .....	35
3.4.3. Bestimmung des Massenverlusts .....	36
3.4.4. Bestimmung der Missbildungs- und Mortalitätsrate .....	36

3.5. Molekulargenetische Untersuchungen.....	36
3.5.1. messenger RNA (mRNA) .....	36
3.5.1.1. Umgang mit RNA .....	36
3.5.1.2. Gewebezerkleinerung und -aufarbeitung .....	36
3.5.2. Bewertung der Gesamt-RNA.....	37
3.5.2.1. Photometrische Messung .....	37
3.5.2.2. Qualitätsanalyse mittels miniaturisierter Kapillarelektrophorese .....	37
3.5.3. Herstellung von cDNA („complementary“= komplementäre DNA).....	38
3.5.4. Konventionelle PCR (Polymerase Chain Reaction) .....	38
3.5.5. Quantitative oder Real-Time PCR (qPCR).....	38
3.5.6. Primeretablierung.....	39
3.5.6.1. Primerdesign .....	39
3.5.6.2. Etablierung .....	40
3.5.7. Referenzgene=„Housekeeper“ .....	42
3.5.7.1. Etablierung der „Housekeeping-Gene“ und Primer .....	42
3.5.8. Kontrollen .....	43
3.6. Auswertung .....	44
3.6.1. Auswertung der morphologischen Untersuchungen .....	44
3.6.2. Auswertung der molekulargenetischen Untersuchungen .....	44
3.6.2.1. Relative Quantifizierung .....	44
3.6.2.2. PCR-Kinetik.....	44
3.6.2.3. Effizienz (E) .....	46
3.6.2.4. Genexpressionsprofile.....	49
4. Ergebnisse .....	52
4.1. Morphologische Untersuchungen .....	52
4.1.1. Relative Körpermasse .....	52
4.1.2. Relative Herzmasse .....	55
4.1.3. Massenverlust .....	57
4.1.4. Mortalität .....	59
4.1.4.1. Mortalität in Relation zu den Inkubationstagen .....	59
4.1.4.2. Mortalität innerhalb der Versuchsgruppen .....	60
4.1.5. Missbildungen .....	62
4.2. Molekulargenetische Untersuchungen.....	63
4.2.1. Genexpressionsprofile der ausgewählten Zielgene .....	64
4.2.1.1. Expressionsprofil des Hypoxia Inducible Factor 1 $\alpha$ (HIF1 $\alpha$ ).....	64
4.2.1.2. Expressionsprofil des Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGFA) .....	65
4.2.1.3. Expressionsprofil der Enolase 1 (ENO1) .....	66

4.2.1.4.	Expressionsprofil der Hämoxygenase 1 (HO1).....	67
4.2.1.5.	Expressionsprofil der Glutathionperoxidase 3 (GPx-3) .....	68
4.2.1.6.	Expressionsprofil des Hitzeschockprotein 90 (HSP90) .....	69
4.2.2.	Ergebnisse an den unterschiedlichen Entwicklungstagen.....	70
4.2.2.1.	Expression der untersuchten Gene am Inkubationstag D10-24h .....	70
4.2.2.2.	Expression der untersuchten Gene am Inkubationstag D10 .....	71
4.2.2.3.	Expression der untersuchten Gene am Inkubationstag D12 .....	72
4.2.2.4.	Expression der untersuchten Gene am Inkubationstag D16 .....	73
4.2.2.5.	Expression der untersuchten Gene am Inkubationstag D18 .....	74
4.2.2.6.	Expression der untersuchten Gene am Inkubationstag D20 .....	75
4.3.	Zusammenfassung der Ergebnisse .....	76
4.3.1.	Morphologische Untersuchungen .....	76
4.3.1.1.	Relative Embryonen- und Herzmassen und relativer Massenverlust .....	76
4.3.1.2.	Mortalität und Missbildungen .....	76
4.3.2.	Molekulargenetische Untersuchungen.....	77
4.3.2.1.	Übersicht der Expression der untersuchten Zielgene.....	77
4.3.2.2.	Übersicht über die Genexpressionen an den Inkubationstagen .....	78
4.3.2.3.	Tabellarische Übersicht der Genregulationen .....	80
5.	Diskussion.....	81
5.1.	Auswahl der Probenmenge .....	81
5.2.	Einfluss der Stressoren auf die morphologischen Parameter .....	82
5.2.1.	Einfluss der Stressoren auf die Embryonen- und Herzmassen und den Massenverlust .....	82
5.2.2.	Einfluss der Stressoren auf die Entstehung von Missbildungen und auf die Mortalität .....	86
5.3.	Einfluss der Stressoren auf die Genexpression .....	89
5.3.1.	Einfluss der Stressoren auf die Expression von HIF1 $\alpha$ .....	89
5.3.2.	Einfluss der Stressoren auf die Expression von Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGFA) .....	90
5.3.3.	Einfluss der Stressoren auf die Expression von Enolase 1 (ENO1) .....	91
5.3.4.	Einfluss der Stressoren auf die Expression von Hämoxygenase 1 (HO1).....	93
5.3.5.	Einfluss der Stressoren auf die Expression der Glutathionperoxidase (GPx-3). .....	93
5.3.6.	Einfluss der Stressoren auf die Expression von Hitzeschockprotein 90 (HSP90) .....	93
5.3.7.	Altersabhängige Unterschiede in der Genexpression .....	95
5.4.	Einfluss des Sauerstoffmangels .....	96

5.5.	Einfluss der Temperaturerhöhung .....	101
5.6.	Einfluss des Sauerstoffmangels kombiniert mit erhöhter Temperatur .....	102
5.7.	Zusammenfassung der Diskussion.....	104
6.	Zusammenfassung.....	107
7.	Summary.....	109
8.	Zitierte Literatur .....	111
9.	Anhang.....	136
9.1.	Inkubation der Hühnerembryonen .....	136
9.2.	Messung morphologischer Parameter .....	136
9.3.	Gewinnung und Aufarbeitung der Proben.....	136
9.3.1.	Gewinnung der Herzen .....	136
9.3.2.	Aufarbeitung der stabilisierten Gewebeprobe.....	136
9.4.	Photometrische Bestimmung des RNA-Gehaltes .....	137
9.5.	cDNA-Synthese.....	137
9.5.1.	Verwendete Arbeitsmaterialien.....	137
9.5.2.	Zusammensetzung des cDNA-Reaktionsansatzes .....	137
9.5.3.	Reaktionsprotokoll der cDNA-Synthese.....	137
9.6.	Recherche und Herstellung synthetischer Oligonucleotide (Primer) .....	137
9.6.1.	Verwendete Internetseiten.....	137
9.6.2.	Primerhersteller .....	138
9.6.3.	DNA-Gelelektrophorese .....	138
9.7.	kPCR.....	138
9.7.1.	Zusammensetzung des Reaktionsansatzes der kPCR .....	138
9.7.2.	Reaktionsprotokoll der kPCR .....	138
9.7.3.	Verwendete Arbeitsmaterialien.....	138
9.8.	qPCR .....	139
9.8.1.	Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für eine qPCR .....	139
9.8.2.	Reaktionsprotokoll der qPCR .....	139
9.8.3.	Verwendete Arbeitsmaterialien.....	139
9.8.4.	Sequenzen verwendeter Primer .....	140
9.8.5.	FC-Werte .....	140
10.	Publikationsverzeichnis.....	144
11.	Danksagung .....	145
12.	Eidesstattliche Erklärung .....	146