

## 5 Diskussion

### 5.1 Versuchsbedingungen

#### 5.1.1 Auswahl der untersuchten Parameter

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Gene wurden aufgrund ihrer Bedeutung für die Anpassungsmechanismen unter Sauerstoffmangel ausgewählt. Diese Adaptationsmechanismen an Sauerstoffmangel lassen sich in verbesserte Sauerstoffbereitstellung, anaerobe Energiegewinnung und Energieeinsparung unterteilen (Lopaschuk *et al.*, 1991; Plunkett *et al.*, 1996).

Die mittelfristige Anpassung an Sauerstoffmangel durch höhere Genexpressionsraten ist mittels der mRNA-Mengen bestimmter Gene quantifizierbar. Der Transkriptionsfaktor HIF ist ein Hauptregulator der sauerstoffabhängigen Transkriptionssteigerung vieler Gene (Semenza, 2001; Webster, 2003; Schofield und Ratcliffe, 2004). Eine direkte Untersuchung des Genexpressionsprofils von HIF1a ist allerdings nicht Erfolg versprechend, weil dieser Transkriptionsfaktor posttranslational, also auf Proteinebene reguliert wird. Daher ist mit weitestgehend gleich bleibenden mRNA-Gehalten unter Sauerstoffmangel zu rechnen (Schofield und Ratcliffe, 2004). Aus diesem Grund wurden die Expressionen ausgewählter durch HIF1a regulierter Gene untersucht.

Der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) ist ein Wachstumsfaktor, der für die Gefäßbildung verantwortlich ist und die Proliferation von Endothelzellen anregt. VEGF wird bei Sauerstoffmangel unter Wirkung von HIF1a verstärkt exprimiert, um die Sauerstoffbereitstellung in den Geweben durch Gefäßbildung zu verbessern (Hashimoto *et al.*, 1994; Levy *et al.*, 1995; Linden *et al.*, 2003; Van Lieshout *et al.*, 2003).

Die Phosphofruktokinase und die Enolase (auch Phosphopyruvat-Hydratase) sind Enzyme der Glycolyse und somit an der anaeroben Energiegewinnung beteiligt. Die Phosphofruktokinase ist ein Schlüsselenzym zur Regulation der Glycolyse. Sie reguliert den Schritt von Fructose-6-Phosphat nach Fructose-1,6-bisphosphat. Ihre Aktivität wird durch allosterische Einflüsse und kovalente Bindungen beeinflusst. Es ist davon auszugehen, dass chronischer Sauerstoffmangel auch bei stark allosterisch regulierten Enzymen zu einer verstärkten Transkription und Translation und damit zu einem Anstieg der mRNA führt (Hance *et al.*, 1980; Pilkis und Granner, 1992). Nach beiden Autoren ist die Verstärkung der

anaeroben Energiegewinnung durch Erhöhung der Menge glykolytischer Schlüsselenzyme möglich, so dass ihre Auswahl berechtigt ist.

Bei allen Parametern wurden die mRNA-Konzentrationen von Untereinheiten, die spezifisch beim Huhn vorkommen, untersucht. Die Richtigkeit wurde durch den Vergleich der mRNA-Sequenz mit Hilfe EDV-gestützter Datenbanken überprüft (NCBI-Datenbank). Es handelt sich hierbei um die komplette mRNA bei VEGF, die Enolase 2  $\gamma$  mRNA, die Phosphofruktokinase-M (PFKM) mRNA und die AMPK- $\beta$ -2 mRNA.

### 5.1.2 RNA-Stabilität und Qualitätskontrollen

Ein weiterer wichtiger Diskussionspunkt ist die RNA-Stabilität. Der RNA droht eine ständige Degradierung durch in der Umgebung vorhandene RNasen. Daher ist der Probenverarbeitung besondere Aufmerksamkeit zu widmen.

Als bester Weg erwies sich die direkte Überführung der entnommenen Proben in ein RNA-Stabilisationsmedium mit anschließender Lagerung bei  $-80^{\circ}\text{C}$ . Zu Beginn der Probenaufarbeitung wird das RNA-Stabilisationsmedium durch Lysispuffer ersetzt. Neben der weiteren enzymatischen Zerkleinerung der Probe hemmt dieser Lysispuffer RNasen. Isolierte RNA wird wiederum in RNase-freiem Wasser bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Durch die zügige reverse Transkription der RNA in cDNA werden die Risiken des RNA-Abbaus endgültig umgangen.

Vor der reversen Transkription wurden die Qualität und Quantität der isolierten RNA photometrisch bestimmt. Zur Qualitätskontrolle kamen vier spezifische Wellenlängen zum Einsatz (230 nm, 260 nm, 280 nm, 320 nm). Die photometrisch untersuchte Probe wurde nur weiterbearbeitet, wenn die maximale Extinktion bei 260 nm lag und die Extinktionen bei 230, 280 und 320 nm sehr viel geringer ausfielen. Die Quantitätskontrolle erfolgte über die RNA-Konzentration in der Probe, die nicht unter 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  sinken durfte.

Die Expressionsraten der Referenzgene stellten eine weitere Möglichkeit der Kontrolle dar. Proben mit degradierter RNA weisen geringe Mengen an  $\beta$ -Aktin-mRNA auf und wurden vom Versuch ausgeschlossen.

Als Referenzgen wurde in der vorliegenden Arbeit  $\beta$ -Aktin verwendet.  $\beta$ -Aktin wurde ausgewählt, da keine Regulation durch Sauerstoffmangel bekannt ist. Die Kontrolle der  $\beta$ -Aktin-Expressionen in der Versuchs- und Kontrollgruppe bestätigten diese Aussage. Auch Bustin (2002) setzt  $\beta$ -Aktin als Standard ein.  $\beta$ -Aktin wird zur Gruppe der House-Keeping-

Gene gezählt, da seine Expression in jeder Zelle nachweisbar ist und es sich durch Versuchsbedingungen nicht in seiner Transkriptionsrate verändert. House-Keeping-Gene werden aus diesem Grund als Standard bei der Quantifizierung einer PCR eingesetzt.

Durch dieses sorgfältige Vorgehen kann von hoher RNA-Stabilität in den Versuchen ausgegangen werden.

### **5.1.3 Statistische Auswertung**

Die Darstellung der dCT-Werte erlaubt während der Auswertung eine direkte Identifizierung der Ergebnisse der real-time PCR. Mittels der FC-Werte wird die Aussagekraft der Ergebnisse erhöht. Es muss allerdings beachtet werden, dass es sich beim FC-Wert um eine sehr komprimierte Ergebnisdarstellung handelt und dieser Wert nur in direktem Vergleich zweier Gruppen Aussagen zulässt.

Um der Vielschichtigkeit der Auswertung gerecht zu werden, wurden einerseits die dCT-Werte als Einzelpunkte dargestellt und andererseits deren Mittelwerte sowie Standardabweichungen tabellarisch aufgeführt. Der FC-Wert wurde mit aufgenommen, um die Bewertung des Ergebnisses zu erleichtern.

Die Signifikanzprüfung zwischen den dCT-Werten und den FC-Werten erfolgte mittels zweier Methoden. Zum einen musste der FC-Wert eine Verdopplung oder Halbierung der Expression widerspiegeln. Zum anderen mussten die dCT-Werte der mittels FC-Wert verglichenen Gruppen signifikante Unterschiede anhand eines p-Wertes von  $<0,05$  aufweisen. Erst dann wurde der FC-Wert als eindeutige Aussage über eine Änderung der Expression gewertet.

## 5.2 Genexpressionsprofile in Herzgeweben unter Sauerstoffmangel

### 5.2.1 Altersabhängiger Anstieg der Genexpression

Im Vergleich der dct-Werte der Kontrollgruppen V0, V1 und V2 zeigt sich eine Altersabhängigkeit der mRNA-Gehalte von VEGF, PFK und AMPK. Mit zunehmender Bebrütungsdauer der Embryonen steigt die Expression dieser Gene auf Grund des Sauerstoffmangels im Ei an. Als Ursache kann die zunehmende Diskrepanz zwischen dem proportional zum Wachstum sowie zum Energieumsatz ansteigenden Sauerstoffverbrauch und der nur geringfügig steigenden Permeabilität der Eischale für Sauerstoff angesehen werden (Tazawa *et al.*, 1971b; Freeman, B. M., Vince, M. A., 1974; Romano *et al.*, 2001).

Es entsteht im Embryo ein Energiemangel, da die oxidative Phosphorylierung nur noch eingeschränkt zur Energiegewinnung herangezogen werden kann. Die Folge ist neben der gesteigerten Expression der durch Hypoxie induzierbaren Gene VEGF und PFK, auch die Aufregulation der Expression von AMPK. Diese wird äußerst sensibel durch einen AMP/ATP Quotienten reguliert. Damit ließe sich die altersabhängige Steigerung der AMPK Expression erklären.

Die dct-Werte von Enolase zeigen im selben Zeitraum einen sehr geringfügigen, nicht eindeutigen Anstieg der mRNA-Konzentration, so dass nur von einer tendenziellen Altersabhängigkeit gesprochen werden kann. Im Gegensatz dazu erzielten Lamande *et al.* (1995) und Roland *et al.* (2000) einen signifikanten Anstieg der mRNA-Konzentration von Enolase und PFK. Unterschiede zwischen beiden Enzymen bestehen besonders in ihrer Bedeutung für die Glykolyse. Die PFK katalysiert einen irreversiblen Schritt dieser Reaktionskette und ist Hauptangriffspunkt verschiedener Regulationsmechanismen. Sie ist limitierend für den Substratfluss. Die Enolase ist ebenfalls essentiell, jedoch regulatorisch weniger bedeutend für die Glykolyse. Es kann angenommen werden, dass dem höheren Substratbedarf unter Sauerstoffmangel auch durch Steigerung der Enolaseaktivität nachgekommen wird.

Dieser altersabhängige Anstieg der mRNA von VEGF, PFK und AMPK weist auf einen Sauerstoffmangel im Embryo mit zunehmender Bebrütung hin. Das wird auch bestätigt durch die Blutgaswerte, die ab D13 einen sinkenden Sauerstoffpartialdruck ausweisen. Liegt der Sauerstoffpartialdruck an D10 noch bei 83,5 mmHg (ca. 11,11 kPa), so sinkt der bis auf 57,2 mmHg (ca. 7,61 kPa) an D18 (Tazawa *et al.*, 1971b).

### 5.2.2 Einfluss von akutem oder chronischem Sauerstoffmangel auf die Genexpression

Der physiologische Sauerstoffmangel wurde durch eine Verringerung des Sauerstoffangebotes in der Inkubationsluft der Testgruppen (V1, V2, V3 und V4) verstärkt. Im Ergebnis treten geringere Auswirkungen auf, als die Angaben in verschiedenen Veröffentlichungen erwarten ließen.

Der Anteil glykolytischer Enzyme soll unter Hypoxie um das 3-5fache ansteigen (Webster, 2003). In einer kardialen Myozytenzelllinie stieg der mRNA-Gehalt von VEGF nach 24 Stunden bei 1% Sauerstoff um das 25fache (Levy *et al.*, 1995) und bei der Inkubation eines Hühnereies an D10 für 24h mit 15% Sauerstoff wird vom 2,5fachen Anstieg der VEGF-mRNA berichtet (Ivnitski-Steele *et al.*, 2004). Die AMPK $\alpha$ 1- und AMPK $\alpha$ 2-Konzentrationen sollen auf das 3,5 bzw. 4,8fache unter Hypoxie anwachsen (Tian *et al.*, 2001).

Chronischer Sauerstoffmangel von D6-12 hatte weder eine Veränderung des mRNA Gehaltes der untersuchten Gene (VEGF, Enolase, PFK und AMPK) an D12 zur Folge, noch zeigten sich sechs Tage später Veränderungen im Vergleich zur Versuchsgruppe, unabhängig davon, ob die Proben nach akuter Anoxie oder unter normoxischen Bedingungen entnommen wurden. Nach den Angaben aus dem Schrifttum sollte allein die Absenkung des Sauerstoffangebotes für die Aufregulation der Genexpression der untersuchten Parameter genügen, zumal sich ein Hühnerembryo wie oben beschrieben ohnehin schon in einer physiologischen Sauerstoffmangelsituation befindet.

Die untersuchten Parameter VEGF, PFKM und Enolase  $\gamma$ 2 haben den HIF1 als wichtigen Transkriptionsfaktor gemein. Dieser wird auf posttranslationaler Ebene unter Sauerstoffmangel stabilisiert und verstärkt dann die Transkription seiner Zielgene (Schofield und Ratcliffe, 2004).

Als mögliche Ursache der fehlenden Aufregulation kann ein nicht ausreichender Sauerstoffmangel auf Zellebene angeführt werden. In diesem Fall käme es nur in geringem Umfang zur Blockade des posttranslationalen Abbaus von HIF und anschließender Expressionssteigerung seiner Zielgene wie VEGF, PFK und Enolase. Des Weiteren führt fehlender zellulärer Energiemangel nicht zur Induktion der AMPK-Synthese, die ja vom AMP/ATP-Quotienten sensibel reguliert wird. In beiden Fällen würde eine Expressionsteigerung der untersuchten Gene ausbleiben. In Vorversuchen zeigte sich jedoch schon bei einer Sauerstoffkonzentration von 15% ein teilweise erheblicher Anstieg der Sterblichkeit von Hühnerembryonen. Diese Befunde stimmen auch mit den

Untersuchungen von Romanoff 1972) überein. Es müsste also auch im Gewebe ein Sauerstoffmangel vorherrschen.

Auch andere Arbeitsgruppen Catron *et al.* (2001) und Ivnitski-Steele *et al.* (2004) setzten eine Sauerstoffkonzentration von 15% ein, die nach 24 Stunden zu einer kardialen Hypoxie mit signifikanter Induktion von VEGF und HIF1a führten. Diese Hypoxie machten sie histologisch mit Hilfe von Markern sichtbar.

Decker (2002) und Dzialowski *et al.* (2002) wiesen nach, dass hypoxische Inkubation einen Langzeiteffekt auf den Stoffwechsel hat, der sich in einer höheren Überlebensrate und einem vermindertem Sauerstoffverbrauch manifestiert. Solche Langzeiteffekte können durch epigenetische Adaptation hervorgerufen werden. Als epigenetische Kontrolle der Genexpression wird die mitotisch und/oder meiotisch vererbare Änderung der genetischen Funktion, die nicht mit Änderungen in der DNA – Sequenz erklärt werden kann, bezeichnet (Riggs, A.D. *et al.*, 1996). Es werden Merkmale ausgebildet, die nicht genetisch fixiert sind, den Organismus aber an die zu erwartende Umwelt anpassen sollen. Signale aus der Umwelt können in der pränatalen Periode - meist in einer relativ kurzen Zeitphase der Ontogenese (sensible Phasen) - entscheidend den Aktivitätsbereich physiologischer Regelsysteme beeinflussen. Eine sensible Phase für den Energiestoffwechsel von Hühnerembryonen wurde im Inkubationszeitraum von D6 bis D12 beschrieben.

Veränderte Noradrenalinwerte führen durch die Verschiebung der Sauerstoffbindungskurve nach rechts zu einer verbesserten Sauerstoffausnutzung (Hühnke und Tönhardt, 2004). Demnach sollte die Inkubation über 6 Tage bei 15% Sauerstoff ausreichen, um ein Sauerstoff- bzw. Energiemangel auf Zellebene auslösen. Es wäre aber vorstellbar, dass nach 6 Tagen Sauerstoffmangel das Defizit an Enzymen zur Anpassung an Sauerstoffmangel durch verstärkte Expression ausgeglichen ist und kein aktueller Bedarf an gesteigerter Genexpression und somit erhöhten mRNA-Werten besteht.

Dagegen spricht, dass bei einem erhöhten Enzymbedarf auch ständig Enzyme synthetisiert werden müssen, da die Synthese und Proteolyse auf einem höheren Niveau ablaufen. Unter dieser Bedingung wären Unterschiede zur normoxisch inkubierten Gruppe nachweisbar. Li *et al.* (1996) zeigten, dass nach einem initialen 2,5fachen Anstieg des mRNA-Gehaltes von VEGF auch 6 Wochen nach Beendigung der Mangelsituation erhöhter mRNA-Gehalt vorlag. Damit ist ein anderes Zeitfenster für die Reaktion auf Sauerstoffmangel auszuschließen.

Theoretisch könnte eine Blockade der Regulation durch HIF den ausbleibenden Anstieg von VEGF, Enolase und PFK erklären. Allerdings wird durch die posttranslationale Regulation von HIF seine Funktion unter Sauerstoffmangel eher sichergestellt ist, als sein Abbau unter

Normoxie (Schofield und Ratcliffe, 2004). Weiterhin wurde in Versuchen von Iyer *et al.* (1998a) festgestellt, dass während der Embryogenese ohne HIF Missbildungen auftreten und solche Embryonen nicht überlebensfähig sind. Die in den eigenen Versuchen eingesetzten Embryonen waren vor der Probennahme vital und wiesen keine erkennbaren Missbildungen auf.

Eine weitere mögliche Erklärung der ausbleibenden Expressionsteigerungen bieten die Arbeiten von Hochachka (1986) und Boutilier (2001) an. Unter starker Hypoxie verlagert sich die Verteilung des Energieverbrauchs von der Protein- und RNA/DNA-Synthese hin zur Erhaltung der Funktion der ATP-abhängigen Ionenpumpen. Dieses Phänomen wurde unter Anoxie an Zellen von Ratten und Schildkröten bestätigt (Lefebvre *et al.*, 1993). Weiterhin hängt die Anpassungsmöglichkeit der Zellen stark mit ihrer elektrischen Erregbarkeit und dem damit verbundenen Energieverbrauch zusammen. So kommt es bei verringerter Sauerstoffverfügbarkeit zur Abnahme der Kontraktionen am Myokard (Arai *et al.*, 1991; Lee und Downey, 1993). Die Herzfrequenz der Hühnerembryonen wurde bei den durchgeführten Versuchen nicht erfasst. Eine Verlagerung des Energieverbrauchs von der Protein- und RNA/DNA-Synthese hin zur den ATP-abhängigen Ionenpumpen würde im wachsenden Organismus zu einer verzögerten Entwicklung führen, die sich in geringeren Embryonenmassen manifestiert. Die Massen der Embryonen gleichen sich jedoch in den Test- und Basisgruppen. Somit kann es nur in einem begrenzten Ausmaß zur Konzentration des Energieverbrauchs auf die ATP-abhängigen Ionenpumpen kommen.

Möglich ist auch, dass trotz verringertem Sauerstoffangebot in der Inkubationsluft auf Zellebene kein Sauerstoff- und somit auch kein Energiemangel entstehen. Die Aktivität sowie die Expression der AMPK steigen nur unter Energiemangel. Da die erwartete Expressionssteigerung unter den gewählten Versuchsbedingungen ausbleibt, scheint eine Aktivitätssteigerung des Enzyms zur Bewältigung der zellinternen Energieprobleme ausreichend. Möglich ist auch ein fehlender Anstieg AMP/ATP- Quotienten. Nach Moyes und LeMoine (2005) ziehen starke Veränderungen der Anforderungen an die Enzymausstattung zur Steigerung der Genexpression. Diese Expressionsteigerung stellt einen wichtigen Anpassungsmechanismus dar. Die Bewältigung des Energiemangels durch alleinige Aktivitätssteigerung der AMPK ist unwahrscheinlich. Auch Sauerstoffmangel sollte sich auf Zellebene in einem Anstieg der Expressionsraten von VEGF, Enolase und PFK widerspiegeln. Der Hühnerembryo scheint unter den gegebenen Versuchsbedingungen der Genregulation übergeordnete Anpassungsmechanismen zu nutzen.

Wenn verschiedene sauerstoffabhängige Gene trotz der Reduktion des Sauerstoffangebotes gleich bleibend exprimiert werden, kann auf Gewebeebene keine ausreichende Hypoxie erreicht worden sein. Als Ursache für die ausbleibende Gewebehypoxie ist das Sauerstoffangebot jedoch nicht verantwortlich. Ivnitski-Steele *et al.* (2004) erzeugten durch eine 24stündige Inkubation mit 15% Sauerstoff am Inkubationstag 10 nachweislich eine myokardiale Hypoxie. In den eigenen Versuchen erzeugte auch länger anhaltender Sauerstoffmangel keine Expressionssteigerung der untersuchten Gene.

Mortola und Labbe (2005) weisen in diesem Zusammenhang auf die Abhängigkeit des Sauerstoffverbrauchs von dem Grad der endogenen Regulation der Körpertemperatur hin. Er beschreibt den Hühnerembryo als ektothermen Organismus während der ersten 2/3 seiner Entwicklung. In dieser Zeit hat milde Hypoxie schon bei normalen Temperaturen starke Auswirkungen auf den Sauerstoffverbrauch eines Hühnerembryo. Es kommt bei milder Hypoxie zu einer hypometabolischen Reaktion mit vermindertem Sauerstoffverbrauch, die jedoch nicht linear dem Sauerstoffangebot folgt, sondern einen Regulationsmechanismus darstellt. Während dieser hypometabolischen Reaktion entsteht keine Sauerstoffschuld, also kein Sauerstoffmangel auf Gewebeebene. Die Umgebungstemperatur spielt bei dieser Anpassungsform eine ausschlaggebende Rolle. Bei niedriger Temperatur und wenig Sauerstoff kommt es an D11 zur Absenkung des Sauerstoffverbrauchs, der Körpertemperatur und des Stoffwechsels. Die Absenkung des Stoffwechsels könnte demnach die Ursache für die ausbleibende Aufregulation der untersuchten Gene darstellen (Lefebvre *et al.*, 1993).

Die Theorie des hypoxie-induzierten Hypometabolismus erklärt jedoch nicht die ähnlichen Expressionsraten in den Hypoxie- und Normoxiegruppen. Die Expressionraten der untersuchten Gene sollten sich während der Stoffwechselminimierung auf einem niedrigen Niveau stabilisieren. Wird der Sauerstoffverbrauch durch Minimierung des Energieverbrauchs stark gesenkt, kann trotz eines extrazellulär verminderten Sauerstoffangebotes ein intrazellulärer Sauerstoffmangel vermieden werden. Entsteht intrazellulär kein Sauerstoffmangel, so bleiben Verzögerungen in der Entwicklung wie in den vorliegenden Versuchen aus.



### **5.2.3 Einfluss von Sauerstoffmangel und Hyperthermie auf die Genexpression**

Erwärmung eines hypoxischen Neugeborenen während der ektothermen Phase seiner Entwicklung führt zum Anstieg des Sauerstoffverbrauchs und provoziert energieverbrauchende Reaktionen, die nachteilig für das Überleben sind (Mortola, 2004). Eine Kombination von Hyperthermie und Hypoxie führte zum eindeutigen Anstieg der mRNA Konzentrationen der untersuchten Parameter in den Versuchen. Der Anstieg der AMPK-mRNA zeigt einen zellulären Energiemangel an.

Bei künstlicher Erwärmung des hypoxischen Hühnerembryos ist die Adaptationsleistung des hypoxie-bedingten Hypometabolismus ausgereizt und eine genregulative Antwort setzt ein. Nach Schofield und Ratcliffe (2004) ist diese genregulative Antwort allein schon bei Hypoxie zu erwarten. Die Ergebnisse zeigen, dass Hypoxie als alleiniger Stressor nicht ausreicht, um zur Steigerung der Genexpression zu führen.

#### **5.2.4 Zusammenfassung der Diskussion zu den Genexpressionsprofilen unter Sauerstoffmangel**

Der altersabhängige Anstieg der Genexpressionsraten spiegelt die zunehmende Diskrepanz zwischen gleich bleibender Sauerstoffversorgung und zunehmendem Energiebedarf wieder. Die ausbleibende genregulative Antwort auf chronische bzw. akute Hypoxie deutet darauf hin, dass kein intrazellulärer Sauerstoffmangel entsteht. Dies ist bei vermindertem Sauerstoffangebot nur durch starke Absenkung des Sauerstoffverbrauchs möglich. Die Kombination von Sauerstoffmangel und Hyperthermie zieht einen Anstieg der Genexpression nach sich.

Nach der Theorie des hypoxie-induzierten Hypometabolismus kommt es bei milder Hypoxie und normalen Temperaturen zur hypometabolischen Reaktion eines Lebewesens. Die ist verbunden mit einem verminderten Sauerstoffverbrauch. Die Abregulation des Stoffwechsels ist eine aktive Antwort. Die in der Literatur beschriebenen Expressionssteigerungen unter Sauerstoffmangel stammen häufig von Untersuchungen an Zellkulturen (Hashimoto *et al.*, 1994; Levy *et al.*, 1995; Linden *et al.*, 2003; Van Lieshout *et al.*, 2003). Mit Zellkulturversuchen können übergeordnete Adaptationsmechanismen nur begrenzt erfasst werden. Es besteht die Möglichkeit, dass dieser Regulationsmechanismus mehrere Organsysteme involviert.

Die Ergebnisse lassen vermuten, dass der Hühnerembryo seine Toleranz gegenüber Sauerstoffmangel vorrangig dem Mechanismus des hypoxie-induzierten Hypometabolismus verdankt und erst in zweiter Linie einer Expressionssteigerung von Genen.

### 5.3 Einfluss des Sauerstoffmangels auf die Embryonen- und Herzmassen

Chronischer Sauerstoffmangel erzeugt durch unzureichende oxidative Phosphorylierung Energiemangel. Besteht dieser Energiemangel über längere Perioden kommt es zur Verzögerung der Entwicklung, zur Reduktion des Organwachstums und einem geringeren Geburtsgewicht (Freeman, B. M., Vince, M. A, 1974). Während einer folgenden hypermetabolischen Phase können die entstandenen Unterschiede völlig kompensiert werden (Mortola, 2004).

Einen Sonderfall stellt das Herz dar, das durch Hypertrophie relativ zum Gesamtorganismus stärker an Masse zunimmt, als andere Organe. Villamor *et al.* (2004) zeigten, dass chronische Hypoxie eine biventrikuläre Vergrößerung erzeugt. Nach neuesten Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe kann unter Sauerstoffmangel auch eine Hyperplasie an der Massenzunahme beteiligt sein (Lange, 2005).

In den durchgeführten Versuchen hat chronische Hypoxie (15% O<sub>2</sub>) keinen Einfluss auf die Embryonen- und Herzmassen. Tendenzielle Unterschiede in den Embryonen- und Herzmassen gibt es während akuter Anoxie. Die Kontrollgruppen, die stets bei Normoxie bebrütet wurden, zeigen tendenzielle Massenzunahmen nach 30minütiger Anoxie. Nach 45minütiger Anoxie kommt es zu einer tendenziellen Massenabnahme bei den Kontrollgruppen. Die Embryonen- und Herzmassen in den Testgruppen, sie waren zwischen D6-12 einer Hypoxie ausgesetzt, bleiben unter Anoxie konstant. Die beschriebenen tendenziellen Schwankungen der Gewichte spiegeln sich nicht in den relativen Herzgewichten wieder, da sie sowohl am Embryo, als auch am isolierten Herzen auftreten. Für hypoxie-bedingte Herzmassenzunahmen durch Hypertrophie oder Hyperplasie gibt es in den Ergebnissen keine Anzeichen. Des Weiteren hat chronische Hypoxie gepaart mit Hyperthermie an D10 keinen Einfluss auf die Embryonen- und Herzmasse.

Die Ergebnisse zeigen, dass es unter milder chronische Hypoxie zu keiner Verzögerung in der Massenentwicklung kommt. Bei der Auswertung der Genexpressionsprofile deuten die Daten auf die Involvierung des hypoxie-induzierten Hypometabolismus hin. Die bei dem hypoxie-induzierten Hypometabolismus eintretende Energieeinsparung auf zellulärer Ebene zieht als Langzeiteffekt die Reduktion der Gewichtszunahme nach sich (Mortola, 2004). Es ist vorstellbar, dass durch Abdichtung der Membranen (channel arrest) ausreichend Energie eingespart werden kann, um die Entwicklung des Embryo und seines Herzen auch unter mildem chronischen Sauerstoffmangel uneingeschränkt zu ermöglichen. Diese Überlegung

wird gestützt durch die Tatsache, dass das Ausmaß des hypometabolischen Effekts von der Höhe des Sauerstoffmangels, dem Alter des Embryos und der Umgebungstemperatur abhängt (Mortola, 2004).

Die tendenziellen Herzmassenzunahmen in den Basisgruppen unter akuter Anoxie könnten als Auswirkung einer verstärkten Herzaktion gewertet werden. Das Ausbleiben einer dieser Zunahmen in den Testgruppen lässt auf gleich bleibende Herzaktionen in diesen Gruppen unter Anoxie schließen. Diese ausgeglichene Reaktion auf erneuten Sauerstoffmangel deutet auf eine Adaptation hin, die während der hypoxischen Inkubation zwischen D6-12 ihren Ursprung hat. Auf welcher Ebene dieser Effekt sich manifestiert, kann anhand der vorliegenden Ergebnisse nicht geklärt werden. Die Ergebnisse der Genexpressionsraten schließen die Angiogenese, die Glykolyse und die Energiesparmechanismen als Anpassungsebene aus.

Die tendenziellen Veränderungen der Embryonenmasse unter akuter Anoxie lassen sich durch Flüssigkeitsverteilungen erklären. Im intakten Ei kann innerhalb kurzer Zeit keine Masse verloren gehen. Somit sind die beobachteten Änderungen vermutlich durch Flüssigkeitsumverteilungen vom extraembryonalen zum embryonalen Gewebe zu erklären. Diese Umverteilung könnte durch verstärkte Bewegungen des Hühnerembryo im Ei bei extremen Sauerstoffmangel verursacht werden. Diese Bewegungen lassen nach 45minütiger Anoxie nach. Es kommt zur Rückverteilung der Flüssigkeit. Ähnliche Mechanismen wurden am Amnion von Hühnerembryonen beobachtet. Hier kommt es unter Sauerstoffmangel zur reversiblen Hemmung der Kontraktilität (Nechaeva und Turpaev, 2002).

Die ausbleibende Gewichtsveränderung in der Testgruppe deutet auf eine geringere Reaktion hin. Diese ist durch einen schon eingetretenen Hypometabolismus erklärbar. Hierbei kann es zu geringerer motorischer Erregbarkeit kommen.

### **5.3.1 Zusammenfassung der Diskussion zur Massenentwicklung**

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen keine Veränderungen in der Massenentwicklung nach chronisch-hypoxischer Inkubation. Diese Beobachtungen deuten auf Anpassungsmechanismen hin, die während eines verminderten Energieangebotes die normale Massenentwicklung des Embryo ermöglichen. Ein solcher Anpassungsmechanismus stellt der hypoxie-induzierte Hypometabolismus dar, obgleich auch in Verbindung mit dieser Theorie reduzierte Massenzunahmen beschrieben werden.

## 5.4 Zusammenfassung der Diskussion

Die diskutierten Ergebnisse ermöglichen die Betrachtung der Anpassungsmechanismen an Sauerstoffmangel unter einem erweiterten Blickwinkel, da sie keine Anzeichen einer epigenetischen Adaptation auf genregulativer Ebene widerspiegeln. Jedoch ist nicht auszuschließen, dass sie auf übergeordneten Anpassungsebenen (nerval bzw. hormonell) eine Rolle spielt. Die Resultate der Untersuchungen deuten auf die Beteiligung des hypoxie-induzierten Hypometabolismus hin.

Decker (2002) und Dzialowski *et al.* (2002) zeigten, dass chronische Hypoxie während des mittleren Inkubationsdrittels langanhaltende Veränderungen in Hühnerembryonen nach sich ziehen. Dies äußert sich in Form eines verminderten Sauerstoffverbrauchs und damit in einer höheren Überlebensrate und Toleranz gegenüber chronischer und akuter Hypoxie.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen im Gegensatz dazu keine Veränderungen der anaeroben Energiegewinnung (Enolase, PFK) und der Sauerstoffbereitstellung (VEGF) unter Sauerstoffmangel auf genregulativer Ebene. Auch eine Anpassung an Energiemangel durch die AMPK ist auf genregulativer Ebene nicht nachweisbar. Die unter Sauerstoffmangel gleich bleibenden Herz- und Embryonengewichte deuten auf das Ausbleiben einer Verstärkung der Herzaktion hin. Es ist weiterhin keine Verzögerung der Embryonalentwicklung nachweisbar. Folglich kommt es intrazellulär trotz der Verringerung des Sauerstoffangebotes in der Inkubationsluft nicht zur Ausbildung eines Sauerstoff- bzw. Energiemangels. Wird der Energieverbrauch unter extrazellulärem Sauerstoffmangel in der Umgebungsluft auf intrazellulärer Ebene aktiv gesenkt, so ist es möglich, eine ausgewogene Energiebilanz der Zelle aufrechtzuerhalten.

Die aktive Senkung des Energieverbrauchs ist durch adaptive Erniedrigung der Membranpermeabilität möglich (Hochachka, 1986; Doll *et al.*, 1994; Hochachka *et al.*, 1996; Lutz und Nilsson, 1997; Boutilier, 2001). Auf diesen Anpassungsmechanismus greifen vor allem niedere Wirbeltiere, Neugeborene und tauchende Säugetiere zurück (Hochachka, 1986; Boutilier, 2001). Des Weiteren ermöglicht die Absenkung der RNA- bzw. DNA-, sowie der Proteinsynthese eine beachtliche Energieeinsparung (Hochachka, 1986; Hochachka *et al.*, 1996; Boutilier, 2001). Diese Anpassungsmechanismen schlagen sich jedoch in einer verzögerten Embryonalentwicklung verbunden mit geringeren Massenzunahmen nieder, was in den vorliegenden Untersuchungen nicht der Fall ist.

Die beschriebenen Mechanismen zur Energieeinsparung liegen dem hypoxie-induzierten Hypometabolismus zugrunde. Bei der Kombination von Sauerstoffmangel und Hyperthermie gewährleistet der hypoxie-induzierte Hypometabolismus keine genügende Anpassung. Es kommt zur Aufregulation der Expressionen der untersuchten Gene, eine Tatsache, die auf

die Entstehung eines intrazellulären Sauerstoffmangels hinweist. Diese Beobachtung ist ein weiterer Hinweis auf den hypoxie-induzierten Hypometabolismus. Erwärmung eines hypoxischen Neugeborenen während der frühen ektothermen Phase seiner Entwicklung führt zum Anstieg des Sauerstoffverbrauchs und provoziert energieverbrauchende Reaktionen, die nachteilig für das Überleben sind (Mortola, 2004). Bei milder Hypoxie und physiologischen Temperaturen kommt es hingegen zu einer hypometabolischen Reaktion des Hühnerembryo mit vermindertem Sauerstoffverbrauch. Die Abregulation des Stoffwechsels ist dann eine aktive Antwort auf milden Sauerstoffmangel. Mit Hilfe der Theorie des hypoxie-induzierten Hypometabolismus lassen sich die gewonnenen Ergebnisse erklären.

Es besteht die Möglichkeit, dass dieser Regulationsmechanismus mehrere Organsysteme involviert, da die in der Literatur beschriebenen Expressionssteigerungen unter Sauerstoffmangel häufig von Untersuchungen an Zellkulturen stammen (Hashimoto *et al.*, 1994; Levy *et al.*, 1995; Linden *et al.*, 2003; Van Lieshout *et al.*, 2003).

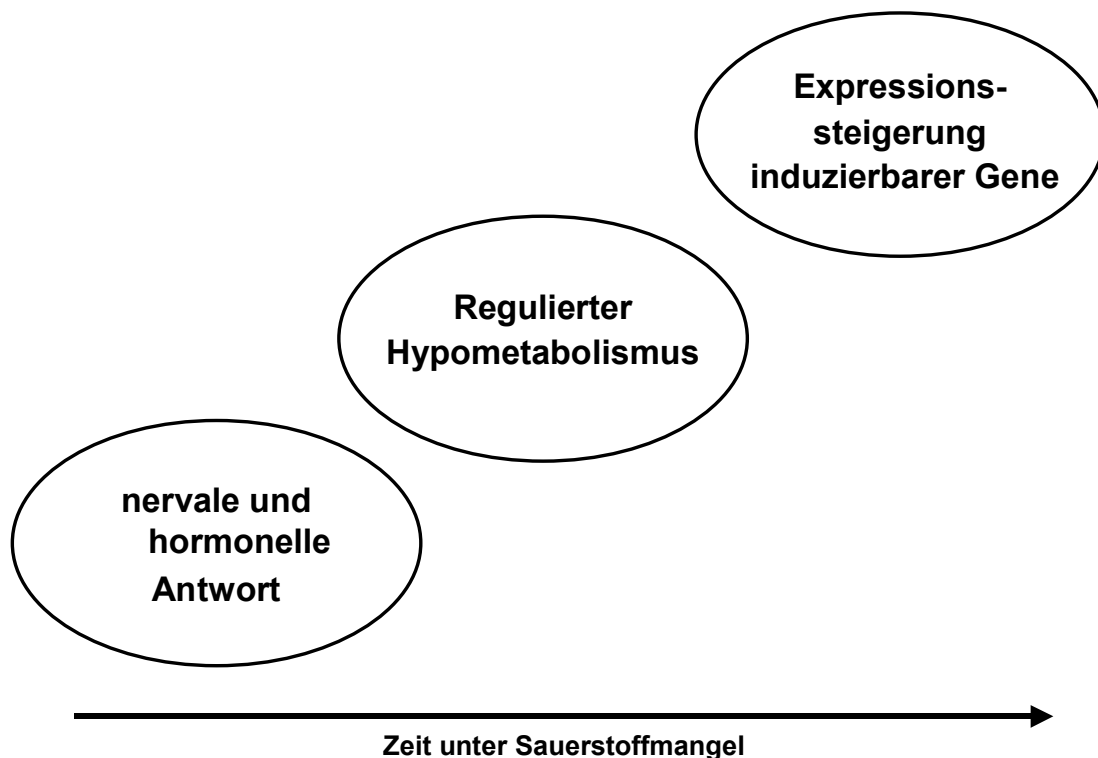


Abbildung 26: zeitliche Abfolge der Anpassungsmechanismen unter Sauerstoffmangel unter Berücksichtigung der Ergebnisse dieser Arbeit

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse zeigen eine neue zeitlichen Abfolge der Anpassungsmechanismen unter Sauerstoffmangel und tragen zum weiteren Verständnis der Adaptation eines Organismus an Sauerstoffmangel bei. Die verstärkte Expression der untersuchten Gene und somit die Anpassungsbereiche der anaeroben Energiegewinnung und der effektiveren Sauerstoffbereitstellung sind dem hypoxie-induzierten Hypometabolismus zeitlich nachgeordnet. Die Einsparung von Energie hat bei mildem Sauerstoffmangel Vorrang vor der Umstrukturierung der Energiegewinnung.