

| | | |
|------------|---|-----------|
| 1 | EINLEITUNG | 11 |
| 2 | LITERATURÜBERSICHT | 13 |
| 2.1 | Entwicklung eines Hühnerembryo | 13 |
| 2.1.1 | Entwicklungsstadien der Embryogenese | 13 |
| 2.1.2 | Entwicklung des Herz- und Kreislaufsystems sowie seines Stoffwechsels | 13 |
| 2.1.3 | Entwicklung der Sauerstoffversorgung | 16 |
| 2.2 | Adaptation | 20 |
| 2.3 | Auswirkungen des Sauerstoffmangels | 23 |
| 2.3.1 | Zeitliche Einteilung der Adaptationsphasen an Sauerstoffmangel | 23 |
| 2.3.2 | Senkung des Energieverbrauchs | 23 |
| 2.3.3 | Effektivere Sauerstoffbereitstellung | 29 |
| 2.3.4 | Anaerobe Energiegewinnung | 33 |
| 2.4 | Zusammenfassung der Literatur | 40 |
| 3 | MATERIAL UND METHODEN | 41 |
| 3.1 | Inkubation der Hühnerembryonen | 41 |
| 3.1.1 | Herkunft und Bebrütung der Hühnerembryonen | 41 |
| 3.1.2 | Messung des Sauerstoffgehaltes im Brutschrank | 41 |
| 3.1.3 | Versuchsablauf | 43 |
| 3.2 | Gewinnung und Aufbereitung der Proben | 44 |
| 3.2.1 | Präparation der Hühnerembryonen und der Herzen | 44 |
| 3.3 | Messung morphologischer Parameter | 44 |
| 3.3.1 | Bestimmung der Körpermasse | 44 |
| 3.3.2 | Bestimmung des Herzgewichtes | 45 |
| 3.3.3 | Auswertung der Gewichtsentwicklung | 45 |
| 3.4 | Isolierung der Gesamt-RNA aus tierischen Zellen | 45 |
| 3.4.1 | Stabilisierung der Proben RNA | 45 |
| 3.4.2 | Aufarbeitung der stabilisierten Gewebeproben | 45 |
| 3.4.3 | Photometrische Bestimmung des RNA-Gehaltes | 46 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 3.5 | Konventionelle PCR | 47 |
| 3.5.1 | PCR und RT-PCR allgemein | 47 |
| 3.5.2 | Recherche und Herstellung synthetischer Oligonucleotide für die konventionelle PCR | 47 |
| 3.5.3 | Protokoll der RT-PCR | 48 |
| 3.5.4 | DNA-Gelelektrophorese | 48 |
| 3.5.5 | PCR zur Vermehrung eines PCR-Produktes (Massen-PCR) | 48 |
| 3.5.6 | Aufreinigung eines PCR-Produktes | 49 |
| 3.5.7 | Extraktion einer DNA-Bande aus einem Elektrophoresegel | 49 |
| | | |
| 3.6 | Klonierung von Plasmiden | 50 |
| 3.6.1 | Klonierung von DNA in Plasmiden allgemein | 50 |
| 3.6.2 | Anfügen von Adenosin-Überhängen (A) | 50 |
| 3.6.3 | Ligationsprotokoll | 50 |
| 3.6.4 | Transformationsprotokoll | 51 |
| 3.6.5 | Selektion plasmidtragender Bakterien | 52 |
| 3.6.6 | Präparation von Plasmid-DNA aus kleinen Bakterienkulturen | 52 |
| 3.6.7 | Prüfen auf das Vorhandensein des Inserts im Plasmid durch Restriktionsverdau | 53 |
| 3.6.8 | Vermehrung von Plasmiden im mittleren Maßstab (Midi-Prep-Verfahren) | 54 |
| 3.6.9 | Sequenzierung | 55 |
| 3.6.10 | Herstellung von Luria Bartrani (LB) Agarplatten | 55 |
| 3.6.11 | Herstellung von LB-Medium | 55 |
| | | |
| 3.7 | Quantitative PCR | 56 |
| 3.7.1 | Allgemeines | 56 |
| 3.7.2 | cDNA-Synthese | 57 |
| 3.7.3 | Protokoll der qPCR | 57 |
| 3.7.4 | Recherche und Herstellung synthetischer Oligonucleotide für die qPCR | 58 |
| 3.7.5 | Etablierungsverfahren | 58 |
| 3.7.6 | Referenzgene | 60 |
| 3.7.7 | Kontrollen | 60 |
| 3.7.8 | Auswertung der qPCR-Ergebnisse | 60 |
| 3.7.9 | Relative Quantifizierung (dCT-Methode) | 61 |
| 3.7.10 | Auswertung der dC _T - und FC-Werte | 62 |
| | | |
| 3.8 | Auswahl der untersuchten Gene | 63 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 4 | ERGEBNISSE | 64 |
| 4.1 | Veränderungen im Hühnerembryo an D10 nach Inkubation bei 15% O₂ und 40,0°C über 24 Stunden (V0) | 64 |
| 4.1.1 | Vergleich der Genexpressionsraten von VEGF, Enolase, PFK und AMPK | 64 |
| 4.1.2 | Verhalten der Embryonen- und Herzmassen | 65 |
| 4.2 | Veränderungen im Hühnerembryo an D12 nach Inkubation bei 15% O₂ über 6 d (V1) | 66 |
| 4.2.1 | Vergleich der Genexpressionsraten von VEGF, Enolase, PFK und AMPK | 66 |
| 4.2.2 | Verhalten der Embryonen- und Herzmassen | 67 |
| 4.3 | Veränderungen im Hühnerembryo an D18 nach Inkubation bei 15% O₂ von D6-12 und 21% O₂ von D13-18 (V2) | 68 |
| 4.3.1 | Vergleich der Genexpressionsraten von VEGF, Enolase, PFK und AMPK | 68 |
| 4.3.2 | Verhalten der Embryonen- und Herzmassen | 69 |
| 4.4 | Veränderungen im Hühnerembryo an D18 nach Inkubation bei 15% O₂ von D6-12, 21% O₂ von D13-18 und 0% O₂ über 30 Minuten an D18 (V3) | 70 |
| 4.4.1 | Vergleich der Genexpressionsraten von VEGF, Enolase, PFK und AMPK | 70 |
| 4.4.2 | Verhalten der Embryonen- und Herzmassen | 71 |
| 4.5 | Veränderungen im Hühnerembryo an D18 nach Inkubation bei 15% O₂ von D6-12, 21% O₂ von D13-18 und 0% O₂ über 45 Minuten an D18 (V4) | 72 |
| 4.5.1 | Vergleich der Genexpressionsraten von VEGF, Enolase, PFK und AMPK | 72 |
| 4.5.2 | Verhalten der Embryonen- und Herzmassen | 73 |
| 4.6 | Veränderungen im Hühnerembryo bei 21% O₂ in Abhängigkeit vom Alter | 74 |
| 4.6.1 | Vergleich der Genexpressionsraten von VEGF, Enolase, PFK und AMPK | 74 |
| 4.6.2 | Verhalten der Embryonen- und Herzmassen | 75 |
| 4.7 | Vergleich der Reaktionen von Hühnerembryonen auf 30 min andauernde Anoxie an D18 nach Inkubation bei 15% bzw. 21% O₂ von D6-12 | 76 |
| 4.7.1 | Vergleich der Genexpressionsraten von VEGF, Enolase, PFK und AMPK | 76 |
| 4.7.2 | Verhalten der Embryonen- und Herzmassen | 77 |
| 4.8 | Vergleich der Reaktionen von Hühnerembryonen auf 45 min andauernde Anoxie an D18 nach Inkubation bei 15% bzw. 21% O₂ von D6-12 | 78 |
| 4.8.1 | Vergleich der Genexpressionsraten von VEGF, Enolase, PFK und AMPK | 78 |

| | | |
|-------------|--|------------|
| 4.8.2 | Verhalten der Embryonen- und Herzmassen unter Normoxie in Abhängigkeit vom Alter an D10, D12 und D18 | 79 |
| 4.9 | Vergleich der Reaktion des Hühnerembryos auf 30 Minuten bzw. 45 Minuten andauernde Anoxie an D18 nach Inkubation bei 15% bzw. 21% O₂ von D6-12 | 80 |
| 4.9.1 | Vergleich der Genexpressionsraten von VEGF, Enolase, PFK und AMPK | 80 |
| 4.9.2 | Verhalten der Embryonen- und Herzmassen | 81 |
| 4.10 | Zusammenfassung der Ergebnisse | 82 |
| 4.10.1 | Veränderungen in der Genexpression | 82 |
| 4.10.2 | Verhalten der Embryonen- und Herzmassen | 82 |
| 5 | DISKUSSION | 83 |
| 5.1 | Versuchsbedingungen | 83 |
| 5.1.1 | Auswahl der untersuchten Parameter | 83 |
| 5.1.2 | RNA-Stabilität und Qualitätskontrollen | 84 |
| 5.1.3 | Statistische Auswertung | 85 |
| 5.2 | Genexpressionsprofile in Herzgeweben unter Sauerstoffmangel | 86 |
| 5.2.1 | Altersabhängiger Anstieg der Genexpression | 86 |
| 5.2.2 | Einfluss von akutem oder chronischem Sauerstoffmangel auf die Genexpression | 87 |
| 5.2.3 | Einfluss von Sauerstoffmangel und Hyperthermie auf die Genexpression | 91 |
| 5.2.4 | Zusammenfassung der Diskussion zu den Genexpressionsprofilen unter Sauerstoffmangel | 92 |
| 5.3 | Einfluss des Sauerstoffmangels auf die Embryonen- und Herzmassen | 93 |
| 5.3.1 | Zusammenfassung der Diskussion zur Massenentwicklung | 94 |
| 5.4 | Zusammenfassung der Diskussion | 95 |
| 6 | SUMMARY | 98 |
| 7 | LITERATURVERZEICHNIS | 102 |
| 8 | ANHANG | 116 |

| | | |
|------------|---|------------|
| 8.1 | Inkubation der Hühnerembryonen | 116 |
| 8.1.1 | Herkunft und Bebrütung der Hühnerembryonen | 116 |
| 8.1.2 | Messung des Sauerstoffgehaltes im Brutschrank | 116 |
| 8.2 | Gewinnung und Aufarbeitung der Proben | 116 |
| 8.2.1 | Präparation der Hühnerembryonen und der Herzen | 116 |
| 8.3 | Messung morphologischer Parameter | 117 |
| 8.4 | Isolierung der Gesamt-RNA aus tierischen Zellen | 117 |
| 8.4.1 | Stabilisierung der Proben-RNA | 117 |
| 8.4.2 | Aufarbeitung der stabilisierten Gewebeproben | 117 |
| 8.4.3 | Photometrische Bestimmung des RNA-Gehaltes | 117 |
| 8.5 | Konventionelle PCR | 117 |
| 8.5.1 | Recherche und Herstellung synthetischer Oligonucleotide | 117 |
| 8.5.2 | Protokoll der RT-PCR | 118 |
| 8.5.3 | DNA-Gelelektrophorese | 118 |
| 8.5.4 | PCR zur Vermehrung eines PCR-Produktes (Massen-PCR) | 119 |
| 8.5.5 | Aufreinigung eines PCR-Produktes | 119 |
| 8.5.6 | Gelextraktion von DNA | 119 |
| 8.6 | Klonierung von Plasmiden | 120 |
| 8.6.1 | Anfügen von Adenosin-Überhängen | 120 |
| 8.6.2 | Ligation | 120 |
| 8.6.3 | Transformationsprotokoll | 120 |
| 8.6.4 | Vermehrung der monoklonalen, plasmidtragenden Bakterien in kleinem Maßstab (Mini-Prep-Verfahren) | 121 |
| 8.6.5 | Prüfung auf das Vorhandensein des Inserts im Plasmid durch Restriktionsverdau | 121 |
| 8.6.6 | Vermehrung von Plasmiden im mittleren Maßstab (Midi-Prep-Verfahren) | 121 |
| 8.6.7 | Herstellung von LB-Agar und LB-Medium | 122 |
| 8.7 | Quantitative PCR | 123 |
| 8.7.1 | cDNA-Synthese | 123 |
| 8.7.2 | Protokoll der qPCR | 123 |
| 8.7.3 | Recherche und Herstellung synthetischer Oligonucleotide für die qPCR | 124 |
| 8.8 | Weitere verwendete Utensilien und Geräte | 124 |

| | | |
|-------------|--|------------|
| 8.9 | Sequenzen verwendeter Primer | 125 |
| 8.10 | dC_T-Werte, Herz- und Embryonenmassen von V0 | 126 |
| 8.11 | dC_T-Werte, Herz- und Embryonenmassen von V1 | 127 |
| 8.12 | dC_T-Werte, Herz- und Embryonenmassen von V2 | 128 |
| 8.13 | dC_T-Werte, Herz- und Embryonenmassen von V3 | 129 |
| 8.14 | dC_T-Werte, Herz- und Embryonenmassen von V4 | 130 |
| 8.15 | Übersicht über die Auswertung der FC-Werte im direkten Vergleich von Test- und Basisgruppe | 131 |
| 8.16 | Übersicht über die Auswertung der FC-Werte zur Altersabhängigkeit | 132 |
| 8.17 | Übersicht über die Auswertung der FC-Werte bei Vergleich der Gruppe V2 mit V3N/H bzw. V4N/H | 133 |
| 9 | DANKSAGUNG | 134 |
| 10 | LEBENS LAUF | 135 |
| 11 | EIDESSTÄTTLICHE ERKLÄRUNG | 136 |