

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 Hühnerreier.....	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 α (HIF1 α).....	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 Hämoxigenase 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 Probentage	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 α	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 Hämoxigenase 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 Gewebeproben	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-Gelektrophorese	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