

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

**Expression von Hypoxia Inducible Factor 1 (HIF1)  
und HIF1-regulierten Genen unter Sauerstoffmangel  
und/oder erhöhter Temperatur im Herzen von  
Hühnerembryonen**

INAUGURAL – DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
Isabel Dittmann  
Tierärztin aus Basel (CH)

Berlin 2010  
Journal-Nr.: 3392

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Leo Brunnberg  
Erster Gutachter: Prof. Dr. Heike Tönhardt  
Zweiter Gutachter: PD Dr. Barbara Tzschentke  
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Karl Dietrich Weyrauch

*Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):*

poultry, gallus gallus, chicken, heart, physiology, embryonic development, adaptation, hypoxia, hyperthermia, heat tolerance, heat stress, stress response, polymerase chain reaction

Tag der Promotion: 05.11.2010

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN: 978-3-86664-892-0

**Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2010**

Dissertation, Freie Universität Berlin

**D 188**

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Coverbild vorne © Perrush - Fotolia.com

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2011

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

„Das einzig Wichtige im Leben sind die Spuren von Liebe, die wir hinterlassen, wenn wir  
weggehen.“

Albert Schweitzer

Gewidmet in Liebe und Dankbarkeit meinen Großeltern  
Luise Etter-Maag († Juli 2007) und Hans Etter († April 2006)



## 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 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 Probenstage .....	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 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-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

**Verwendete Abkürzungen:**

A:	Adenin
Abb.:	Abbildung
Acetyl-CoA:	Acetyl-CoenzymA
ARNT:	Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator
ATP:	Adenosintriphosphat
bHLH:	basic Helix-Loop-Helix
Bp:	Basenpaare
C:	Cytosin
Ca <sup>2+</sup> :	Calciumionen
CAM:	Chorioallantoismembran
cDNA:	Complementary DNA
CO <sub>2</sub> :	Kohlendioxid
COX:	Cytochrom-c-Oxidase
C <sub>T</sub> -Wert:	Cycle Threshold Value
D:	Inkubationstag
DEPC:	Diethylpyrocarbonat-Wasser
DNA:	Desoxyribonucleinsäure
dNTPs:	die vier Triphosphat-Nukleotide dATP, dGTP, dCTP und dTTP
E:	Effizienz
ENO:	Enolase
EP:	External Pipping
FC:	Fold Change
FIH1:	Factor Inhibiting HIF1
G:	Guanin
GED:	Gene Expression's CT Difference
GOI:	Gene of Interest
GPx-3:	Glutathionperoxidase 3
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> :	Wasserstoffperoxid
Hb:	Hämoglobin
HIF:	Hypoxia Inducible Factor
HK:	Housekeeper
HRE:	Hypoxia Response Elements
HSE:	Hitzeschockelemente
HSF1:	Hitzeschockfaktor-1
HSP90:	Hitzeschockprotein 90
IP:	Internal Pipping

## Verwendete Abkürzungen

---

mRNA:	messenger RNA
N.:	Nervus
n:	Anzahl
NO:	Stickstoffmonoxid
No.:	Number
NTC:	No Template Control
O <sub>2</sub> :	Sauerstoff
ODDD:	Oxygen Dependent Degradation Domain
OFT:	Outflow Tract (=embryonaler Abflusstrakt des Herzens)
PAS:	steht für die Proteine PER, ARNT und SIM
PBGD:	Porphobilinogendesaminase
pCO <sub>2</sub> :	Kohlendioxidpartialdruck
PCR:	Polymerase-Chain-Reaction, Polymerasekettenreaktion
PDGFB:	Platelet-Derived Growth Factor B
PDH:	Pyruvatdehydrogenase
PDK:	Pyruvatdehydrogenasekinase
PHD:	Prolylhydroxylase
PI3K:	Phosphoinositid-3-Kinasen
PO <sub>2</sub> :	Sauerstoffpartialdruck
qPCR:	quantitative PCR oder Real-Time-PCR
R:	Regressionskoeffizient
RACK1:	Receptors for Activated C Kinase
RER:	Respiratory Exchange Ratio
RFU:	Relative Fluorescence Units
RIN:	RNA Integrity Number
RNA:	Ribonukleinsäure
ROS:	Reaktive Sauerstoffspezies
RT:	Reverse Transkription
SPF:	Specific Pathogen Free
T:	Thymin
TAE:	Tris-Acetat-EDTA
VEGFA:	Vascular Endothelial Growth Factor A
VEGFR:	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
VHL:	Von Hippel-Lindau Tumorsuppressor Protein
$\Delta C_T$ -Methode:	“Delta Cycle Threshold”- Methode
$\Delta\Delta C_T$ -Methode:	“Delta Delta Cycle Threshold” –Methode

## 1. Einleitung

Das Entstehen großer, komplexer Metazoa (Vielzeller) wurde erst mit der Entwicklung anatomischer Strukturen und physiologischer Mechanismen möglich, die eine optimale Versorgung jeder Zelle mit Sauerstoff (O<sub>2</sub>) gewährleisten. Bei Säugern und Vögeln entwickelten sich komplexe Atem- und Kreislaufsysteme (Lunge, Herz, Blut und Gefäße). Die embryonale Entwicklung dieser Systeme und deren Einsatz nach der Geburt sind **Hypoxia Inducible Factor 1 (HIF1)** kontrolliert. HIF1 fördert alle Signalwege, die entweder O<sub>2</sub> zu den Zellen befördern oder ihnen ermöglichen, bei O<sub>2</sub>-Mangel zu überleben (Semenza, 2007).

Das hier angewandte **Modell Vogelei** hat sich für die Erforschung pränataler Einflüsse als gut geeignet erwiesen. Der sich innerhalb 21 Tage im Ei entwickelnde Embryo bildet eine in sich selbständige funktionelle wie auch strukturelle Einheit. Da isolierte Organe oder Zellkulturen im Vergleich nicht von übergeordneten Instanzen reguliert werden können, sind Rückschlüsse auf den Gesamtorganismus schwierig. Ein weiterer entscheidender Vorteil ist, dass im Gegensatz zum Säugetier die embryonale Entwicklung beim Vogel praktisch unabhängig vom Muttertier verläuft. Alle wichtigen Brutbedingungen wie Temperatur, Luftfeuchte und O<sub>2</sub>-gehalt sind gut kontrollier- und beeinflussbar.

Es ergibt sich die Fragestellung inwiefern externe Stressoren wie eine verminderte O<sub>2</sub>-Zufuhr oder Temperaturerhöhungen während kritischer Entwicklungsphasen des Embryos zu molekularen Adaptationsmechanismen führen. Dazu wurden Hühnerembryonen verschiedener Altersstufen während einer **kritischen Phase**, die beim Huhn zwischen Tag 6 und Tag 12 der Embryonalentwicklung stattfindet (Dzialowski *et al.*, 2002), einem chronischen **Sauerstoffmangel** und/oder einer **Temperaturerhöhung** ausgesetzt. Das **Herz** wurde ausgesucht, da es intensiver als andere Organe in Bezug auf O<sub>2</sub>-Mangel und Hyperthermie betroffen ist und erforscht wurde (Maloyan *et al.*, 2005).

O<sub>2</sub>-Mangel ist die Ursache für eine Vielzahl von Erkrankungen. Die O<sub>2</sub>-Versorgung während der Inkubation von Hühnerembryonen ist – bedingt durch den begrenzten Zugang - ein kritischer Faktor. Demnach ist von einer metabolischen und morphologischen Anpassung des Organismus bei zusätzlichem O<sub>2</sub>-Mangel und/oder Temperaturerhöhung auszugehen. Es müssten eine Umstellung des Stoffwechsels von aerob auf anaerob sowie morphologische Adaptationen, wie z. B. eine vermehrte Kapillarisierung, erfolgen.

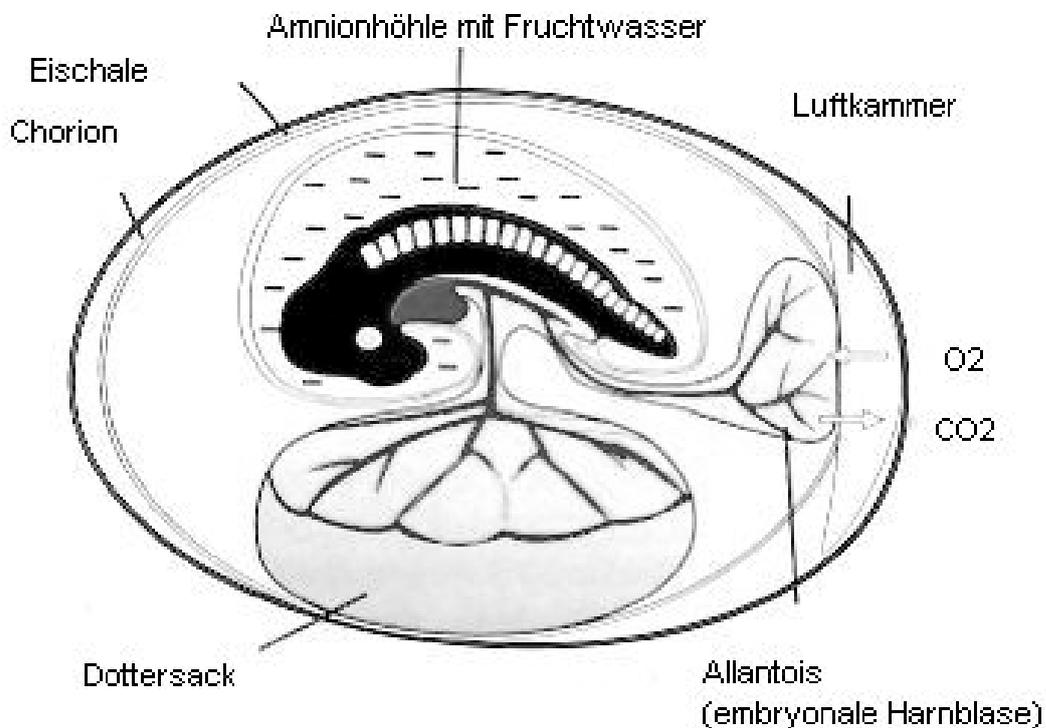
Ziel dieser Untersuchungen ist der Nachweis der **morphologischen Veränderungen** und einer Veränderung der **Expression ausgewählter Gene als Indikator für eine embryonale Adaptation** an chronischen O<sub>2</sub>-Mangel und Temperaturerhöhungen im embryonalen Herzen während unterschiedlicher Entwicklungsstadien. Außerdem sollen die Gemeinsamkeiten oder Unterschiede Aufschlüsse über die Signalwege von O<sub>2</sub>-Mangel und Hyperthermie geben.

## 2. Literaturübersicht

### 2.1. Zur embryonalen Entwicklung des Huhnes

Das befruchtete Vogelei ist ein hoch organisiertes System und enthält alle essentiellen Eigenschaften für eine normale Entwicklung. Der Vogelembryo entwickelt sich im Gegensatz zum Säuger unabhängig von der Mutter. Während der Entwicklung werden die inerten Substanzen, die sich im Ei befinden mit Hilfe äußerer Wärme und atmosphärischen  $O_2$  in lebendes Gewebe umgewandelt. Kohlendioxid ( $CO_2$ ) wird als Abfallprodukt aus dem Ei hinaus transportiert. Die ungenutzten Anteile (extraembryonale Membranen) und Überbleibsel (Mekonium) werden zurückgelassen. Das sich entwickelnde Ei in seiner Gesamtheit ist das komplexeste physiochemikalische System. Die chemischen Eigenschaften des Embryos machen das Vogelei zum optimalen Vergleichsobjekt für höhere Organismen während ihrer pränatalen Entwicklung (Romanoff, 1967).

Die Entwicklung des Huhnes (*Gallus gallus domesticus*) bzw. des Hühnerembryos umfasst 21 Tage. Die extraembryonalen Membranen des Vogels - der Dottersack, die Allantois und das Amnion sind vorübergehende lebende Anhängsel des Embryos (Abb. 1).



**Abb. 1: Vogelembryo und die extraembryonalen Membranen modifiziert nach Müller und Hassel (2002)**

## 2.2. Entwicklung des Herz-Kreislaufsystems und dessen Energiegewinnung

Die Anlagen der Endothelzellen des Herzens sind mesodermalen Ursprungs. Am Anfang besteht das Herz aus einer paarigen tubulären Struktur. Diese wird bald durch einen einzelnen Tubulus ersetzt. Das Längenwachstum des Herzens wird durch den Platzmangel limitiert. Zudem wird es durch die zwei Blutströme determiniert, die auf die innere Oberfläche der schon verdrehten kardialen Tubulusstruktur einwirken. Die Kavitäten werden schlussendlich in eine rechte und linke Hälfte unterteilt, die wiederum aus zwei Kammern bestehen. Das Herz erreicht die adulte Form vor dem Ende vom D8 (Romanoff, 1960).

Die **Herzfunktion** des noch nicht völlig ausdifferenzierten Herzens ist mit der eines erwachsenen Herzens vergleichbar. Kontraktionskraft, Schlagfrequenz, Druck, Vor- und Nachlast beeinflussen die Herzleistung (Thorburn, 1994).

Bezüglich der prozentualen Gesamtkörpermasse nimmt die **Herzmasse** nur bis zum D4 zu, danach verringert es sich kontinuierlich.

Das venöse Blut aus den embryonalen Geweben mischt sich mit dem oxygenierten Blut aus der Chorioallantoisvene. Es erreicht das Herz über die rechte Vorkammer. Im Vergleich zum Foramen ovale des Säugetieres besitzen Vögel intraseptale Poren. Der Körperkreislauf und die Chorioallantoisarterie werden mit gemischt-venösem Blut aus dem Herzen gespeist. Der Ductus arteriosus verbindet die Lungenarterie mit der Aorta und umgeht damit den Lungenkreislauf. Aus der Chorioallantoisarterie hervorgehend verzweigt sich das kapillare Netzwerk der **Chorioallantoismembran (CAM)** (Olszowka *et al.*, 1988). Aus nutritiven Gründen wird der Lungenkreislauf ebenfalls geringfügig perfundiert (Olszowka *et al.*, 1988). Mit einsetzender **Lungenatmung** ändern sich die Druckverhältnisse, wodurch sich Änderungen im Kreislaufsystem ergeben (Bezzel, 1990; Freeman und Vince, 1974). Der Ductus arteriosus verliert seine Funktion, die intraseptalen Poren schließen sich und der Lungenkreislauf wird dem Gesamtkreislauf zugeschaltet. Letztlich bildet sich der extraembryonale Kreislauf zurück.

Das Herz wird durch den parasympathischen N. vagus und den sympathischen N. cardiacus innerviert (Baumel *et al.*, 1993; Salomon, 1993). Nach 68h gelangen **parasympathische** Fasern, die vom Thorakalganglion des N. vagus abstammen, zum distalen Teil des Truncus arteriosus durch den Aortenbogen. **Sympathische** Elemente fangen nach 80-84h der Inkubation an, die vagalen Fasern zu begleiten. Bis zum Ende von D10 existiert ein komplexes Netz aus Zellen und Fasern bis in die Kammern und das Septum (Romanoff, 1960). Von einer funktionstüchtigen Innervierung ist für den Parasympathikus ab D12 (Kirby und Stewart, 1986; Pappano und Loffelholz, 1974) und für den Sympathikus ab D16 (Kirby und Stewart, 1986) auszugehen. Erst im letzten Viertel der Inkubation ist ein adrenerger

Tonus auf das Herz vorhanden, der auf der steigenden Konzentration der im Blut zirkulierenden Katecholamine beruht (Crossley und Altimiras, 2000). Maximalwerte für Adrenalin und Noradrenalin werden um den D19-20 erreicht (Crossley und Altimiras, 2000; von Blumroder und Tönhardt, 2002; Wittmann und Prectl, 1991).

#### **2.2.1.1. Der Einfluss der Temperatur**

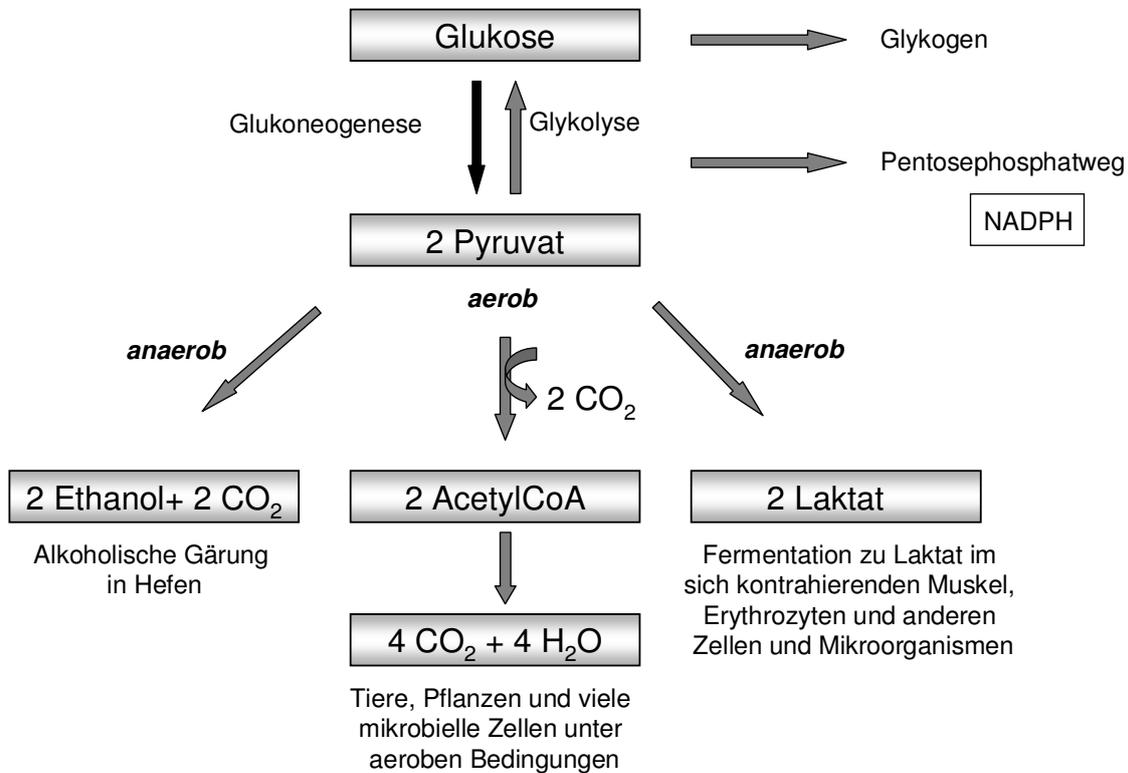
Das Herz des Hühnerembryos ist nur in einer engen Temperaturspanne fähig zu schlagen. Die Widerstandsfähigkeit gegen eine längere Exposition von Wärme oder Kälte ist jedoch beachtlich. Der Temperatureinfluss variiert mit dem Inkubationsalter und dem Temperaturlevel (Romanoff, 1960).

#### **2.2.1.2. Entwicklung des Herzstoffwechsels**

Das embryonale bzw. fetale Herz funktioniert und entwickelt sich in einer zunehmend hypoxischen Umgebung und verfügt über die Fähigkeit zur **aeroben** und **anaeroben Energiegewinnung** (Romano *et al.*, 2001). Im Gegensatz zum adulten Herzen werden Fettsäuren aufgrund enzymatischer Unreife nur im geringen Maße zur Energieversorgung herangezogen (Abdel-Aleem *et al.*, 1999; Pugh und Sidbury, 1971). Die Glykolyse trägt dagegen hauptsächlich zur ATP Produktion bei (Jones und du Toit, 1985; Lopaschuk *et al.*, 1991) und der Umbau von Glykogen erfolgt sehr schnell (Clark, 1973). Dieser Metabolismus ist im sich entwickelnden Herzen von Vorteil, da weniger O<sub>2</sub> benötigt wird als bei der Verstoffwechslung von Fettsäuren (Baumann und Meuer, 1992). Die Glykogenkonzentration des embryonalen Myokards ist 10-20fach höher als im ausgewachsenen Herzen (Lopaschuk *et al.*, 1991). Das embryonale Myokard toleriert eine vorübergehende Verarmung exogener Substrate unter Normoxie (Barry *et al.*, 1980) und erholt sich schnell von substratlosen anoxischen Episoden (Tran *et al.*, 1996). Daraus schlussfolgern Romano *et al.* (2001), dass das Herz während der Embryonalentwicklung bereits unter physiologischen Bedingungen am oberen Limit seiner Leistungsfähigkeit arbeitet. Das ist wahrscheinlich auf die strukturellen Besonderheiten zurückzuführen. Im embryonalen Herzen ist der Gehalt an Myofibrillen geringer und das sarkoplasmatische Retikulum und das T-Tubulus-System sind kaum entwickelt (Jensen *et al.*, 1999). Der kontinuierlich steigende Blutdruck und die mechanische Arbeit während der frühen embryonalen Entwicklung erfordern ein schnell wachsendes Herz, um seine hämodynamische Leistungen zu bewältigen (Hu und Clark, 1989). Der gleichzeitig wachsende O<sub>2</sub>-Bedarf (Raddatz *et al.*, 1992) macht die kardiale Aktivität entscheidend von O<sub>2</sub> abhängig (Romano *et al.*, 2001).

Bis das embryonale Herz innerviert wird, ist die Regulation der Funktion des kardiovaskulären Systems von Mechanismen auf der Gewebsebene abhängig (Romano *et al.*, 2001). Im Hühnerembryo sind der Glukoseabbau über die Glykolyse, die **Laktatproduktion** und der **Pentosephosphatweg** besonders aktiv (Abb. 2) und benötigen

bevorzugt Glukose statt Glykogen. Über den oxidativen Pentosephosphatweg können NADPH und Pentosen - benötigte Reduktionsäquivalente für die Biosynthese - gebildet werden. Letztere werden bei Bedarf wieder der Glykolyse zur Verfügung gestellt. NADPH ist essentiell, um Glutathion im reduzierten Zustand, und damit seine antioxidativen Funktionen zu erhalten (Marshall und Bangert, 2008) (S. 22).



**Abb. 2: Übersicht über den Glukosestoffwechsel - Substrate und Produkte. Modifiziert nach [http://www.chemie.uni-marburg.de/~ak66/bc2\\_04\\_side\\_reactions-MM.pdf](http://www.chemie.uni-marburg.de/~ak66/bc2_04_side_reactions-MM.pdf) (Stand: 31.03.2010)**

Mit 80-90% wird der größte Anteil von ATP im Herzen für die Myokardkontraktionen (Querbrückenzyklus und Kalziumtransporte) verbraucht. Nur 1% des ATP-Umsatzes dient der Aufrechterhaltung der transmembranären Ionentransporte, der Syntheseleistungen zur Strukturhaltung und der Wärmebildung. Der O<sub>2</sub>-Verbrauch des Herzmuskels entspricht 10% des O<sub>2</sub>-Verbrauchs des Gesamtorganismus.

Der O<sub>2</sub>-Verbrauch des Embryos wird zudem von der **Umgebungstemperatur** und der sich entwickelnden **Endothermie** beeinflusst. In den ersten 2/3 der Inkubationszeit eines Hühnerembryos verändert sich der O<sub>2</sub>-Verbrauch linear mit der Umgebungstemperatur wie bei **ektothermen** Organismen. Zum Ende der Inkubation wandelt sich der Embryo zu einem endothermen Organismus um, wodurch sich O<sub>2</sub>-verbrauchende Mechanismen zur Erhaltung der Körpertemperatur entwickeln (Mortola und Labbe, 2005).

## 2.3. Das vaskuläre System

Bis zu dem Zeitpunkt, ab dem ein **intraembryonales Gefäßsystem** und ein schlagendes Herz existieren, wird der Embryo über den Dottersackkreislauf ernährt. Durch die drei hoch spezifizierten Blutgefäßsysteme des Vogelembryos fließt gleichzeitig Blut. Der **extraembryonale Gefäßkreislauf** besteht aus dem Dottersack- und dem Allantoiskreislauf und entspricht dem maternalen Kreislauf der Säuger (Romanoff, 1960).

**Primitive erythroide Zellen** sind bereits nach 36h Brutdauer festzustellen, enddifferenzierte Stammzellen der Hämatopoese ab dem 5. Bebrütungstag. Die endgültige Erythropoese beginnt ab dem D7-9 mit Höhepunkt am D10-14. Die **definitiven** Erythrozyten enthalten weniger Hämoglobin als die primitiven Erythrozyten (Romanoff, 1960).

Für die **anaerobe Glykolyse** der roten Blutkörperchen wird Glukose benötigt. Die mitotische Aktivität der Zellen verursacht einen anfänglich hohen  $O_2$ -Verbrauch. Mit dem Reifen der Erythrozyten sinkt der  $O_2$ -Verbrauch. Am Ende der Inkubationsperiode beträgt der  $O_2$ -Verbrauch nur noch 30% des Verbrauchs am D7. Während der letzten Woche vor Schlupf tritt ein besonders starker Abfall auf. Der Rückgang des  $O_2$ -Verbrauchs kann zum einen mit dem zunehmenden Anteil von Hämoglobin mit geringerer  $O_2$ -Affinität erklärt werden. Zum anderen durch die wachsende Anzahl der reifen roten Blutkörperchen in Relation zu den unreifen mit höherem metabolischem Umsatz. Das embryonale Gewebe weist einen stärkeren Abwärtstrend der Atmungsaktivität auf (Romanoff, 1960).

**Hämoglobin (Hb)** ist Hauptbestandteil der Erythrozyten. Von D3-7 findet ein rascher Anstieg der zellulären Hämoglobinmenge statt, gefolgt von einem ebenso raschen Abfall während D7-10, danach bleiben die Werte nahezu konstant. Der Abfall der zellulären Hämoglobinkonzentration koinzidiert mit dem Auftreten des definitiven Erythrozytenstamms im Blutstrom am D6 (Romanoff, 1960). Es existieren **embryonale und adulte Formen des Hämoglobins** während der Embryogenese (Stevens, 1996). Die embryonalen Hämoglobine (HbP, HbE und HbM) werden von den primitiven Erythrozyten gebildet (Brown und Ingram, 1974; Cirotto *et al.*, 1975). Die ab D6 auftretenden definitiven Erythrozyten produzieren die beim adulten Vogel vorkommenden Hämoglobintypen HbA und HbD sowie eine geringe Menge HbH. Diese Hämoglobintypen unterscheiden sich durch zwei unterschiedliche Globinketten (Stevens, 1996). Schon am D9 kommen mehr adulte Hämoglobinformen (65%) vor (Baumann *et al.*, 1982; Cirotto *et al.*, 1975). Hb ist ein Protein mit positiver Kooperativität, d.h., die Bindung eines  $O_2$ -Moleküls begünstigt die Bindung weiterer  $O_2$ -Moleküle. Dadurch entsteht die sigmoide Form der  $O_2$ -Dissoziationskurve (Riggs, 1998; Stevens, 1996). Ab 8 kPa ist das Hämoglobinmolekül optimal mit  $O_2$  beladen. Im Bereich niedrigerer  $O_2$ -Partialdrücke, wie sie in den Körpergeweben herrschen, ist die Dissoziationskurve nach rechts verschoben, wodurch  $O_2$  leichter abgegeben wird. Das beruht auf dem **Bohr-Effekt**:

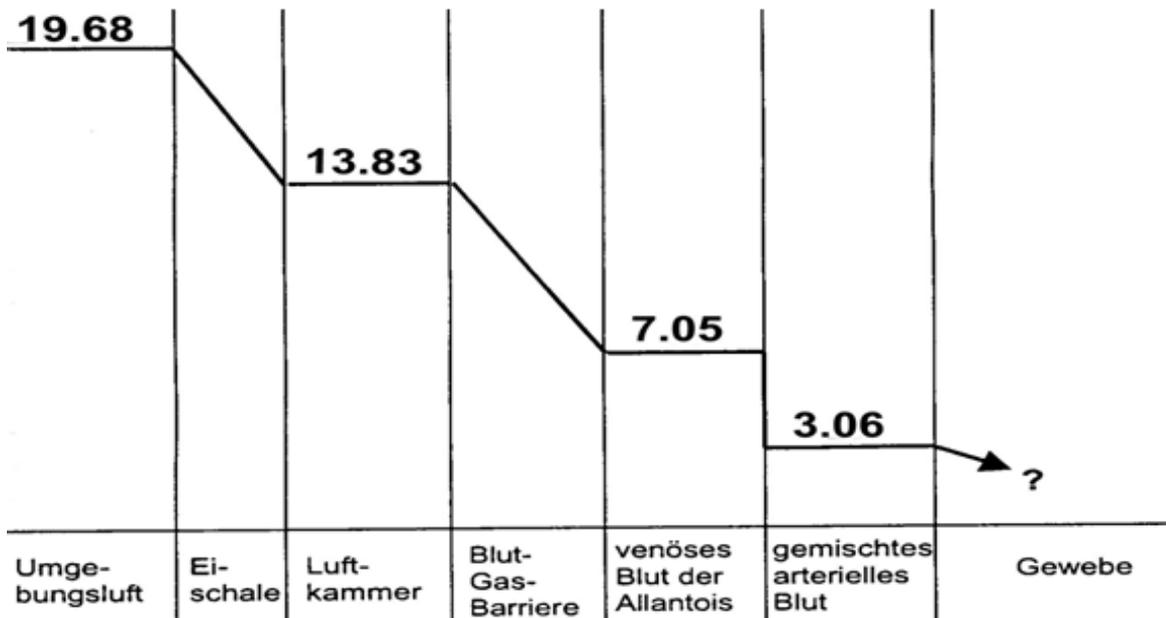
Erhöhte CO<sub>2</sub>-Werte und erhöhte Temperaturen führen zu einer Senkung des Blut-pHs. Die Affinität von Hämoglobin zu O<sub>2</sub> nimmt ab, so dass dieser ins Blut abgegeben wird. Bereits eine Senkung des pH-Werts um 0,2 hat einen 20%igen Affinitätsverlust zur Folge.

## 2.4. Entwicklung der Sauerstoffversorgung

Der **primäre Kreislauf**, der sich aus den embryonalen sowie den Dottersackgefäßen zusammensetzt, bildet sich am D1,5. Die extraembryonalen Gefäße liegen noch eindimensional vor (Romanoff, 1960). In dieser Phase erreicht der O<sub>2</sub> den Embryo über Diffusion durch die Eischale und ihre Membranen (Ciotto und Arangi, 1989). Am D3 beginnt mit dem **sekundären Kreislauf** der hämoglobingebundene O<sub>2</sub>-Transport. Hier liegen die Dottersackgefäße bereits in zwei Ebenen vor und beginnen ein Kapillarnetz auszubilden (Romanoff, 1960). Am D6 setzt beim Haushuhn die Ausbildung der **Chorioallantoismembran (CAM)** ein. Sie löst als gasaustauschendes Organ den sekundären Kreislauf ab. Die CAM entwickelt sich durch fortschreitende Fusion zweier extraembryonaler Membranen, dem Chorion und der Allantois. Bei der Verschmelzung bilden sich eine Vielzahl von Sinusoiden, womit die O<sub>2</sub>-Versorgung durch Vergrößerung der Gefäßoberfläche verbessert wird (Freeman und Vince, 1974). Am D12 bedeckt die CAM die innere Schalenmembran nahezu vollständig. Eine weitere Ausdehnung ihrer Oberfläche ist nicht mehr möglich (Ackerman und Rahn, 1981; Freeman und Vince, 1974). Der O<sub>2</sub>-Bedarf verhält sich proportional zum Energieumsatz und dieser steigt mit zunehmendem Wachstum des Embryos. Damit kommt es ab D13 zu einem erhöhten O<sub>2</sub>-Bedarf bzw. einem fortschreitenden O<sub>2</sub>-Mangel für den Embryo, da die Permeabilität für O<sub>2</sub> über die Eischale und deren Membranen nur langsam zunimmt (Freeman und Vince, 1974). Der arterielle O<sub>2</sub>-Partialdruck in der Chorioallantoisvene sinkt von 83,5 mmHg (ca. 11,11 kPa) am D10 auf 57,2 mmHg (ca. 7,61 kPa) am D18 (Tazawa *et al.*, 1971). Zunächst wird dieser O<sub>2</sub>-Mangel durch Steigerung des Blutflusses in der CAM kompensiert. Durch die Steigerung der Kapillardichte in der Muskulatur wird die Diffusionsstrecke für Gas verringert (Snyder *et al.*, 1984). Diese Möglichkeiten sind jedoch begrenzt (Freeman und Vince, 1974).

Der zunehmende O<sub>2</sub>-Bedarf provoziert um den D19 das Anpicken der inneren Eischalenmembran (**Internal Pipping, IP**). Wenn die innere Membran mit dem Schnabel durchstoßen ist, beginnt die **Lungenatmung**. Mit deren Einsetzen erfolgt der Gasaustausch nicht mehr über Diffusion sondern über Konvektion (Romanoff, 1960; Tullett und Burton, 1985). Nach dem IP befindet sich der Schnabel in der Luftkammer. Diese bildet sich kurz nach der Eiablage durch Abkühlung und dem dadurch bedingten Auseinanderweichen der inneren und äußeren Eischalenmembran am stumpfen Pol des Eis. Mit fortschreitender Inkubationszeit vergrößert sich die Luftkammer durch Wasserverlust (Freeman und Vince, 1974). Der große Unterschied der O<sub>2</sub>-Partialdrücke in Luftkammer (13,83 kPa) und

Chorioallantoisvene (7,05 kPa) (Abb. 3) entsteht aufgrund der geringen Diffusionskapazität der inneren Diffusionsbarriere und dem arteriovenösen Shunt des Allantoiskreislaufes. Über letzteren umgehen etwa 11% des Blutes die O<sub>2</sub>-Aufnahme in der CAM (Olszowka *et al.*, 1988; Piiper *et al.*, 1980). Diese **innere Barriere** besteht aus der inneren Eischalenmembran, der Chorioallantoismembran und dem Endothel der Chorioallantoisgefäße. Trotz ihrer relativ geringen Schichtdicke von knapp 15-20µm macht die innere Barriere etwa 2/3 der Barrierefunktion der Eischale aus (Kutchai und Steen, 1971; Piiper *et al.*, 1980).



### Sauerstoffpartialdruck [kPa]

Abb. 3: Konzentrationsgefälle des Sauerstoffs von der Umgebungsluft bis ins Gewebe modifiziert nach Wangenstein und Rahn (1970).

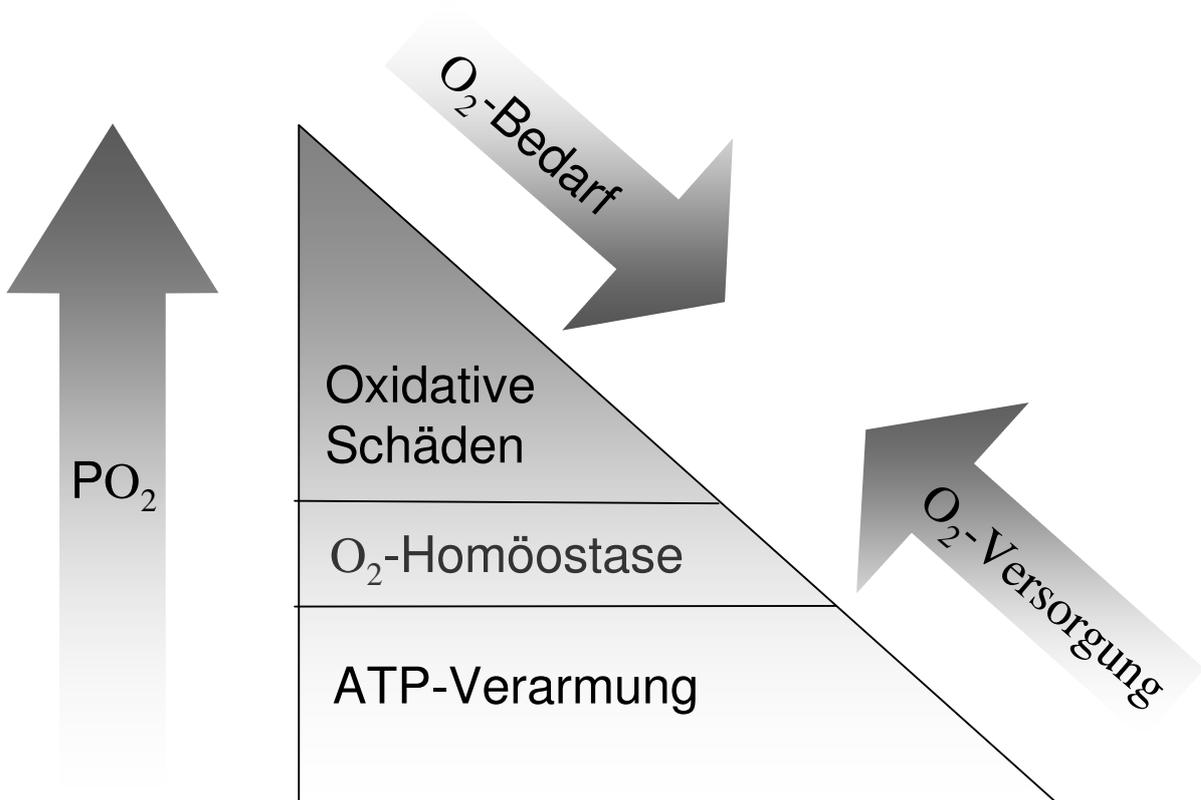
Die **äußere Barriere** setzt sich aus der Kalkschale (300µm dick), der Kutikula und der äußeren Eischalenmembran zusammen (Piiper *et al.*, 1980). Die erneute O<sub>2</sub>-Verknappung und der Anstieg des PCO<sub>2</sub> der Luftkammer löst schließlich das Anpicken der äußeren Eischalenmembran aus, dem sogenannten „**External Pipping**“ (**EP**). Kalkschale und Kutikula sind durchsetzt von Poren, deren Anzahl genetisch festgelegt ist und beim Huhn zwischen 10000 und 12000 Poren pro Ei beträgt (Ar und Rahn, 1985; Piiper *et al.*, 1980). Damit haben diese eine Gesamtfläche von 2-3 mm<sup>2</sup> (Wangenstein und Rahn, 1970) und machen etwa 0,04% der Gesamtoberfläche der Eischale aus (Kutchai und Steen, 1971).

Der Gasaustausch des Vogelembryos nimmt vom Legen des Eis bis zum Schlupf um den Faktor 103 zu. Das bedeutet, dass O<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub> in steigender Menge über die Schale ausgetauscht werden müssen, obgleich die Austauschfläche nahezu konstant bleibt. Diesem Problem wird unter anderem mit der zunehmenden Druckdifferenz zwischen den beiden

Seiten der Eischale begegnet, wodurch die Gasaustauschrate zwischen Umgebung und Embryo nach dem Fickschen Diffusionsgesetz beschleunigt wird (Eckert, 1986).

## 2.5. Sauerstoffmangel

Hypoxie, der  $O_2$ -Mangel im Gewebe, ist ein **fundamentaler physiologischer Stimulus**, der infolge von Gewebewachstum während der normalen Entwicklung entsteht (Chen *et al.*, 1999; Krishnan *et al.*, 2008; Wikenheiser *et al.*, 2006). Die Evolution vielzelliger Lebewesen (Metazoa) war auf die hocheffiziente Energierückgewinnung über die oxidative Phosphorylierung angewiesen. Die beim Glukoseabbau entstandenen energiereichen Verbindungen werden dazu benutzt, über die Atmungskette Elektronen auf molekularen  $O_2$  zu übertragen und dabei ATP zu produzieren. Dadurch wird verglichen mit der Glykolyse die 18fache Menge an ATP pro Mol Glukose generiert. Erst damit war die Voraussetzung geschaffen, um die notwendige Energie zur Entwicklung und Aufrechterhaltung komplexer multizellulärer Organismen zu gewährleisten.



**Abb. 4:**  $O_2$ -Homöostase modifiziert nach Semenza (2004). Alle wichtigen physiologischen Systeme sind Teil des komplexen Mechanismus, der die Erhaltung des Gleichgewichts zwischen  $O_2$ -Bedarf und  $O_2$ -Versorgung reguliert. Ziel ist, die Spannweite der zellulären  $O_2$ -Zufuhr so eng zu halten, dass die Risiken, die durch  $O_2$ -Mangel bzw.  $O_2$ -Überschuß entstehen, so gering wie möglich sind.

Die Benutzung von  $O_2$  als Substrat für die Energieproduktion ist nicht risikofrei. Die Elektronen reagieren über die mitochondriale Atmungskette unter Bildung von Wasser ( $H_2O$ ) schließlich mit  $O_2$ . Dieser Schritt wird katalysiert durch die Cytochrom-c-Oxidase

(Komplex IV). Ein Teil der Elektronen entgeht jedoch der Atmungskette und bindet frühzeitig an O<sub>2</sub>. Dies resultiert in der Generierung von Superoxidanionen, die durch das Enzym Superoxiddismutase in Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) konvertiert werden (Semenza, 2007). Die Oxidierung von Lipiden, Nukleinsäuren und Proteinen durch diese sogenannten **reaktiven Sauerstoffspezies (ROS=Reactive Oxygen Species)** verursachen zelluläre Dysfunktionen bis hin zum Zelltod. Dieser Prozess wird als **oxidativer Stress** bezeichnet. Anstiege oder Senkungen der zellulären O<sub>2</sub>-Konzentrationen (**Hyperoxie** oder **Hypoxie**) führen zu einer übermäßigen Produktion von ROS (Guzy und Schumacker, 2006). Diese Erkenntnis impliziert, dass ein effizientes Funktionieren der Atmungskette nur in einer geringen Spannweite von O<sub>2</sub>-Konzentrationen stattfinden kann (Tomita *et al.*, 2007). Die Folge der Substratbegrenzung durch Hypoxie ist eine ungenügende ATP-Produktion. Das Aufrechterhalten der O<sub>2</sub>-Homöostase ist ein lebensnotwendiges Prinzip für das Überleben der Metazoa (Abb. 4).

### 2.5.1. Zeitliche Einteilung der Adaptationsphasen an Sauerstoffmangel

Die schnellsten Reaktionen (**Sekunden** bis **Minuten**) werden auf systemischer Ebene durch die Aktivierung schon existierender Proteine ausgelöst. Spezialisierte O<sub>2</sub>-Sensoren leiten die Reduktion des O<sub>2</sub>-Gehalts über vegetative Nervenbahnen weiter. Das führt zu pulmonarer Vasokonstriktion und damit verstärkter Ventilation und Perfusion der Lunge, erhöhter Blutzirkulation, peripherer Vasodilatation, v.a. im Gehirn und den Koronargefäßen, und einer Steigerung des Herzminutenvolumens. Insgesamt sorgen diese Mechanismen für eine bessere O<sub>2</sub>-Bereitstellung mittels vorhandener Kapazitäten (Michiels, 2004).

Innerhalb von **Minuten** bis **Stunden** wird von einem aeroben zu einem anaeroben Metabolismus umgeschaltet. Es kommt auf Zell- und Gewebesebene zu Umverteilungen und Einsparungen im Energieverbrauch, allosterischer Aktivierung glykolytischer Enzyme und zur Aktivierung übergeordneter Positiv- und Negativregulatoren wie dem Hypoxia Inducible Factor (HIF) (Kap. 2.6.1.1). Transkriptionelle und posttranskriptionelle Regulationsmechanismen beeinflussen Gene auf der Proteinebene sowie deren mRNA-Synthese und -Stabilität auf verschiedenen Ebenen (Pilkis und Granner, 1992).

Innerhalb von **Stunden** und **Tagen** kommt es zur Anpassung auf molekularer Ebene (gesteigerte oder erniedrigte Genexpressionsraten und kovalente Modifikationen), die zu einer Erhöhung der glykolytischen Kapazität, des Transports von O<sub>2</sub> sowie seiner Verteilung durch verbesserte Vaskularisierung führt (Michiels, 2004; Pilkis und Granner, 1992). Außerdem kommt es unter andauernder Hypoxie zu einer Einstellung eines hypometabolischen Gleichgewichts mit entsprechender Herunterregulation des ATP-Verbrauchs (Boutilier, 2001) (S. 23).

### 2.5.2. Regionale Unterschiede bei Sauerstoffmangel

O<sub>2</sub>-Mangel wirkt sich unterschiedlich stark auf verschiedene Organe, Gewebe und Zelltypen aus (Kelly *et al.*, 2003; Stroka *et al.*, 2001). Daraus folgt eine unterschiedliche O<sub>2</sub>-Sensitivität zwischen Organen, Geweben und Zelltypen. Innerhalb eines Organs reicht eine mangelhafte Durchblutung, um **regionale Unterschiede in der Oxygenierung** des Gewebes zu bewirken wie bei einer myokardialen Ischämie (Forsythe *et al.*, 1996). Zusätzlich gibt es einen Sauerstoffpartialdruck (PO<sub>2</sub>)-Gradienten von Arterien zu Venen, der die O<sub>2</sub>-Sensitivität von Zellen gleichen Zelltyps in einem Gewebe beeinflusst. Dies führt, z. B. in der Leber, zu einer **metabolischen Zonierung** („metabolic zonation“) (Kietzmann *et al.*, 2000). Dabei kommt es zu einer zonierten Expression von Enzymen des Kohlenhydratstoffwechsels in der Leber. So beträgt der PO<sub>2</sub> im periportalen Bereich ~70 mmHg im Gegensatz zum perivenösen mit nur ~35 mmHg. Je nach O<sub>2</sub>-Gehalt sind in den Zellen mehr glukoneogentische bzw. glykolytische Gene zu finden (Kietzmann *et al.*, 1998). Romano *et al.* (2001) stellten regionale Unterschiede der glykolytischen Kapazität in verschiedenen Teilen des Hühnerherzens unter Hypoxie fest.

### 2.6. Adaptation

Unter **Adaptation** wird die physische, psychische, aktive oder passive Anpassung eines Organismus, Organs oder Regulationssystems an veränderte Bedingungen oder Reize unter dem Einfluss von belastenden Faktoren verstanden. Dabei kommt es zur Einstellung eines anderen Funktionsniveaus von bleibendem Charakter innerhalb erweiterter physiologischer Toleranzgrenzen (Dörner, 1976). Im Zuge der perinatalen Periode entwickeln sich die meisten funktionellen Systeme von einem Steuersystem zu einem Regelkreis. Während einer kurzen Zeitphase der Ontogenese (sensible Phase) wird der Sollwert extern definiert. Umweltfaktoren beeinflussen diesen stark. Voraussetzung für eine erfolgreiche Adaptation ist die aufeinander abgestimmte Veränderung aller Bausteine des Regulationssystems. Mangelhafte Koordination der Veränderungen führt über eine verminderte Stabilität des Regelkreises zur **Maladaptation**.

**Epigenetische Adaptation** ist das Ergebnis langfristiger, jedoch reversibler Änderungen der Expression relevanter Effektorgene ohne Änderung der DNA-Sequenz (Dörner, 1976). So erworbene, nicht genetisch fixierte Veränderungen können lebenslang erhalten bleiben (Nichelmann *et al.*, 1999; Riggs *et al.*, 1996). Es wird davon ausgegangen, dass physiologische Kontrollsysteme bis zu einer bestimmten Phase der frühen Ontogenese (meist pränatal) Steuersysteme ohne Rückkopplung sind. Bei der Schließung dieser Systeme zu Regelsystemen mit Rückkopplung bestimmt die Höhe des aktuell gesteuerten Wertes die Höhe des Sollwertes des jeweiligen Systems. Signale aus der Umwelt wirken in der pränatalen Periode in einer relativ kurzen Zeitphase der Ontogenese (sensible Phase)

entscheidend auf den Aktivitätsbereich physiologischer Regelsysteme. Umweltfaktoren beeinflussen somit während der embryonalen Entwicklung die späteren Adaptationsleistungen des Organismus im Sinne einer epigenetischen Anpassung (Nichelmann *et al.*, 2002). Das Resultat solcher Vorgänge kann eine verbesserte Anpassungsfähigkeit und Toleranz gegenüber Umwelteinflüssen sein. Suboptimale pränatale Umwelteinflüsse können das Überleben überhaupt ermöglichen, sich im späteren Leben jedoch maladaptiv auswirken. So sind z. B. verminderte Geburtsmassen mit einer erhöhten Prävalenz an kardiovaskulären und Stoffwechselkrankheiten verbunden.

Eine **sensible Phase für den O<sub>2</sub>-Verbrauch** von Hühnerembryonen wurde im Zeitraum von **D6-12** beschrieben (Decker, 2002; Dzialowski *et al.*, 2002). Diese Phase fällt somit in den von Starck und Ricklefs (1998) als Entwicklungsstadium II bezeichneten Zeitraum, in dem sich Organstrukturen ausbilden und Gewebe beginnen, sich zu differenzieren. In den Arbeiten von Decker (2002) und Dzialowski *et al.* (2002) zeigte sich ein Langzeiteffekt auf den Stoffwechsel von Hühnerembryonen nach chronischer Hypoxie während des mittleren Inkubationsdrittels. Diese Embryonen hatten eine niedrigere Stoffwechselrate, jedoch eine höhere Toleranz gegenüber Hypoxie (höhere Überlebensrate), sowie eine verminderte Antwort des Stoffwechsels auf eine akute Hypoxie (verminderter O<sub>2</sub>-Bedarf). Die Stoffwechselrate wurde anhand des O<sub>2</sub>-Verbrauchs ermittelt.

Der Stressor O<sub>2</sub>-Mangel wirkt sich, je nach dem Zeitpunkt seines Auftretens, unterschiedlich auf die Entwicklung des Vogelembryos aus. Des Weiteren weisen verschiedene Organe zeitlich unterschiedliche sensible Phasen auf (Dzialowski *et al.*, 2002; McCutcheon *et al.*, 1982). Auch die postnatale neuronale hypothalamische Thermosensitivität wird entscheidend durch die pränatale Temperaturexposition beeinflusst (Tzschentke, 2002).

### **2.6.1. Adaptation an Sauerstoffmangel**

#### **2.6.1.1. Hypoxia Inducible Factor (HIF)**

Hypoxia Inducible Factor 1 (HIF1) wird in allen Zellen exprimiert und ist ein O<sub>2</sub>-regulierter Transkriptionsaktivator, der entscheidende Rollen in der Embryonalentwicklung und in der postnatalen Physiologie sowie Pathophysiologie spielt (Semenza, 2004). Damit ist HIF1 ein Masterregulator der O<sub>2</sub>-Homöostase in Metazoa. In allen Zellen kontrolliert HIF1 die Expression von Hunderten von Genen (Tomita *et al.*, 2007). Da die Reihe an Zielgenen beträchtlich von einer zur anderen Zelle variiert, umfasst das HIF1 Transkriptom wahrscheinlich Tausende von Genen (Semenza, 2007; Semenza, 2007). HIF1 vermittelt zellautonome, gewebspezifische und systemische Antworten auf O<sub>2</sub>-Mangel. Da in jedem Zelltyp unterschiedliche Gene reguliert werden, wird die Expression mancher Gene zudem je nach Zelltyp induziert oder unterdrückt (Kelly *et al.*, 2003). Der Signaltransduktionsweg ist hochkomplex und wird von vielen Faktoren beeinflusst. HIF1 ist sowohl in die

Embryonalentwicklung und die physiologische Antwort auf  $O_2$ -Mangel involviert, als auch in die Pathophysiologie von Zivilisationskrankheiten wie Herzinfarkt, Schlaganfall, Tumoren und chronischen Lungenerkrankungen (Semenza, 2001).

HIF1 ist ein Heterodimer bestehend aus jeweils einer basic helix-loop-helix (bHLH)-Domäne und einem PAS-Motiv (**HIF1 $\alpha$**  und **HIF1 $\beta$** ) (Wang *et al.*, 1995). PAS steht für die Proteine PER, ARNT und SIM, bei denen diese Sequenz zuerst entdeckt wurde. Während HIF1 $\beta$  konstitutiv exprimiert wird, wird HIF1 $\alpha$  unter normoxischen Bedingungen konstitutiv synthetisiert, ubiquitiniert und einer proteasomalen Degradation unterworfen (Huang *et al.*, 1998). Kein Protein scheint schneller abgebaut zu werden als HIF1 $\alpha$  (Semenza, 2004). Die Halbwertszeit von HIF1 $\alpha$  unter normoxischen Bedingungen liegt bei <1min (Yu *et al.*, 1998). Unter hypoxischen Bedingungen sinkt der Anteil von HIF1 $\alpha$ , der ubiquitiniert wird, dramatisch, resultierend in einer Anhäufung des Proteins. Das ist eine wichtige Voraussetzung zur Dimerisierung mit der HIF1 $\beta$  Untereinheit, der Translokation in den Zellkern (Wang und Semenza, 1995) und der Bindung an DNA (Jiang *et al.*, 1996) (Abb. 5).

### HIF1-Struktur und -Funktion

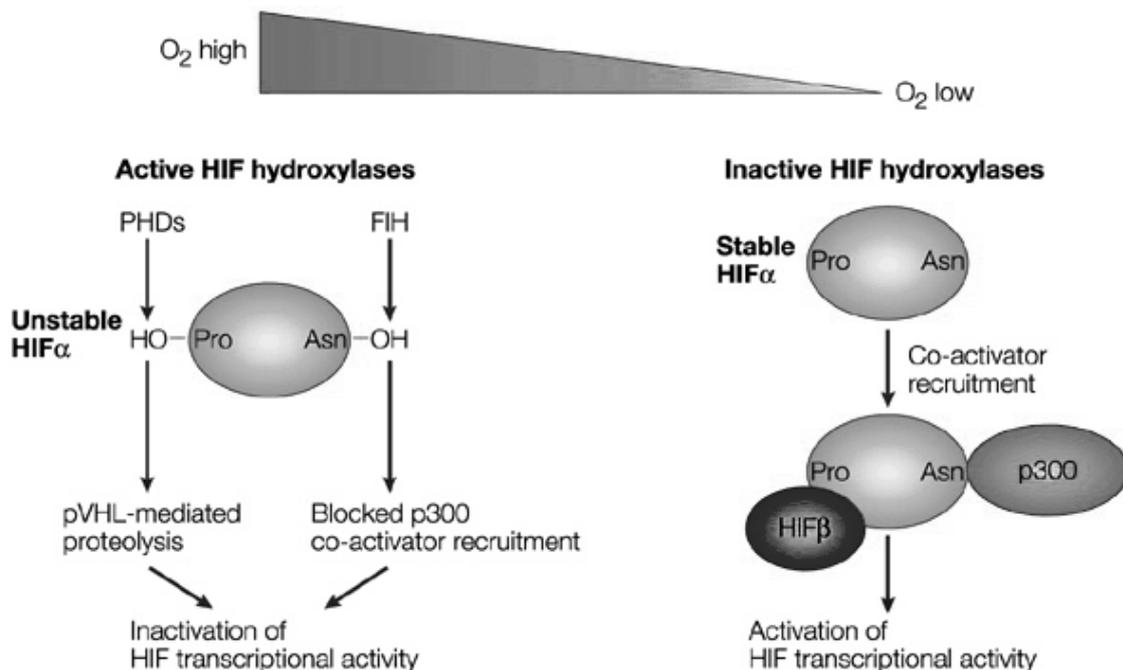
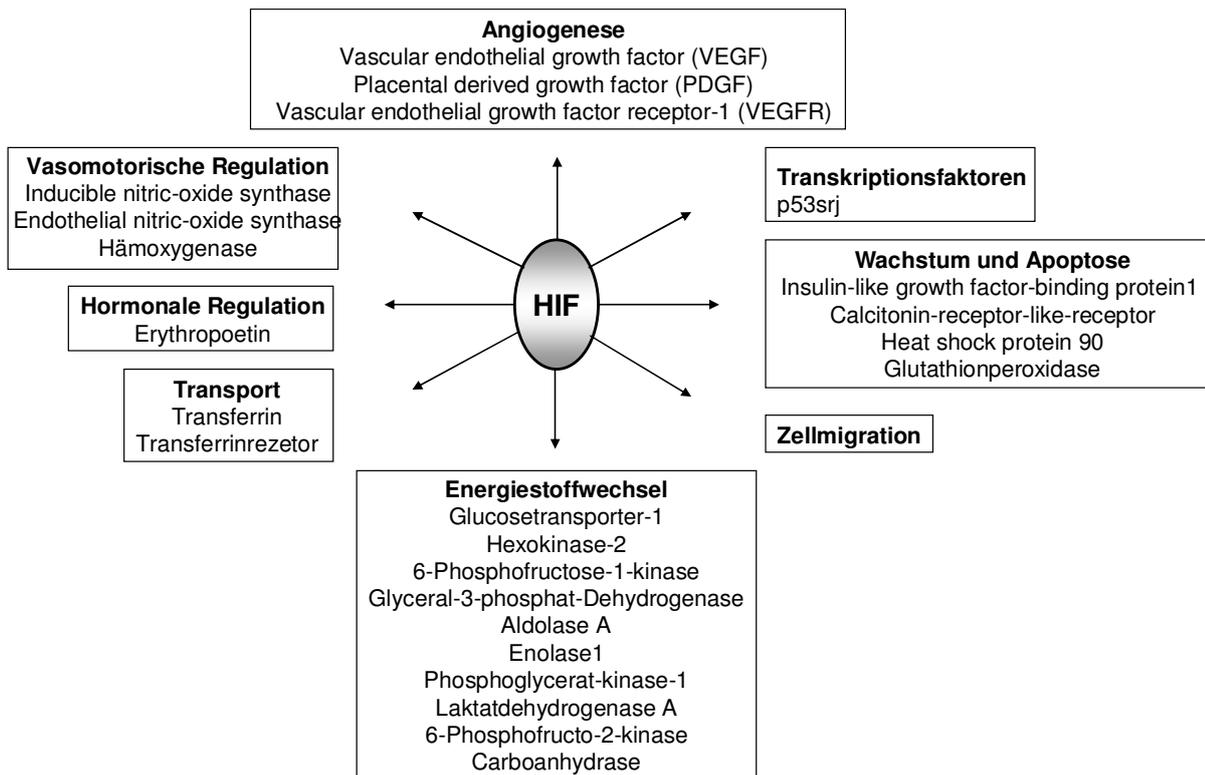


Abb. 5: Die HIF1 $\alpha$ -Untereinheit unter Normoxie und Hypoxie modifiziert nach Schofield und Ratcliffe (2004). In der Anwesenheit von  $O_2$  werden die aktiven HIF-Hydroxylasen (Prolyl hydroxylase domains=PHDs und Factor inhibiting HIF=FIH) herunterreguliert und inaktivieren die HIF $\alpha$ -Untereinheit. Das ermöglicht die  $O_2$ -abhängige Degradation von HIF1 $\alpha$  durch das von Hippel-Lindau Tumorsuppressor Protein (VHL). Unter hypoxischen Bedingungen sind die Hydroxylasen inaktiv und HIF1 $\alpha$  dimerisiert mit der HIF1 $\beta$ -Untereinheit und bindet an DNA.

Das HIF $\alpha$ / $\beta$ -Dimer bindet an definierte Regionen, den (cis-acting) **Hypoxia Response Elements (HREs)**, von Zielgenen (Semenza, 2001) und rekrutiert Koaktivatorproteine. Zusammen kommt es dadurch zur erhöhten Transkription.

Ein wichtiges Element, was zur Komplexität beiträgt, ist das HIF1 $\alpha$ -Paralogon **HIF2 $\alpha$** . HIF2 $\alpha$  ist ebenso O<sub>2</sub> reguliert und dimerisiert mit HIF1 $\beta$ . Es kommt auch hier zur Transkriptionsaktivierung von einer Reihe sich überlappender aber auch unterschiedlicher Zielgene (Hu *et al.*, 2006). **HIF3 $\alpha$** , ein anderes Paralogon, scheint eine inhibitorische Funktion auf HIF1 $\alpha$  zu haben (Makino *et al.*, 2007).

In hypoxischen Zellen ist die Expression von HIF1 $\alpha$  exponentiell erhöht, wenn die Zellen eine kritische O<sub>2</sub>-Konzentration unterschreiten (Jiang *et al.*, 1996; Yu *et al.*, 1998). Die atmosphärische O<sub>2</sub>-Konzentration liegt bei ca. 21%, wohingegen der physiologische PO<sub>2</sub> im Myokard ca. 2% beträgt. Kleine Änderungen der O<sub>2</sub>-Homöostase führen zu graduellen Veränderungen der transkriptionellen Antwort von HIF durch Aktivierung O<sub>2</sub>-abhängiger Gene (Semenza, 1999) (Abb. 6).



**Abb. 6: Übersicht zu wichtigen Einflussbereichen von HIF. Modifiziert nach Schofield und Ratcliffe (2004).**

## Regulation von HIF

### Regulation der HIF1 $\alpha$ -Synthese

Prinzipiell werden extrazelluläre Signale zum Zellkern übertragen, indem Wachstumsfaktoren, Zytokine und andere Liganden an verwandte Rezeptortyrosinkinasen

und G-Protein gekoppelte Rezeptoren an die Zelloberfläche binden. Die Aktivierung der Signalwege führt zu Überleben, Wachstum und Proliferation der Zellen. Eine unvermeidbare Konsequenz davon wiederum ist ein erhöhter  $O_2$ -Verbrauch. Die gleichen Signalwege induzieren so  $O_2$ -unabhängig vorsorglich die HIF1-Aktivität (Fukuda *et al.*, 2002; Laughner *et al.*, 2001).

#### $O_2$ -abhängige posttranslationale Modifikation

Die  $O_2$ -abhängige Degradation von HIF1 $\alpha$  wird durch das von **Hippel-Lindau Tumorsuppressor Protein (VHL)** ausgelöst. Der Ubiquitin-Protein-Ligase-Komplex ubiquitiniert HIF1 $\alpha$  und macht es damit zur Zielscheibe der Degradation durch das 26S-Proteasom. Das Anlagern von VHL ist in Anwesenheit von molekularem  $O_2$  im HIF1 $\alpha$  und HIF2 $\alpha$  Molekül abhängig von der Hydroxylierung von Prolylresten durch die **Prolylhydroxylase 2 (PHD2)**. **PHD1** und **PHD3** hydroxylieren ebenso HIF1 $\alpha$ , wenn sie in übergroßer Zahl exprimiert werden. Ihre physiologische Funktion ist unklar (Semenza, 2007). Die Aktivität von PHD2 wird unter hypoxischen Konditionen gesenkt. Dies geschieht entweder als Folge der Substratbegrenzung ( $O_2$ ) (Epstein *et al.*, 2001) oder als Resultat der Hemmung eines Eisenions im katalytischen Zentrum durch die am Komplex III der Atmungskette generierten ROS (Chandel *et al.*, 1998; Guzy *et al.*, 2005). Unter physiologischen Bedingungen ist  $O_2$  also das limitierende Substrat. Unter pathophysiologischen Bedingungen scheinen auch Eisen und Ascorbat limitierend zu sein (Knowles *et al.*, 2003). Die Expression der PHDs variiert zudem nicht nur je nach Zelltyp, sondern auch auf unterschiedliche Stimuli, wie z. B. Hypoxie (Berra *et al.*, 2003; D'Angelo *et al.*, 2003; Epstein *et al.*, 2001). **Alternatives „Splicing“** des primären RNA-Transkripts von zwei der PHDs ermöglicht einen zusätzlichen Mechanismus zur Modulation der PHD Aktivität (Semenza, 2004).

**FIH1 (Factor Inhibiting HIF1)** ist eine weitere 2-Oxoglutarat-abhängige Dioxygenase und ein Negativregulator der Transaktivationsfunktion (Mahon *et al.*, 2001). Sowohl die Stabilität als auch die Transkriptionsaktivität von HIF1 sind also negativ reguliert durch  $O_2$ -abhängige Hydroxylierung (Poellinger und Johnson, 2004). Der molekulare Mechanismus, der zu einer Stabilisierung von HIF1 $\alpha$  als Antwort auf ein intrazellulär erniedrigtes  $O_2$ -Angebot führt, war lange ungeklärt. Seit der Identifizierung der Eisen- und 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen gelten diese als entscheidende intrazelluläre  **$O_2$ -Sensoren** für die Regulation von HIF (Schofield und Ratcliffe, 2004).

#### $O_2$ -unabhängige posttranslationale Modifikation

Die Halbwertszeit von HIF1 $\alpha$  wird von verschiedenen  $O_2$ -unabhängigen Regulationsmechanismen beeinflusst. So bindet das **Hitzeschockprotein 90 (HSP90)**

kompetitiv an HIF1 $\alpha$  und verhindert damit dessen proteasomale Degradation (Isaacs *et al.*, 2002). HSP90 konkurriert mit RACK1 (Receptors for activated C kinase9) um die Bindung der PAS-A Subdomäne von HIF1 $\alpha$ . RACK1 kann statt VHL an Elongin C binden und fördert dadurch die Ubiquitinierung und Degradation von HIF1 $\alpha$  unabhängig von PHD2 und VHL (Liu *et al.*, 2007). Weitere O<sub>2</sub>-unabhängige Mechanismen sind bekannt, deren Bedeutung für die vorliegende Studie vernachlässigbar ist.

### Transkriptionelle Regulation

Zur transkriptionellen Regulation von HIF1 $\alpha$  gibt es unterschiedliche Angaben. Wiener *et al.* (1996) und Yu *et al.* (1998) konnten eine Induktion der HIF1 $\alpha$ -mRNA als Antwort auf Hypoxie oder Ischämie in vivo nachweisen. Da es keine Anzeichen für eine Induktion der HIF1 $\alpha$ -Promoter-Aktivierung als Antwort auf Hypoxie gibt (Iyer *et al.*, 1998; Semenza, 1999), scheint sie sich auf der Ebene der mRNA Stabilisierung abzuspielen (Wang *et al.*, 1995). Der aktive Ausschluss aus dem Kern, alternative Splicingvarianten, die Inaktivierung von HIF1 $\alpha$  durch Bildung eines Heterodimers mit einem inhibitorischen PAS-Protein sowie die verstärkte Genexpression durch höhere Transkriptionsraten von HIF1 $\alpha$  bilden nach Thrash-Bingham und Tartof (1999) weitere Regulationsmöglichkeiten. Hohe NO-Konzentrationen stabilisieren außerdem HIF1 $\alpha$  und aktivieren die Bindung von HIF an DNA unabhängig von der O<sub>2</sub>-Konzentration (Mateo *et al.*, 2003).

### Regulation der Regulatoren

Die Existenz von Regulatoren der Regulatoren vollendet die Komplexität der HIF1-Regulation. Eine wachsende Anzahl an Vertretern, die das Tumorwachstum hemmen, inhibiert auch die HIF1-Aktivität. Über 40 Inhibitoren wurden bisher entdeckt. Sie beruhen auf verschiedenen Mechanismen: Hemmung der HIF1 $\alpha$ -mRNA Expression, HIF1 $\alpha$  Proteinexpression, HIF1 DNA-Bindungsaktivität und HIF1-vermittelte Gentranskription (Semenza, 2007).

#### **2.6.1.2. Auswirkungen des Sauerstoffmangels auf das Herz-Kreislauf-System**

Chronische Hypoxie verzögert während der frühen Embryogenese das Wachstum, setzt die ventrikuläre Funktion herunter und erhöht den Gefäßwiderstand und die relative Herzmasse (Sharma *et al.*, 2006). Längere hypoxische Perioden stimulieren die Expression der Tyrosinhydroxylase (TH), ein Enzym, das den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Katecholaminsynthese katalysiert.

HIF gilt für die physiologische Entwicklung des Embryos, seines **Herzens** und seiner Gefäßversorgung als unentbehrlich (Iyer *et al.*, 1998; Poellinger und Johnson, 2004). Messungen mit einem fluoreszendierenden Hypoxiemarker zeigten, dass die sinkenden O<sub>2</sub>-

Konzentrationen in Kardiomyozyten proportional zum Anstieg der Hypoxie (Fluoreszenz) sind (Duranteau *et al.*, 1998). Untersuchungen von Sugishita *et al.* (2004) am embryonalen Abflusstrakt des Herzens (OFT) ergaben, dass die myokardiale Hypoxie der Auslöser für ein einzigartiges Programm der Genexpression im OFT ist. Der OFT wird durch Septierung in einen Lungen- und einen Körperkreislauf unterteilt. Das erfordert eine Kürzung, Rotation sowie Apoptose von Kardiomyozyten. Bis zu 50% der Kardiomyozyten des OFT sind von der Apoptose betroffen (Watanabe *et al.*, 1998). Hypoxie ist damit ein Schlüsselreiz für die physiologische apoptotische Umgestaltung des aviären OFTs bei der Bildung des Lungen- und Körperkreislaufes.

Langzeithypoxie vom D3-18 führt zu einem **hyperplastischen Epikard** und einem **hypertrophen Myokard** einhergehend mit einer Reduktion der Myofibrillen und einer Erhöhung der Vaskularisierung (Mancini *et al.*, 1991). Chronische Hypoxie von D6-19 bei 15% O<sub>2</sub> erzeugt eine biventrikuläre Vergrößerung (Villamor *et al.*, 2004). Neueste Untersuchungen von Jonker *et al.* (2010) an chronisch anämischen Herzen von Schaffeten führten zu erhöhten fetalen Herzmassen. Die massive Volumenerhöhung (39%) des Muskels durch Kardiomyozytenwachstum beruhte auf der Vergrößerung, der Enddifferenzierung und der Proliferation der Kardiomyozyten. Der Grad der Auswirkungen auf das Herz hängt einerseits von der Intensität und Dauer des hypoxischen Stimulus und andererseits von der kardialen Toleranz gegenüber O<sub>2</sub>-Mangel ab. Diese Toleranzgrenzen ändern sich während der Entwicklung signifikant. Die höhere Resistenz des embryonalen Herzens gegenüber O<sub>2</sub>-Mangel entsteht durch seinen geringeren Energiebedarf, einer gesteigerten Fähigkeit zur anaeroben Glykolyse (Driedzic und Gesser, 1994) sowie größeren Glykogenreserven (Ostadal *et al.*, 1999).

Leber- und Herzzellen können ihre Stoffwechselrate während anhaltender Perioden von O<sub>2</sub>-Mangel bis zu 50% senken (Budinger *et al.*, 1996; Schumacker *et al.*, 1993). In diesen Fällen entwickelt sich innerhalb 2-3h eine Stoffwechseldepression bei O<sub>2</sub>-Partialdrücken (PO<sub>2</sub>) über dem kritischen PO<sub>2</sub>. Dadurch soll die oxidative Phosphorylierung durch die geringe Diffusion von O<sub>2</sub> in die Mitochondrien begrenzt werden (Boutillier, 2001). Eine regionale Verringerung der O<sub>2</sub>-Verfügbarkeit im Herzen resultiert in einer Abnahme der Kontraktionsaktivität und des O<sub>2</sub>-Bedarfs (Arai *et al.*, 1991; Heuch, 1998; Lee und Downey, 1993). Embryonale Kardiomyozyten (Hühnerembryonen) verringern ihre O<sub>2</sub>-Aufnahme und damit ihre aerobe Energiegewinnung proportional der regionalen Durchblutung und der O<sub>2</sub>-Verfügbarkeit weit oberhalb kritischer PO<sub>2</sub>. Der verringerte Energieverbrauch geht bei länger andauernder Hypoxie mit einer Verminderung der Kontraktilität einher (Haddad, 2002). Zusätzlich wird verstärkt anaerob Energie produziert (Budinger *et al.*, 1996; Driedzic und Gesser, 1994). Erniedrigte Kontraktilität und O<sub>2</sub>-Verbrauch im intakten Myokard von Hühnerembryonen zur Senkung des Stoffwechsels als Antwort auf Hypoxie wird auch „**Tiefschlafmyokard**“

(„hibernating myocardium“) genannt (Budinger *et al.*, 1996). In seiner ektothermen Phase beantwortet der embryonale Organismus Hypoxie reflexartig mit einer Bradykardie (Mulder *et al.*, 1998). Nach Ruijtenbeek *et al.* (2000) führt dagegen eine moderate Hypoxie zu einem Anstieg des Blutdruckes und der sympathischen Innervierung der peripheren Arterien.

Die **Arteriolen des Körperkreislaufs dilatieren** unter hypoxischen Bedingungen als autoregulatorisches Element, um die Gewebsoxygenierung aufrechtzuerhalten. Im Gegensatz dazu, **kontrahieren** sich die **Arteriolen des Lungenkreislaufs**, um das Blut von unbelüftetem Lungengewebe wegzuleiten (Semenza, 2009). Wird der Hühnerembryo im Zeitraum des CAM-Wachstums einem verminderten O<sub>2</sub>-Gehalt ausgesetzt, so **nimmt die Kapillardichte in der CAM zu** (Dusseau und Hutchins, 1988). Die entstandene Gewebshypoxie aktiviert HIF1 (Semenza, 2009). HIF1 wiederum aktiviert viele Gene, die für Wachstumsfaktoren und Zytokine kodieren (Abb. 6). Darunter sind der **Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)**, **Angiopoetin1+2** sowie der **Platelet-derived Growth Factor (PDGF)** (Forsythe *et al.*, 1996; Kelly *et al.*, 2003). Zusätzlich wird die Expression der dazugehörigen Rezeptoren HIF1 induziert, z. B. **Vascular Endothelial Growth Factor Receptor (VEGFR)** (Okuyama *et al.*, 2006).

**VEGF (VEGFA)** ist während der embryonalen Entwicklung unter normoxischen Bedingungen nachweisbar und essentiell für eine normale Organentwicklung (Carmeliet *et al.*, 1996; Sugishita *et al.*, 2000; Takahashi *et al.*, 2001). VEGFA gehört zu einer Genfamilie zu der auch Plazental Growth Factor (PLGF), VEGFB, VEGFC und VEGFD gehören. VEGF induziert das Wachstum und sichert das Überleben der Endothelzellen in Arterien, Venen und Lymphgefäßen (Ferrara und Davis-Smyth, 1997). Das „chicken“ VEGFA Gen ist die Grundlage für mindestens vier verschiedene **Isoformen** (122,146,166 und 190 homolog zu den humanen Isoformen 121,145,165 und 189) der VEGF-mRNA durch alternatives Splicen der Exons (Sugishita *et al.*, 2000). Alle Isoformen werden auf mRNA-Niveau unter Hypoxie gleichmäßig induziert (Bunn und Poyton, 1996; Levy *et al.*, 1995). Die Regulation des VEGF induzierten Gefäßwachstums ist hochkomplex. Dabei spielen verschiedene **VEGF Rezeptoren (VEGFR)** und HIF1 eine wichtige Rolle (Forsythe *et al.*, 1996).

Unter O<sub>2</sub>-Mangel kommt es zu einer **Erhöhung der Erythrozytenzahl** und des Hämatokrits sowie zu einem **gesteigerten Hämoglobingehalt** (Tazawa *et al.*, 1971). Die O<sub>2</sub>-Bindungsaffinität des Hämoglobins sinkt unter O<sub>2</sub>-Mangel (Riggs, 1998). Der Organismus gleicht entstandenen O<sub>2</sub>-Verlust durch die Regulation der Expression multipler Gene aus, die in die Erythropoese involviert sind (z. B. Erythropoetin) (Semenza, 2009). Des Weiteren treten unter Hypoxie weniger reife primitive als unreife definitive Erythrozyten auf.

O<sub>2</sub>-Mangelbebrütung führt zu **veränderten Noradrenalinwerten**, die dem Kreislauf durch die Verschiebung der O<sub>2</sub>-Bindungskurve nach rechts eine bessere O<sub>2</sub>-Ausnutzung ermöglichen (Hühnke und Tönhardt, 2004). Katecholamine spielen eine entscheidende Rolle als

Vermittler der Stressantwort bei O<sub>2</sub>-Mangel (Mulder *et al.*, 2000). Durch periphere Vasokonstriktion und eine Umverteilung des Herzauswurfvolumens zugunsten von Herz, Gehirn und Chorioallantoismembran wird der Embryo vor Schaden bewahrt (Mulder *et al.*, 1998; Wittmann und Prechtel, 1991).

### **2.6.1.3. Auswirkungen des Sauerstoffmangels auf den Stoffwechsel**

#### **Auswirkungen des Sauerstoffmangels auf den Glukose- und Energiemetabolismus**

Um an eine Unterversorgung von O<sub>2</sub> zu adaptieren, verfügt die Zelle über Mechanismen zur Umprogrammierung des Stoffwechsels. Die Stoffwechseländerungen, die durch Hypoxie hervorgerufen werden, sind profund.

Eine der subtilsten Adaptation ist die Umschaltung einer Untereinheit in der Cytochrom-c-Oxidase (COX; Komplex IV). Dadurch wird die regulatorische Untereinheit COX4-1 aufgrund der HIF1 Aktivität mit der COX4-2 Isoform ersetzt (Fukuda *et al.*, 2007). Dieser Austausch hat zur Folge, dass die Effizienz, mit der COX Elektronen auf O<sub>2</sub> überträgt, unter hypoxischen Bedingungen optimiert wird (Semenza, 2009).

Eine drastischere Veränderung entsteht durch das Fernhalten von Pyruvat von den Mitochondrien (Kim *et al.*, 2006; Papandreou *et al.*, 2006). Kommt durch O<sub>2</sub>-Mangel weniger Pyruvat in den Mitochondrien an, wird weniger Acetyl-CoenzymA (Acetyl-CoA) gebildet. Dadurch fehlen Substrate zur oxidativen Phosphorylierung. Die dadurch reduzierte Bildung von ATP muss durch eine erhöhte Glukoseaufnahme über Glukosetransporter und eine gesteigerte Umwandlung von Glukose zu Laktat kompensiert werden. Letzteres erfolgt durch glykolytische Enzyme und die Laktatdehydrogenase A, die alle durch HIF1 Zielgene kodiert sind (Iyer *et al.*, 1998; Ryan *et al.*, 1998; Semenza *et al.*, 1996).

Die Zellen wechseln unter O<sub>2</sub>-Mangel von der oxidativen Phosphorylierung zur Glykolyse. Der essentielle Energiebedarf wird mit Hilfe anaerober ATP-Gewinnung („**Pasteur Effekt**“) gedeckt (Boutillier, 2001; Driedzic und Gesser, 1994). O<sub>2</sub> ist also nicht nur ein Regulator der Glykolysegeschwindigkeit, sondern auch ein Regulator der Genexpression glykolytischer Enzyme (Webster, 1987). Chronische Hypoxie erzeugt eine signifikante und aufeinander abgestimmte Aktivierung der Transkription folgender glykolytischer Gene: Fructose-2,6-bi(s)phosphataldolase, Triosephosphatisomerase, Phosphoglyceratkinase, Enolase, Pyruvatkinase und Laktatdehydrogenase (Semenza *et al.*, 1996; Semenza *et al.*, 1994; Webster, 1987).

Die drakonischste Maßnahme auf andauernde Hypoxie ist die aktive Zerstörung der Mitochondrien durch selektive **mitochondriale Autophagie** (Zhang *et al.*, 2008). Entstehen zu hohe oder zu niedrige O<sub>2</sub>-Konzentrationen im Mitochondrium, kommt es zur Bildung von ROS, die das Risiko der Apoptose erhöhen (Zhang *et al.*, 2007). Unter O<sub>2</sub>-Mangel gebildete

ROS führen zu einer Inhibierung der HIF1 $\alpha$ -Hydroxylase, dem Negativregulator der HIF1-Aktivität (Guzy und Schumacker, 2006).

Die unter hypoxischen Bedingungen gesteigerte Glykolyse und der gesenkte O<sub>2</sub>-Verbrauch sind also keine passive Antwort auf O<sub>2</sub>-Mangel. Sie stellen eine aktive Antwort der Zelle dar, um der verminderten Effizienz der Atmung, entstanden durch O<sub>2</sub>-Mangel, entgegenzuwirken. Mangels dieser angemessenen Adaptation kommt es zu einer Anhäufung von ROS über ein toxisches Level. Die Hauptrolle von HIF1 ist demnach die Aufrechterhaltung einer optimalen Balance zwischen glykolytischem und oxidativem Metabolismus, der die ATP-Produktion ohne steigenden ROS-Level maximiert (Abb. 4). Dabei ist die in den Zellen herrschende O<sub>2</sub>-Konzentration unwichtig (Semenza, 2009).

### **Auswirkungen des Sauerstoffmangels auf die ROS-Produktion und die Antioxidantien**

Chronische Hypoxie ist mit einem erhöhten oxidativen Stress assoziiert wie Lipidperoxidation und der Induktion von antioxidativen Enzymen in Geweben und Organen (Kolar und Ostadal, 2004). Embryos unter physiologischen Konditionen sind gegen oxidativen Stress durch niedrige PO<sub>2</sub> (0-8 kPa) und einen niedrigen oxidativen Metabolismus geschützt, was wiederum die ROS-Generation reduziert (Allen, 1991). Antioxidative Verteidigungssysteme scheinen im unreifen Myokard schwächer zu sein als im adulten (Raddatz *et al.*, 2006). Antioxidative Enzyme wie die Superoxiddismutasen (SOD), Hämoxxygenasen (HO), Glutathionperoxidasen (GP) und Hitzeschockproteine (HSP) zählen als Indikatoren für oxidativen Stress (Maini *et al.*, 2007).

### **Auswirkungen des Sauerstoffmangels auf die ATP-Produktion**

Fast alle energiefordernden Prozesse sind direkt oder indirekt abhängig von der Hydrolyse von ATP. Unter Normbedingungen werden 80% des verfügbaren O<sub>2</sub> zur ATP-Produktion verwendet (Rolfe und Brown, 1997). Unter physiologischen Bedingungen sind die Proteinsynthese und die Ionenpumpen (ATPasen) mit 20-80% des ATP-Verbrauchs die Hauptenergieabnehmer (Michiels, 2004). Die Ionenpumpen sorgen für die Stabilität des Ruhepotentials und die Konstanz des Zellvolumens. Unter Hypoxie wird erst die RNA- und DNA-Synthese und damit verbunden die Proteinsynthese gedrosselt. Als zweites folgt die Verminderung der aktiven Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> und Ca<sup>2+</sup>-Transporte (Hochachka, 1986; Michiels, 2004). Einer Membrandestabilisierung wird durch eine adaptive Herabsetzung der Membranpermeabilität entgegengewirkt. Als Teil des Energiesparprozesses werden die Dichte und die Aktivität der Ionenkanäle reduziert. Die „**Kanalhemmung**“ ist eine leistungsfähige Methode, um den Energiebedarf zu senken (Boutilier, 2001; Hochachka, 1986; Hochachka *et al.*, 1996).

Energiemangel ist durch ungenügende O<sub>2</sub>-Bereitstellung für die oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien der Hauptgrund für den Zelltod durch O<sub>2</sub>-Mangel (Abb. 8). Wie stark die

einzelne Zelle empfänglich für den Hypoxie-induzierten Zelltod ist, variiert je nach Zelltyp und hängt von dem Ausmaß ihrer elektrischen Aktivität bzw. ihrem ATP-Verbrauch ab. Sinkt der  $O_2$ -Gehalt unter eine kritische Grenze, kommt es zu einer erhöhten Ionendurchlässigkeit der Zellmembran, resultierend in Gehirnfehlfunktionen und Herzarrhythmien. Ein Erhalt der intrazellulären Verhältnisse erfordert die Rückverteilung dieser Ionen durch ATP-abhängige Pumpensysteme ( $Na^+/K^+$ -ATPase). In Abhängigkeit der elektrischen Aktivität wird hierfür der Großteil des Ruheenergiestoffwechsels benötigt (Rolfe und Brand, 1996). Übersteigt der ATP-Bedarf das Angebot, kommt es zu Funktionsstörungen der ionenbewegenden ATPasen, Membrandestabilisation, unkontrolliertem Kalziumeinstrom durch spannungsgesteuerte Kanäle und letztlich zur Aktivierung von kalziumabhängigen Phospholipasen und Proteasen (Hochachka, 1986; Michiels, 2004). Weitere Membrandepolarisation, Hydrolyse von zellulären Komponenten, Zellschwellung und Zellnekrose sind die Folge (Boutilier, 2001) (Abb. 7).

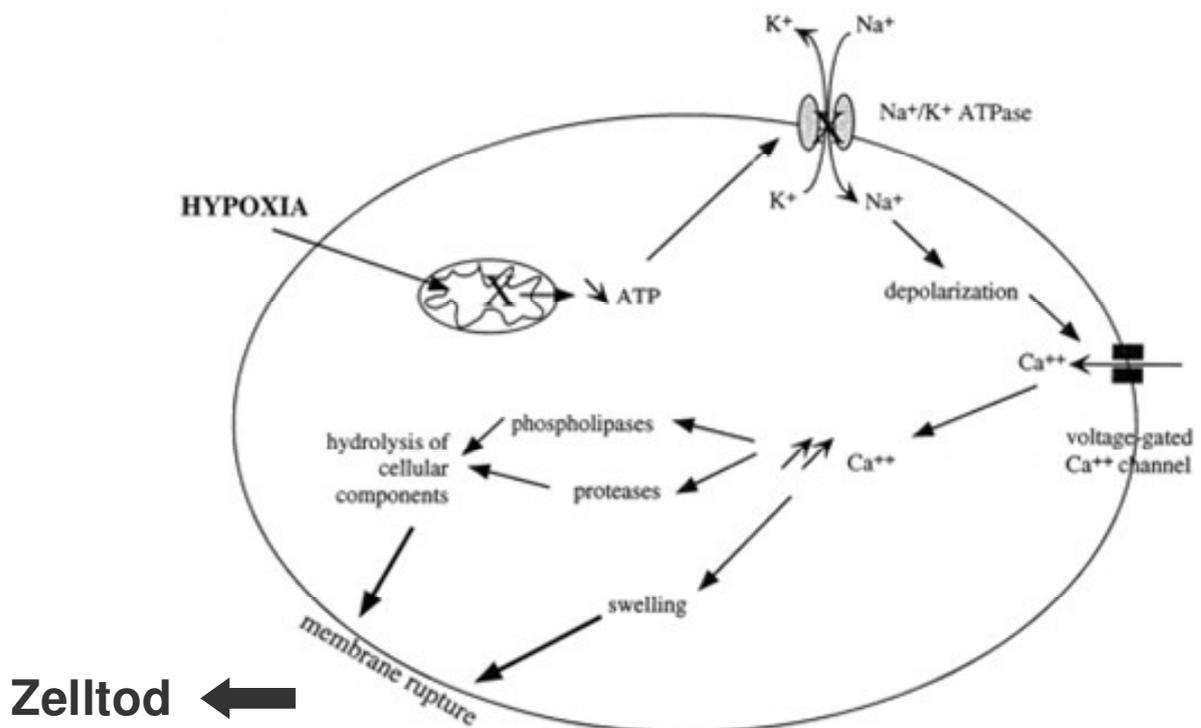


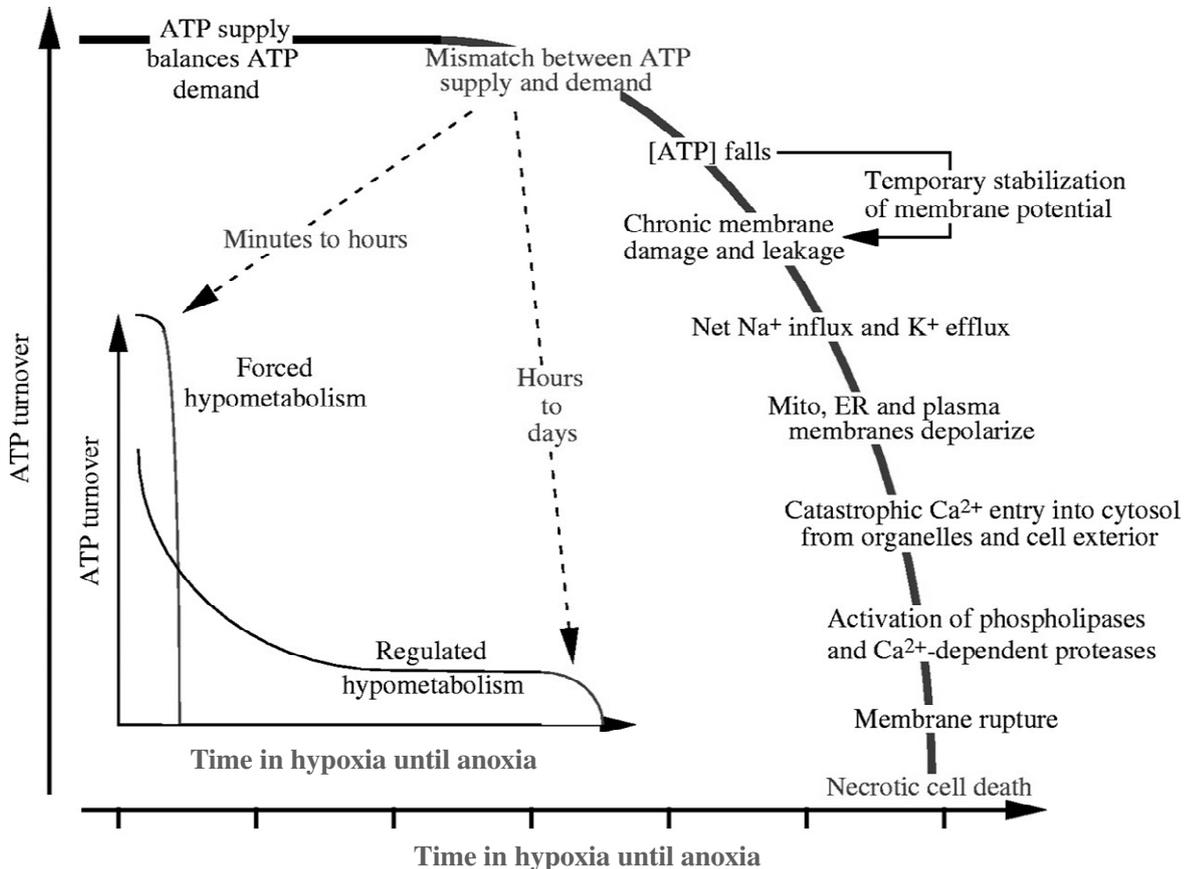
Abb. 7: Schematische Darstellung der Kaskade, die zum Zelltod führt, wenn Zellen starken hypoxischen Bedingungen ausgesetzt werden. Modifiziert nach Michiels (2004).

### Hypoxie-induzierter Hypometabolismus

Ein spezieller Anpassungsmechanismus an  $O_2$ -Mangel ist der **Hypoxie-induzierte Hypometabolismus**. Dieser schützt den Hühnerembryo schon unter sehr milden hypoxischen Bedingungen bis hin zu einer kritischen Grenze durch niedrige Umgebungstemperaturen und niedrige Stoffwechselraten vor der Entstehung einer  $O_2$ -Schuld (Mortola, 2004). Bemerkenswert sind die Auswirkungen auf den  $O_2$ -Verbrauch eines Hühnerembryos bei normalen Temperaturen unter milden hypoxischen Bedingungen. Die

hypometabolische Reaktion erfolgt nicht linear zum O<sub>2</sub>-Angebot, sondern unterliegt einem Regulationsmechanismus (**regulierter Sauerstoffkonformismus**, Abb. 9) (Mortola und Labbe, 2005).

Der Hypoxie-induzierte Hypometabolismus hat nach Schofield und Ratcliffe (2004) eine genregulative Antwort zur Folge. Er basiert auf einer regulierten frühzeitigen aktiven Senkung des ATP-Verbrauchs, einhergehend mit einem verminderten O<sub>2</sub>-Verbrauch über die adaptive Erniedrigung der Membranpermeabilität und der Absenkung der RNA- bzw. DNA-, sowie der Proteinsynthese (Boutillier, 2001; Hochachka, 1986; Hochachka *et al.*, 1996). Dadurch werden Funktionsstörungen der ATP-abhängigen Pumpensysteme in anoxie- oder kältetoleranten Zellen herausgezögert. Zudem werden Ressourcen geschont, die Bildung der schädlichen Endprodukte reduziert und die Überlebenszeit der Zellen und des Organismus verlängert (Boutillier, 2001) (Abb. 8). Welche Funktionen durch Hypoxie genau herunterreguliert werden, ist noch unklar (Mortola und Cooney, 2008).



**Abb. 8: Regulierter Hypometabolismus.** Darstellung des ATP-Verbrauchs gegenüber der Zeit unter zunehmendem O<sub>2</sub>-Mangel. Im Bereich der unterbrochenen Linie kommt es aufgrund von ATP-Mangel zu Funktionsstörungen der ATP-abhängigen Pumpensysteme, zur Membrandestabilisation, einem unkontrollierten Kalziueinstrom und letztlich zur Zellnekrose. Eine regulierte frühzeitige Absenkung des ATP-Verbrauchs (regulierter Hypometabolismus) zögert Funktionsstörungen der ATP-abhängigen Pumpensysteme heraus. Modifiziert nach Boutillier (2001).

Die Senkung des  $O_2$ -Verbrauchs unter Hypoxie ist ein weitverbreitetes Phänomen bei allen Tierarten (Boutillier, 2001; Jackson, 2004). Selbst geringe Level von Hypoxie induzieren den Hypometabolismus. Grundsätzlich ist nicht das Alter oder die Körpergröße sondern der daraus entstehende  $O_2$ -Bedarf und die Umgebungstemperatur ausschlaggebend für die Stärke der hypometabolischen Antwort auf Hypoxie. Auch bei Thermoneutralität kommt es bei Neugeborenen zu einem hypoxischen Hypometabolismus. Das spricht dafür, dass auch andere  $O_2$ -abhängige Funktionen außer der Wärmeproduktion gehemmt werden, wie z. B. der Energieverbrauch, die zelluläre Erregbarkeit, die Gewebsdifferenzierung und das Organwachstum. Je höher der  $O_2$ -Verbrauch unter Normoxie ist, desto mehr fällt er unter Hypoxie ab (Mortola, 2004). Eine erzwungene Senkung des Stoffwechsels aufgrund einer hohen  $O_2$ -Sensitivität von Zellen oder Geweben führt zum Versagen innerhalb von Minuten bis Stunden (forcierter Hypometabolismus) (Abb. 8).

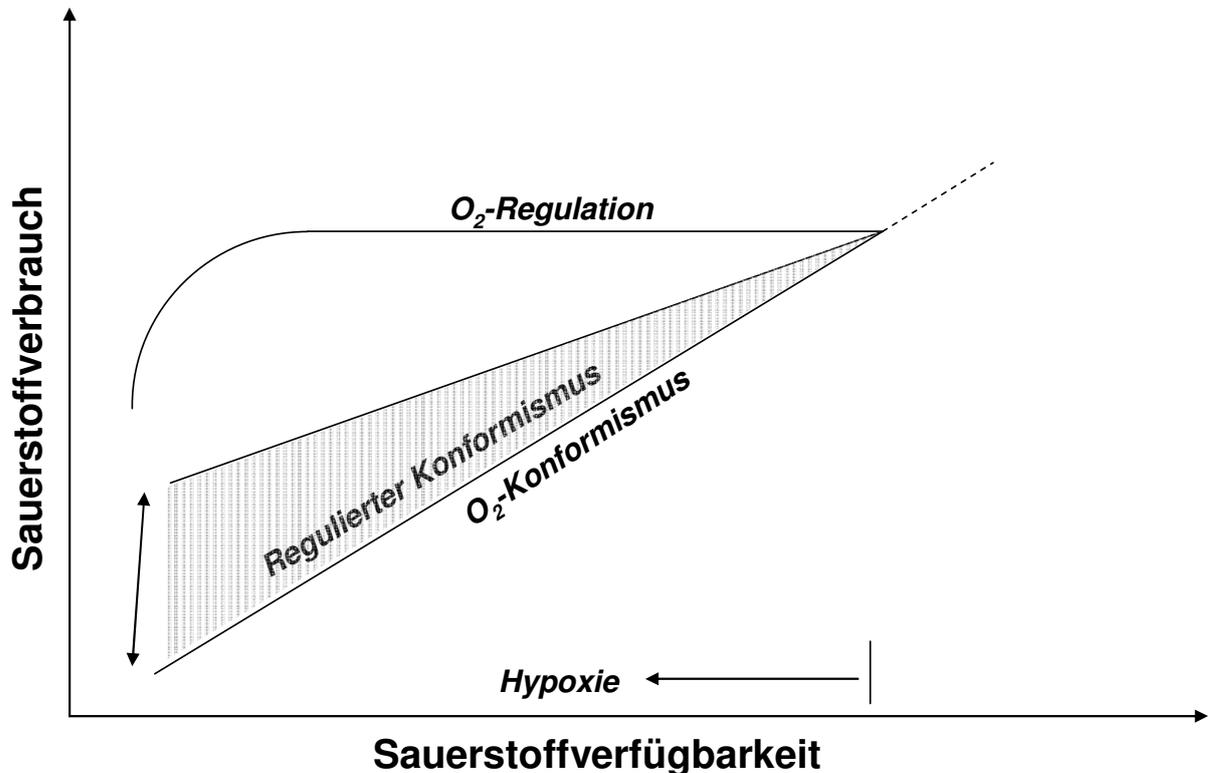


Abb. 9: Beziehung zwischen  $O_2$ -Bedarf und dem  $O_2$ -Angebot modifiziert nach Mortola (2004). Ein Abfall der  $O_2$ -Verfügbarkeit (Hypoxie) verändert nicht die  $O_2$ -Regulatoren, solange eine kritische Grenze nicht unterschritten wird. In einem vollständig konformen Organismus fällt der  $O_2$ -Bedarf mit der  $O_2$ -Verfügbarkeit nach einem eindeutigen Verhältnis. Bestätigt wird das durch Versuche an Neugeborenen, deren  $O_2$ -Bedarf unter hypoxischen Konditionen fällt und unter hyperoxischen steigt (gestrichelte Linie). Tatsächlich variieren die Neugeborenen den  $O_2$ -Bedarf entsprechend dem hypoxischen Level, was für die Existenz eines Regulationsmechanismus spricht (schattierter Bereich des regulierten  $O_2$ -Konformismus).

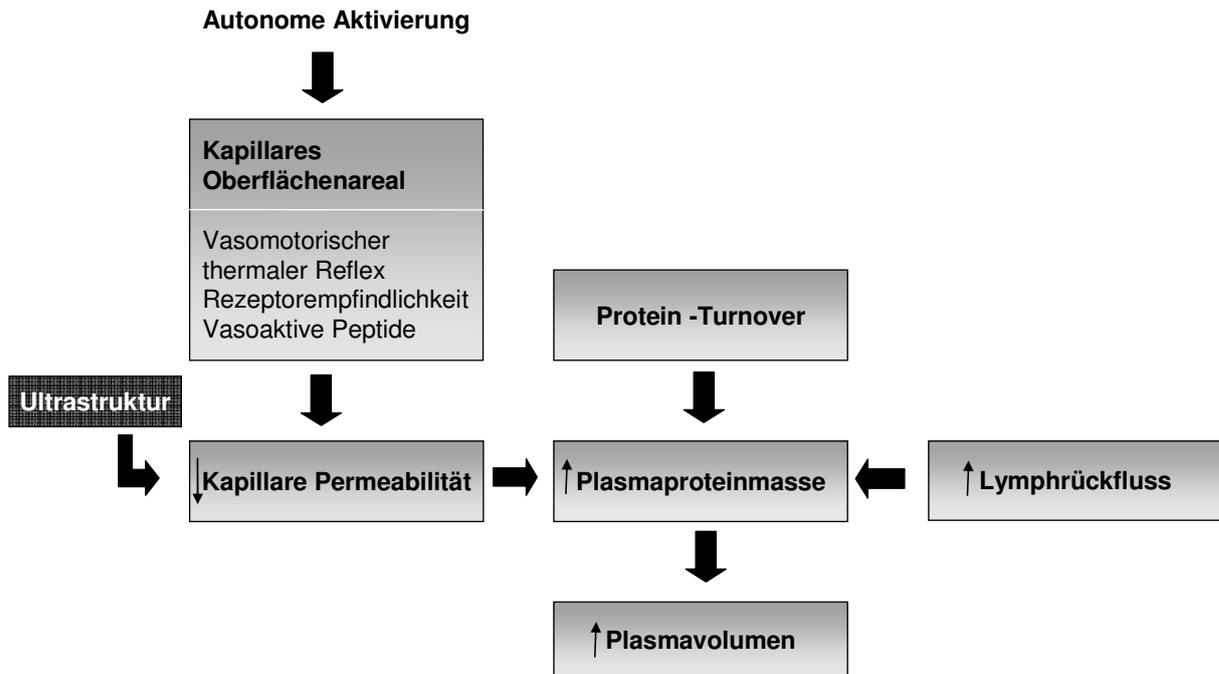
Mortola und Gautier (1995) vermuten hinter dem Hypometabolismus einen zentral kontrollierten Prozess. Versuche, in denen die peripheren Chemorezeptoren deaktiviert wurden oder deren neuronale Weiterleitung durchtrennt wurde, führten trotzdem zu einem

hypoxischen Abfall des Stoffwechsels. Der Abfall des O<sub>2</sub>-Verbrauchs und die Temperatursenkung stellen zwei kontrollierte Prozesse dar, die einander beeinflussen können, aber nicht müssen. Ohne Zweifel verstärken sie sich gegenseitig zum Schutz vor Hypoxie (Mortola, 2004). Änderungen der O<sub>2</sub>-Verfügbarkeit führen zu entsprechenden Änderungen des O<sub>2</sub>-Verbrauchs des Embryos (Bartels und Baumann, 1972; Stock *et al.*, 1985; Tazawa *et al.*, 1992). Versuche von Mortola und Labbe (2005) an Hühnerembryonen zeigten, dass der Hypoxie-induzierte Hypometabolismus nicht durch die limitierte O<sub>2</sub>-Verfügbarkeit begrenzt ist. Temperaturerhöhungen bei gleichbleibender Hypoxie führten zu einer Steigerung des O<sub>2</sub>-Verbrauchs. Das lässt auf einen regulierten O<sub>2</sub>-Konformismus schließen. Auch Marcinek *et al.* (2003) fanden heraus, dass es keine Korrelation zwischen dem intrazellulären O<sub>2</sub>-Gehalt und dem O<sub>2</sub>-Verbrauch des Gewebes gibt, es sei denn der intrazelluläre O<sub>2</sub>-Partialdruck sinkt unter einen sehr niedrigen Wert von z. B. <3mmHg. Das Auftreten des Hypoxie-induzierten Hypometabolismus ist also nicht zwingend eine Indikation für ein begrenztes O<sub>2</sub>-Angebot, aber kann eine Form eines regulierten O<sub>2</sub>-Konformismus sein (Mortola und Labbe, 2005) (Abb. 9).

Langzeiteffekte des Hypometabolismus sind eine Reduktion des Organwachstums und eine geringere Geburtsmasse. Während einer folgenden hypermetabolischen Phase können diese Defizite jedoch fast völlig kompensiert werden (Mortola, 2004). Eine kontinuierliche Bebrütung des Embryos bei einem Luftsauerstoffgehalt von unter 21% führt zu einer reduzierten Lebensfähigkeit, die sich proportional zur Abnahme des O<sub>2</sub>-Gehalts verhält (Romanoff, 1967). Ist die Anpassungsfähigkeit überschritten, steigt die Mortalität.

### **2.6.2. Adaptation des embryonalen Herz-Kreislaufsystems an erhöhte Temperaturen**

Wärmeakklimatisation, d.h. sich an ändernde Umgebungstemperaturen anpassen zu können, ist ein überlebenswichtiger Mechanismus für jedes Individuum. Erfolgreiche Wärmeakklimatisation führt zu einer verbesserten Wärmetoleranz im Sinne einer höheren oberen kritischen Grenze, bis zu der eine Temperaturerhöhung toleriert werden kann, sowie eine länger mögliche Aufenthaltsdauer in einer warmen Umgebung (Horowitz, 2002). Eine hohe Umgebungstemperatur wird als ein potenter klimatischer Stressor angesehen, der einen beeinträchtigenden antioxidativen Status in Geflügel verursacht (Donkoh, 1989). Die Umgebungstemperatur beeinflusst direkt die Körpertemperatur und diese die Vorgänge im Organismus nach der Van't Hoff'schen Regel, wonach ein Temperaturanstieg von 10°C die Reaktionsgeschwindigkeit um den Faktor 2,0 bis 4,0 erhöht.



**Abb. 10: Wärmeakklimatisations-vermittelte Plasmavolumenexpansion. Sie ist hauptsächlich der größeren Plasmaproteinmasse zuzuschreiben. Modifiziert nach Horowitz (2003).**

Das kardiovaskuläre System transportiert die Wärme über die Gefäße zur Haut, wo sie in die Umgebung abgeleitet wird. Hyperthermie führt zur **Vasodilatation in der Haut und Vasokonstriktion in den Organen**, einer verringerten Herzfrequenz, einem erhöhten Schlagvolumen und damit zu einer erhöhten Effizienz der kardialen Leistung (Horowitz, 2002). Horowitz (2003) bewies, dass die nötigen Änderungen der Herzleistung bei chronischer Hyperthermie auf Änderungen der Expression von Genen basieren, die für kontraktile und  $\text{Ca}^{2+}$ -regulierende Proteine kodieren. Bei einer kurzzeitigen Hyperthermie wird der  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt durch eine gesteigerte sympathische Erregbarkeit erhöht. Zudem kommt es zu einer **Ausdehnung des Plasmavolumens**, wodurch das Schlagvolumen zunimmt. Dieser Schlüsselmechanismus der kardialen Hämodynamik ist hauptsächlich der Zunahme der Plasmaproteinmasse zuzuschreiben (Abb. 10). Insgesamt ist das fundamentale Merkmal der Adaptation an Hyperthermie eine **gesteigerte Arbeitseffizienz**. Trotz des erhöhten Schlagvolumens und der erhöhten Compliance bei Wärmeakklimatisation kommt es nicht zu einer kardialen Hypertrophie. Wärmeakklimatisation scheint also eine echte Änderung der elastischen Eigenschaften zu induzieren. Akklimatisierte Herzen verfügen über doppelt so große Glykogenreserven, einer gesteigerten Glukoseaufnahme und einem erhöhten glykolytischen Potential gegenüber nicht akklimatisierten Herzen (Horowitz, 2003). Diese Adaptation hält ca. zwei Wochen an und wird durch die Kreuztoleranz zwischen Wärmeakklimatisation und der Adaptation an  $\text{O}_2$ -Mangel erreicht (Eynan *et al.*, 2002; Horowitz *et al.*, 2004) (S. 31).

Während eines langen Teils der Entwicklung des Hühnerembryos variiert der O<sub>2</sub>-Verbrauch mit der Umgebungstemperatur gemäß dem Arrheniusfaktor wie für ektotherme Tiere erwartet. Während der **ektothermen** Entwicklungsphase sollte eine erhöhte Temperatur einen erhöhten O<sub>2</sub>-Verbrauch mit sich ziehen. Am Ende der Inkubationszeit findet ein gradueller Übergang von einer Poikilothermie zur Homöothermie statt, die erst nach Schlupf vollständig in Erscheinung tritt (Nichelmann und Tzschentke, 2002). Am D16 fanden Mortola und Labbe (2005) erste Zeichen der thermalen Kontrolle, also den Beginn der **Endothermie**. Nach einer Theorie von Burggren (1998) besitzen alle Organismen eine temperaturabhängige Entwicklungsrate. Danach entwickeln sich Individuen unter Hyperthermie schneller als bei niedrigerer Umgebungstemperatur. Die hyperthermisch bebrüteten Embryos erreichen also früher die entsprechenden Entwicklungsstufen. Eine längerfristig erhöhte Inkubationstemperatur hat eine höhere Embryonenmasse zur Folge (Boehm *et al.*, 1987; von Blumröder und Tönhardt, 2002). Außerdem kann es zu einem verfrühten Schlupf und einer gesteigerten Anzahl an Fehllagen und Missbildungen kommen, und damit zu einer erhöhten embryonalen Mortalität (Klemm, 2002; Romanoff, 1972).

Tönhardt (2004) fand nach Warminkubation von Hühnerembryonen höhere Noradrenalinwerte im Plasma verglichen mit dem Plasma nach Kaltinkubation. In wärmer als 37,5°C bebrüteten Embryonen befindet sich der Katecholaminspiegel auf gleichem oder leicht höherem Niveau (Brauch, 2003).

Die Umgebungstemperatur ist ein wichtiger Faktor für das Ausmaß des **Hypometabolismus** (Mortola, 2004). Ektotherme Organismen reagieren auf Stressoren wie Hypoxie mit einer Absenkung der vorher existierenden bevorzugten Körpertemperatur (Wood, 1995). Dieser regulierte Prozess gewährleistet das Gleichgewicht zwischen ATP-Versorgung und -Bedarf (Boutilier, 2001). Wärmeakklimatisation findet während Lebzeiten statt (phänotypische Adaptation). Sie erfordert die Umprogrammierung der Genexpression. Posttranskriptionelle (Horowitz, 2003) und posttranslationale (Maloyan *et al.*, 1999) Änderungen sind möglich. Gene der antiapoptischen, antioxidativen und Hitzeschockprotein-Kaskaden, die für zytoprotektive Proteine kodieren, werden umprogrammiert. Die Folge ist ein verbesserter Schutz gegen Gewebsschäden durch Hyperthermie (Horowitz *et al.*, 2004).

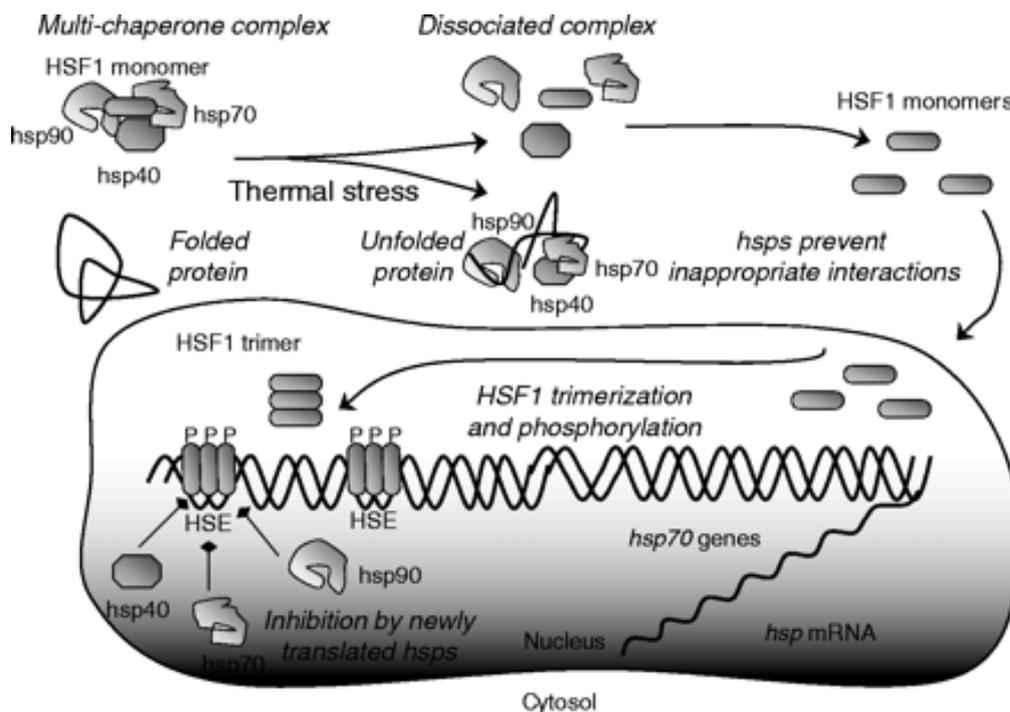
### **Zwei-Phasen-Prozess**

Die Wärmeakklimatisation ist ein Zwei-Phasen-Prozess bestehend aus einer unmittelbaren, vorübergehenden Phase, der HSP vermittelten **Hitzeschockantwort** (S. 29) gefolgt von einer langandauernden Phase, der **Wärmeakklimatisation**. Die Anfangsphase dient der unmittelbaren Erhaltung der DNA- und Zellintegrität bei subletaler Hyperthermie (Horowitz *et al.*, 2004). Die Folgephase ist eine sich langsam entwickelnde und anhaltende Phase als Antwort auf chronische Hyperthermie. Es bildet sich ein zytoprotektives Signalnetzwerk, das

die Aktivierung von Genen zum Schutz vor Hitzeschock, Apoptose und Oxidation beinhaltet. Die Folge von Wärmeakklimatisation ist die Erweiterung der Spannbreite der Thermoregulation (Horowitz, 2002). HIF1 spielt auch in der Wärmeakklimatisation und bei der Antwort auf Hyperthermie eine essentielle Rolle (Maloyan, 2005; Treinin *et al.*, 2003). Zu hohe Temperaturen können nur bis zu einer kritischen Temperatur verkraftet werden. Aufgrund von Konformationsänderungen verlieren Enzyme ihre katalytischen Fähigkeiten, Nukleinsäuren depolymerisieren oder schmelzen und die Membranpermeabilität wird erhöht. Es kommt zur Störung des Membranpotentials und zum Herzstillstand (Ono *et al.*, 1994).

### Hitzeschockantwort

Die Hitzeschockantwort ist ein schnell einsetzender molekularer Verteidigungsprozess assoziiert mit der Bildung verschiedener Familien von **Hitzeschockproteinen (HSP)**. Diese dienen als ubiquitär vorkommender Schutz von Zellen vor Hyperthermie und generellem Stress (Boutillier, 2001). Sie erhöhen die Thermotoleranz und führen Funktionen zum Erhalt der Zelle unter Hyperthermie oder Stress aus.



**Abb. 11: Regulationsmodell zur De-novo-Synthese von Hitzeschockproteinen (HSPs) modifiziert nach Tomanek und Somero (2002).** Der Multiproteinkomplex der HSP-Chaperone mit HSF1 dissoziiert unter Stressbedingungen wie Hyperthermie. Die HSPs binden an ungefaltete Proteine und geben den Hitzeschockfaktor (HSF1) frei. Die Monomere wandern in den Nucleus und binden an die Hitzeschockelemente (HSE). Die Trimere erhöhen die Transkription der HSPs die wiederum an HSF1 binden, was zur Ablösung von HSF1 von den HSE führt.

Die Hitzeschockantwort ist teilweise durch den Hitzeschockfaktor1 (HSF1) reguliert, ein Transkriptionsfaktor, der speziell die Transkription der HSP kodierenden Gene stimuliert

(Wu, 1995). Dazu gehören die HSPs der 40, 70 und 90kDa Größenklassen (HSP40, HSP70 und HSP90). Die HSPs binden unter stressfreien Bedingungen an HSF1 im Multiproteinkomplex. Unter Stressbedingungen dissoziiert der Komplex, da die HSPs jetzt an die ungefalteten Proteine in der Zelle binden. Die inaktiven Monomere wandern in den Nukleus und lagern sich zu Trimeren zusammen, die an Hitzeschockelemente (HSE) binden (Abb. 11).

Die Temperatur bei der diese Reaktion stattfindet, ist nicht festgelegt, was auf die Existenz extrinsischer Faktoren hindeutet. Die HSPs spielen in diesem Regulationssystem des „zellulären Thermometers“ eine wichtige autoregulatorische Rolle, indem sie ihre eigene Synthese über das Ausmaß von freien HSF1s in der Zelle determinieren (Morimoto, 1998). Steigt durch oxidativen Stress oder Prozesse wie der Wärmeakklimatisation die intrazelluläre HSP-Konzentration, kommt es vermehrt zur Bildung des Multiproteinkomplexes. Die Wärmeakklimatisation reguliert so die Temperatur hoch, bei der die Genexpression als Hitzeschockantwort ausgelöst wird (Tomanek und Somero, 2002).

Die Hitzeschockantwort kann auch ohne De-novo-Synthese von HSPs erfolgen. Die zellulären Reserven sind bemerkenswert. HSP90 steigt generell bei Temperaturerhöhungen in allen Spezies (Tomanek und Somero, 2002).

### **2.6.3. Adaptation des embryonalen Herz-Kreislaufsystems an Sauerstoffmangel kombiniert mit erhöhten Temperaturen**

Wärme und O<sub>2</sub> sind die einzigen vom Hühnerembryo benötigten Substrate, die nicht innerhalb des Eis gelagert werden können. Beide wirken sich entscheidend auf den Stoffwechsel aus. Die relative Bedeutung verändert sich während der Entwicklung (Mortola und Labbe, 2005). In homöothermen Tieren schwächt Hypoxie die Temperaturregulation ab. Die Wechselwirkung zwischen Hypoxie und erhöhter Temperatur auf die Einstellung des O<sub>2</sub>-Verbrauchs variiert je nach Entwicklungsstadium des Embryos. Die Höhe des O<sub>2</sub>-Verbrauchs unter Hypoxie resultiert nicht zwingend aus der Begrenzung der O<sub>2</sub>-Versorgung (Mortola und Labbe, 2005). Die künstliche Erwärmung eines hypoxischen Neonatalen während der ektothermen Phase seiner Entwicklung führt zum Anstieg des O<sub>2</sub>-Verbrauchs und provoziert energieverbrauchende Reaktionen, die nachteilig für das Überleben sind (Mortola, 2004).

O<sub>2</sub>-Mangel in der Umgebung senkt den PO<sub>2</sub> im Hühnerembryo. Hohe Umgebungstemperaturen erhöhen die Diffusion. Damit steigt der RER (Respiratory Exchange Ratio) bei Embryos am D11 und D16 unter Hyperthermie kombiniert mit O<sub>2</sub>-Mangel (Mortola und Labbe, 2005). Mortola und Labbe (2005) fanden in Versuchen an Hühnerembryonen heraus, dass der niedrige O<sub>2</sub>-Verbrauch bei 36°C und 15% O<sub>2</sub> signifikant ansteigt, wenn die Temperatur auf 39°C angehoben wird.

Der Anstieg der Umgebungstemperatur unter hypoxischen Bedingungen bewirkt eine Erhöhung der Herzfrequenz (Khandoker *et al.*, 2004) und damit die gesteigerte Durchblutung der Chorioallantoismembran (Ar *et al.*, 1991). Außerdem verändert sich der vaskuläre Widerstand und modifiziert die Verteilung des Blutflusses zugunsten des Herzens und des Gehirns (Crossley *et al.*, 2003). Die Umverteilung nimmt mit zunehmendem Alter des Embryos zu (Mulder *et al.*, 1998). Der durch Hypoxie reduzierte Stoffwechsel birgt potentielle Gefahren. Der metabolisch herabgesetzte Stimulus für die Atmung wird lebensbedrohlich bei einer gleichzeitigen Anhebung der Umgebungstemperatur (oder was vom sich entwickelnden Organismus als Hyperthermie empfunden wird). Zudem ist die Einsparung von O<sub>2</sub> durch eine Umverteilung des Blutes zugunsten der O<sub>2</sub>-sensitiven Organe eine Strategie, die ein ungleiches Wachstum begünstigt, das mit dem Überleben des Gesamtorganismus nicht immer kompatibel ist (Mortola, 2004).

### **Kreuztoleranz**

Die Adaptation an einen Stressor kann zusätzlichen Schutz vor anderen Stressoren bewirken. Diese Kreuztoleranz steigert die Möglichkeit einer erfolgreichen Adaptation an unbekannte Stressoren. Darunter fällt die Adaptation an O<sub>2</sub>-Mangelsituationen und an Hyperthermie (Horowitz, 2003; Levy *et al.*, 1997). Im Herz manifestiert sich die Kreuztoleranz in einer verbesserten mechanischen und metabolischen Leistung und geringeren Ischämie/Reperfusionsschäden (Eynan *et al.*, 2002; Levy *et al.*, 1997). Wärmeakklimatisierte Herzen zeigen eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber gemeinsamen Signalwegen für beide Stressoren (Horowitz *et al.*, 2004). Die transkriptionelle Antwort auf die unterschiedlichen Stressoren ist allerdings stressspezifisch (Horowitz *et al.*, 2004). Maloyan *et al.* (2005) gehen davon aus, dass der Signalweg der Adaptation an O<sub>2</sub>-Mangel ein Bestandteil der Adaptation an erhöhte Temperaturen ist.

## **2.7. Zusammenfassung der Literaturübersicht**

Eine funktionierende O<sub>2</sub>-Versorgung und das Bewältigen von O<sub>2</sub>-Mangelsituationen ist die Grundvoraussetzung jedes vielzelligen Lebens. Sowohl im sich entwickelnden Embryo als auch im adulten Organismus kommt es physiologisch und pathologisch zu O<sub>2</sub>-Mangel. Er löst hochkomplexe, aufeinander abgestimmte Abwehrmechanismen aus. Dazu zählt die erhöhte Bereitstellung von O<sub>2</sub> durch Erythropoese und Angiogenese, die Optimierung der glykolytischen Energiegewinnung und die Verlängerung der zellulären Lebensdauer bis der O<sub>2</sub>-Mangel überwunden ist. Das Herz ist eines der ersten Organe, das von O<sub>2</sub>-Mangel betroffen ist und maßgeblich zur Adaptation an diesen beiträgt. Es gibt viele Ebenen, die an der Regulation des Organismus bei O<sub>2</sub>-Mangel beteiligt sind.

Die Temperatur beeinflusst grundsätzlich die Reaktionsgeschwindigkeit aller biochemischen Prozesse. O<sub>2</sub>-Mangel wird unter erhöhter Temperatur verstärkt. Unter beiden Bedingungen kommt es zu oxidativem Stress der Zellen, der bis zum Zelltod führen kann. Der Transkriptionsfaktor **Hypoxia Inducible Factor (HIF)** ist nicht nur ein Masterregulator der O<sub>2</sub>-Homöostase, sondern spielt auch in der Antwort auf Hyperthermie eine essentielle Rolle. Die Expression auf dem mRNA-Level von **HIF1 $\alpha$**  sowie **primärer HIF1-Zielgene** (Vascular Endothelial Growth Factor, Enolase 1, Hämoxygenase 1) und **Indikatoren für oxidativen Stress** (Hämoxygenase 1, Glutathionperoxidase, Hitzeschockprotein 90) sollen hier unter O<sub>2</sub>-Mangel und Hyperthermie erörtert werden.

Zu untersuchen sind in dieser Studie die jeweiligen Kompensationsmechanismen des embryonalen Myokards je nach Reifungsgrad. Die Transkription von Genen, die in die Adaptation an chronischen moderaten O<sub>2</sub>-Mangel und Hyperthermie in der kritischen embryonalen Phase involviert sind, soll im Herzen von Hühnerembryonen eingehend untersucht werden. Dabei interessiert besonders, inwieweit die Antwort auf die Stressoren die Genexpression beeinflussen bzw. sich unterscheiden. Morphologische Parameter sollen zusätzliche Informationen liefern.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Herkunft der Hühnereier

Die Spezifiziert Pathogen Freien (SPF) Valo Eier der Rasse „White Leghorn“ stammen von 20-45 Wochen alten Legehennen der Fa. Lohmann Tierzucht GmbH, die unter einem standardisierten Programm aufgezogen wurden. Die Legehennen wurden mit einem Vier-Phasen-Futter ernährt, das zur Keimreduzierung dampfbehandelt wurde und keine Fleisch-, Tiermehl- und Antibiotikazusätze enthielt.

#### 3.2. Inkubationsbedingungen

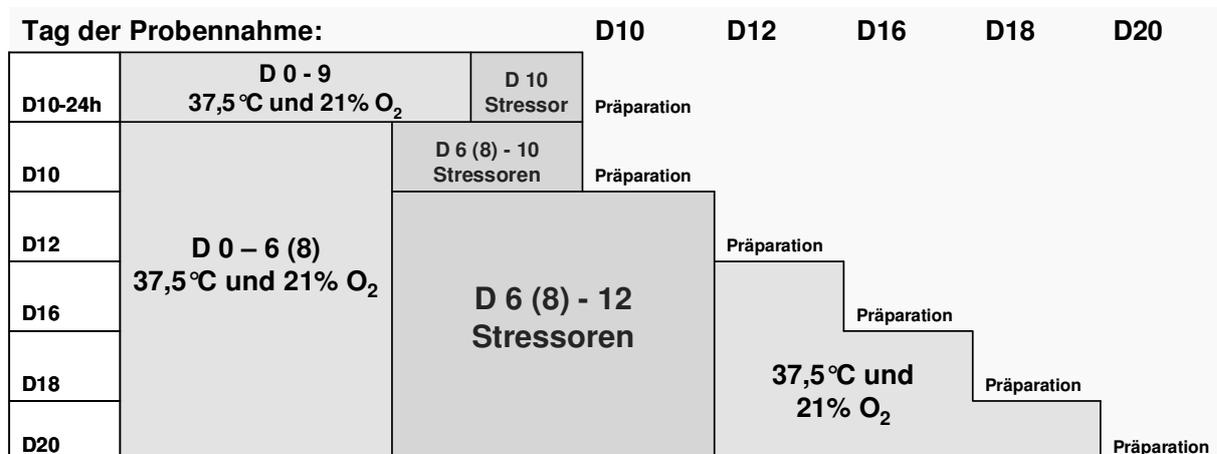
Die Bebrütung der SPF Valo Eier erfolgte in Brutschränken der Fa. Hemel mit Ventilationssystem und vollautomatischer Wendevorrichtung (S. 136).

Die Eier wurden in vier Gruppen mit unterschiedlichen Temperaturen und O<sub>2</sub>-Anteil in der Luft unterteilt (Tab. 1). Die Kontrollgruppe (G0) wurde unter 37,5°C und normoxischen Bedingungen (21% O<sub>2</sub>) bebrütet. Die Hypoxiegruppe (G1) wurde bei 37,5°C und 15% O<sub>2</sub>, die Hyperthermiegruppe (G2) bei 39,5°C und 21% O<sub>2</sub> und die Hypoxie+Hyperthermiegruppe (G3) bei 39,5 °C und 15% O<sub>2</sub> inkubiert.

	G0	G1	G2	G3
Temperatur	37,5°C	37,5°C	39,5°C	39,5°C
Sauerstoffgehalt in %	21%	15%	21%	15%

**Tab. 1: Unterteilung der Versuchsgruppen nach Temperatur und O<sub>2</sub>-Gehalt. G0=Kontrollgruppe, G1=Hypoxiegruppe, G2=Hyperthermiegruppe, G3=Hypoxie+Hyperthermiegruppe**

Am Inkubationstag (D) 10, 12, 16, 18 und 20 wurden pro Versuchsgruppe mindestens fünf Myokardproben entnommen (n=5). Pro Ei wurde eine Myokardprobe entnommen.



**Abb. 12: Unterteilung der Versuchsgruppen nach dem Tag der Probennahme**

Der Einfluss der Stressoren erfolgte in der Hypoxiegruppe zwischen D6-12 und aufgrund einer sehr geringen Überlebensrate in der Hyperthermiegruppe und der Hypoxie+Hyperthermiegruppe verkürzt auf D8-12 (S. 59). Am 10. Inkubationstag wurden Proben von Eiern genommen, die unterschiedlich lang den Stressoren ausgesetzt waren. Am D10-24h wurden die Hühnerembryonen nur für **24h** ab dem D9 den verschiedenen Stressoren ausgesetzt. Proben, die am D10 entnommen wurden, stammen von Embryonen, die ab dem D6 (Hypoxiegruppe) der Belastungsinubation ausgesetzt waren bzw. ab D8 (Hyperthermiegruppe und Hypoxie+Hyperthermiegruppe) (Abb. 12).

### **3.2.1. Temperatur**

Die Temperatur wurde anhand eines Elektronikthermostats eingestellt, durch Temperaturregler auf einem konstanten Niveau gehalten und mit Hilfe von Thermometern überprüft (Fa. TFA-Dostmann), die sich zwischen den Versuchseiern befanden.

### **3.2.2. Luftfeuchte**

Die kontinuierliche Luftfeuchte von 60% (+/- 2%) in allen Inkubatoren wurde mit Hilfe von regelmäßig befüllten Wasserbehältern und der immer gleich großen Wasseroberfläche gewährleistet.

### **3.2.3. Sauerstoffgehalt**

Die Eier wurden in einem Brutschrank (Fa. Hemel, SKR 168) mit vollautomatischer Rollenwendung, Temperaturregelung (37,5°C) und Luftfeuchtigkeitsregulierung (60%) in Raumluft (21% O<sub>2</sub>) bebrütet. Die Eier der Kontrollgruppe verblieben während der gesamten Brutzeit in diesem Inkubator. Die Eier der Behandlungsgruppen wurden in Flächenbrütern mit vollautomatischer Wendung und Elektronikthermostat (Fa. Hemel, Thermalplastik-Flächenbrüter) unter den Versuchsbedingungen inkubiert. Die Eier der Hypoxiegruppe wurden von D6-12 in einen Flächenbrüter mit 15% O<sub>2</sub> umgelegt. Die Eier der Hyperthermiegruppe wurden von D8-12 in einem Flächenbrüter mit 39,5°C und die der Hypoxie+Hyperthermiegruppe mit 15% O<sub>2</sub> und 39,5°C inkubiert. Um einen verminderten O<sub>2</sub>-Gehalt in der Inkubationsluft zu erreichen, wurde ein Gasgemisch aus 15% O<sub>2</sub> und 85% Stickstoff in die Flächenbrüter eingeleitet. Das exakte Mischungsverhältnis der beiden Gase wurde durch ein Druck-Mess-Regelgerät gewährleistet. Zusätzlich wurde die O<sub>2</sub>-Konzentration innerhalb des Inkubators in regelmäßigen Abständen mittels einer O<sub>2</sub>-Elektrode überprüft. Diese wurde mit einer O<sub>2</sub>-freien 3%igen Natriumdithionitlösung gegen die O<sub>2</sub>-Konzentration in der Umgebungsluft geeicht.

### **3.3. Gewinnung und Aufbereitung der Proben**

#### **3.3.1. Präparation der Herzen**

Die gesäuberte und mit Ethanol (70%) desinfizierte Eischale wurde über der Luftkammer eröffnet. Der Embryo wurde aus dem Ei entnommen, mittels Scherenschlag dekapitiert, der Dottersack aus dem Embryo vorverlagert und entfernt. Nach Eröffnung der Leibeshöhle wurde das Herz freigelegt, an der Basis abgesetzt und aus dem Körper entnommen. Anschließend wurde das Herz von Gefäß- und Bindegewebsresten befreit.

#### **3.3.2. Stabilisierung und Konservierung der Proben**

Zur Vermeidung von spezifischem und nicht spezifischem RNA-Abbau wurden die Hühnerembryonenherzen mit der darin befindlichen Gesamt-RNA unverzüglich nach der Präparation mit RNA-Later (S. 136) überschichtet. Für jede Probe (ca. 50 mg) wurde mindestens das zehnfache Volumen an RNA-Later verwendet. Hierbei handelt es sich um eine Flüssigkeit, die mit Enzymen angereichert ist, die den RNA-Verdau durch ubiquitär vorkommende Enzyme, sogenannten RNasen, verhindert. Diese RNasen sind nur bei Raumtemperatur aktiv. Deshalb wurden die Proben sofort auf -70°C eingefroren, um Schäden der Gesamt-RNA auszuschließen und eine unbegrenzte Haltbarkeit zu erreichen.

### **3.4. Morphologische Untersuchungen**

#### **3.4.1. Bestimmung der Körpermasse**

Die embryonalen Körper wurden zur Massenbestimmung vollständig von den restlichen sich im Ei befindenden Strukturen befreit. Der Embryo wurde mit einem Tupfer abgetrocknet. Anschließend wurden die Körperfeuchtmassen der Embryonen mit Hilfe einer digitalen Feinwaage ermittelt (S. 136).

Die relative Körpermasse wurden nach folgender Formel berechnet:

$$\text{relative Körpermasse} = \frac{\text{Embryonenmasse}}{\text{Eimasse vor der Bebrütung}}$$

Formel 1: Berechnung der relativen Körpermasse

#### **3.4.2. Bestimmung der Herzmasse**

Nach der Bestimmung der Körpermasse (s. oben) wurde das Herz des Embryos isoliert und in abgewogene Eppendorf Röhrchen mit 500µl RNA-Later verbracht. Die Masse der abgewogenen Röhrchen mitsamt den Herzen wurde mittels digitaler Feinwaage und die Herzmasse als Differenz bestimmt.

Die relative Herzmasse berechnete sich nach folgender Formel:

$$\text{relative Herzmasse} = \frac{\text{Herzmasse}}{\text{Embryonenmasse}}$$

Formel 2: Berechnung der relativen Herzmasse

### **3.4.3. Bestimmung des Massenverlusts**

Der während der Inkubationszeit auftretende Massenverlust des Hühnereis wurde durch Wiegen der Hühnereier vor und nach der Inkubation erfasst. Der Massenverlust wird durch die Differenz aus beiden Werten ermittelt:

$$\text{relativer Massenverlust} = \frac{(\text{Eimasse vor der Bebrütung} - \text{Eimasse nach der Bebrütung})}{\text{Eimasse vor der Bebrütung}}$$

Formel 3: Berechnung des relativen Massenverlusts

### **3.4.4. Bestimmung der Missbildungs- und Mortalitätsrate**

Die bebrüteten Eier wurden ab Inkubationstag D5 täglich geschickt (durchleuchtet). Nur befruchtete Eier mit lebenden Hühnerembryonen wurden in den Inkubator zurückgelegt. Abgestorbene Hühnerembryonen und unbefruchtete Eier wurden aussortiert. Die Missbildungs- bzw. Mortalitätsrate ergibt sich aus dem Verhältnis der missgebildeten zu den nicht missgebildeten bzw. den abgestorbenen zu den überlebenden Hühnerembryonen.

## **3.5. Molekulargenetische Untersuchungen**

Ziel der molekulargenetischen Untersuchungen dieser Arbeit war die Erstellung von Genexpressionsprofilen. Dabei wurde der mRNA-Gehalt der zu untersuchenden Gene (Genes of Interest, GOI) im Herzgewebe der Versuchsgruppen mit dem der Kontrollgruppe verglichen.

### **3.5.1. messenger RNA (mRNA)**

#### **3.5.1.1. Umgang mit RNA**

Aufgrund der sehr stabilen RNasen erfordert der Umgang mit RNA wesentlich mehr Sorgfalt als der Umgang mit der sehr viel stabileren DNA. Um das Einbringen von RNasen aus der Umgebung in die Probe zu verhindern, wurden stets Einweghandschuhe getragen und RNase freie Einwegmaterialien verwendet. Alle Oberflächen wurden zum Schutz mit RNase-Zap (S. 136) nach Anweisung des Herstellers behandelt.

#### **3.5.1.2. Gewebezerkleinerung und -aufarbeitung**

Der Gewinnung der RNA wurde eine Gewebezerkleinerung vorangestellt. Durchgeführt wurde dies mittels zweier in 70%igem Ethanol gereinigten rostfreien Stahlkugeln (Durchmesser 5 mm; Fa. Quiagen) in einem dafür vorgesehenen Gerät (Retschmühle; Fa.

Retsch). Um eine Kreuzkontamination bei der Probenzerkleinerung zu verhindern, wurden für jede Probe neue Kugeln verwendet. Ab Inkubationstag (D) 18 mussten die Proben erst mittels Skalpell zerkleinert werden.

Die RNA-Präparation aus der Probe erfolgte mit dem NucleoSpin® RNA Kit (Fa. Macherey&Nagel) nach dem Protokoll des Herstellers. Durch das selektive Anreicherungsverfahren über die Membran wurde bevorzugt mRNA und andere RNA länger als 200 Nukleotide gebunden bzw. kürzere selektiv entfernt (ca. 15-20% der Gesamt-RNA). Als letzter Schritt wurde die hochwertige RNA in 50 µl RNase freies Wasser eluiert und bei -70°C eingefroren bzw. in cDNA umgewandelt.

### **3.5.2. Bewertung der Gesamt-RNA**

#### **3.5.2.1. Photometrische Messung**

Die aufgearbeiteten Proben wurden im Photometer (Fa. Eppendorf) nach der Präparation auf ihren tatsächlichen Gehalt (Konzentration und Reinheit) an RNA überprüft. Hierzu wurden 50 µl jeder Probe in eine Eppendorf-Küvette pipettiert und mit einem Standard verglichen (50 µl RNase-freies Wasser). Anhand der Extinktionswerte bei definierten Wellenlängen (230 nm, 260 nm, 280 nm, 320 nm) wurde die Konzentration und Reinheit der RNA-Probe bestimmt. Die Konzentration wurde aus der Extinktion bei 260 nm berechnet. Ein Reinheitsoptimum der RNA-Präparation liegt vor, wenn maximale Extinktionswerte bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen werden können. Die Quotienten der optischen Dichte bei 260 und 280 nm wurden für alle Proben mit Werten über 1,8 errechnet. Um in jeder Probe die gleiche Konzentration an Gesamt-RNA für die Synthese der cDNA herzustellen, wurden die Proben mit gereinigtem Wasser auf exakt 100 ng/µl verdünnt. Nur RNA-Konzentrationen von 90-110 ng/µl waren für die Weiterverarbeitung zulässig. Auch Proben deren Extinktionsmaximum nicht bei 260 nm gemessen wurde, wurden aus der Analyse ausgeschlossen. Die RNA Proben wurden direkt im Anschluss bei -70°C gelagert.

#### **3.5.2.2. Qualitätsanalyse mittels miniaturisierter Kapillarelektrophorese**

Im Agilent 2100 Bioanalyser (Fa. Agilent) wurde mit dem „Reagent Kit RNA 6000 Nano“ zusätzlich sowohl die Integrität als auch die Konzentration der RNA überprüft. Diese RNA-Prüfung mittels Chip-Gelelektrophorese trennt die RNA der Länge nach auf und gibt Aufschlüsse über die Konzentration der einzelnen RNA-Anteile an der Gesamt-RNA. Anhand des entstehenden Elektropherogramms wird durch die an das Gerät angeschlossene Software (Agilent Expert 2100, Fa. Agilent) ein Maß für die RNA-Integrität (RNA Integrity Number, RIN) berechnet. Durch die hohe Sensitivität reicht 1 µl von jeder Probe. Der Aufarbeitungsprozess der Gesamt-RNA kann die Konzentration und Integrität der RNA durch die angewendeten Reinigungsprozesse in Mitleidenschaft ziehen. Bei einer RIN von 7-10

und einem bestimmten rRNA-Verhältnis von 28s/18s als Degradierungsfaktor ( $>1$ , optimal 2) wurde davon ausgegangen, dass es sich um qualitativ hochwertige RNA ohne Verunreinigungen handelt (Marx, 2004). Proben mit einer RIN  $\leq 7$  und einer 28s/18s Ratio  $< 1,5$  wurden nicht für die cDNA-Synthese verwendet.

### **3.5.3. Herstellung von cDNA („complementary“= komplementäre DNA)**

Nur Proben, die den Qualitätskontrollen standhielten, wurden mittels einer spezifischen Reversen Transkriptase des iScript-cDNA-Synthese-Kits nach Protokoll des Herstellers (Fa. Bio-Rad) zu cDNA synthetisiert (Kap. 9.5).

### **3.5.4. Konventionelle PCR (Polymerase Chain Reaction)**

Das Prinzip der PCR zur *in vitro* Amplifikation von Nukleinsäuren wurde 1985 von Mullis entwickelt (Saiki *et al.*, 1985). Es beruht auf der selektiv exponentiellen Vervielfältigung einer bestimmten DNA-Sequenz (Amplikon). Die Spezifität wird vermittelt durch zwei Oligonukleotide (Primer), die komplementär sind zu den Enden des Amplikons auf jeweils einem Strang der DNA-Matrize (Template, Target Sequence).

Die so synthetisierte DNA ist definiert durch die von den Primern vorgegebenen Enden und weist somit eine spezifische Länge auf, was eine Unterscheidung von anderen Nukleinsäuren nach Größe mittels Gelelektrophorese bzw. Schmelzkurvenanalyse ermöglicht (S. 39).

### **3.5.5. Quantitative oder Real-Time PCR (qPCR)**

Die qPCR beruht auf dem Prinzip der konventionellen PCR und ermöglicht zusätzlich eine Quantifizierung. Der große Vorteil der Methoden der quantitativen PCR im Gegensatz zur konventionellen liegt in der großen Sensitivität, die durch die exponentielle Amplifikation der Zielsequenz vor der Quantifizierung erreicht werden kann (Rawer, 2005). Während bei der konventionellen PCR die DNA-Produkte nach Beendigung aller Amplifikationszyklen durch Gelelektrophorese nachgewiesen werden, lässt die qPCR Aussagen über die DNA-Ausgangsmenge zu, da nach jedem Amplifikationszyklus der Gehalt an doppelsträngiger DNA gemessen wird (Higuchi *et al.*, 1992; Higuchi *et al.*, 1993). Bei der qPCR wird ein Thermocycler eingesetzt, der ein optisches Detektionsmodul zur Messung der Fluoreszenz von Farbstoffen (hier: SYBR Green I, Fa. Bio-Rad) enthält (Bustin, 2002). Dieser Cyanin-Farbstoff bindet ausschließlich an doppelsträngige (ds) DNA und wird als Interkalator unspezifisch in die Windungen der dsDNA eingebaut (Morrison *et al.*, 1998). Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu. Das ermöglicht, die Menge der amplifizierten DNA im Verlauf der PCR zu bestimmen und Rückschlüsse auf die Menge des exprimierten Gens in der untersuchten Probe zu ziehen (S. 45).

## Verwendete Materialien

Für die qPCR wurde der iQ™ SYBR® Green Supermix (Fa. Bio-Rad) und der Thermocycler (iCycler iQ, Fa. Bio-Rad) benutzt. Für jede zu untersuchende Probe wurde ein dreifacher Reaktionsansatz (Triplett) in eine 96-Lochplatte pipettiert. Alle Proben wurden im iCycler iQ nach dem beschriebenen Temperaturprofil behandelt (Anhang). Nach Ende jeden qPCR-Laufs erzeugt das Computerprogramm „iQ5“ (Fa. Bio-Rad), das mit dem Thermocycler und der optischen Einheit gekoppelt ist, die um die Hintergrundfluoreszenz korrigierte Amplifikations- und Schmelzkurve.

### 3.5.6. Primeretablierung

#### 3.5.6.1. Primerdesign

Mit den Oligonukleotiden, die der DNA-Polymerase als Primer dienen, wird der Replikationsstart der Polymerase festgelegt. Die spezifisch notwendigen Primer wurden, soweit keine Primer für das zu untersuchende Gen veröffentlicht waren, selbst hergestellt. Dazu wurde die mRNA-Sequenz des zu untersuchenden Gens aus dem Internet (Pubmed-Nucleotide, Ensembl) in das Programm Jellyfish importiert. Die codierenden Sequenzen (Exons) wurden herausgeschnitten und dazu verwendet, ein komplementäres Primerpaar nach folgenden Kriterien mit der Software „Primer3“ auszusuchen:

Produkt	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Länge zwischen 150 und 250 bp</li> <li>• Exon-Exon-Grenze beinhaltend (Vermeidung der Replikation genomischer DNA)</li> </ul>
Primersequenz	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Verwendung möglichst hoch konservierter Sequenzen</li> <li>• Komplementäre Sequenzen innerhalb eines Primers (→ Entstehung von Hairpins) und zwischen zwei Primern vermeiden (→ Entstehung von Primer-Dimeren (S. 40))</li> <li>• Mismatches (nicht korrekt gepaarte Nukleotide) vermeiden</li> <li>• Sequenz sollte mit G-C enden, (→ festere Bindung des Replikationsstarts an die Matrize)</li> </ul>
Länge	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ca. 20 bp</li> </ul>
GC-Gehalt	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 40-60%</li> </ul>
Tm (vereinfacht)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>=2^{\circ}\text{C} \times (\text{A}+\text{T}) + 4^{\circ}\text{C} \times (\text{C}+\text{G})</math> (<math>\triangleq</math> ca. 57-60°C)</li> </ul>

**Tab. 2: Kriterien für das Primerdesign für die quantitative qPCR; bp=Basenpaar, Tm=melting temperature, A=Adenin, C=Cytosin, G=Guanin, T=Thymin**

Die Oligonukleotide haben eine spezifische Schmelztemperatur, d.h., sie dissoziieren von der DNA-Matrize bei einer spezifischen Temperatur, die mit der Länge der Primer zunimmt.

Da in der Reaktion stets zwei Primer für einen zu vermehrenden Bereich benötigt werden, müssen die Schmelztemperaturen der beiden Oligonukleotide aufeinander abgestimmt sein. Um eine bestmögliche Funktionalität der Primer zu erreichen, wurden die mit Primer3 ausgewählten Primer mit dem Online-Programm Oligoanalyzer auf die Entstehung von "Haarnadelstruktur" (Hairpins), Selbst- und Heterodimeren überprüft. **Primer-Dimere** können entstehen, wenn die beiden verwendeten Primer intra- oder intermolekulare Homologien aufweisen. Dies kann zu einer Hybridisierung zweier Primer-Moleküle führen, bei denen ein 5'-Ende eines Primers übersteht. Dieses überstehende Ende kann die DNA-Polymerase als Template verwenden und ausgehend vom 3' Ende des anderen Primers einen neuen Strang synthetisieren.

Die so „designten“ Primer wurden von der Fa. MWG-Biotech (s. Anhang) synthetisiert und lyophilisiert geliefert. Bevor die Primer für die qPCR eingesetzt werden konnten, mussten sie jeweils für die Konzentration von 100 pmol/μl in einer nach Angaben des Herstellers bestimmten Menge RNase-freien Wassers gelöst werden. Danach wurden 20 μl Primerlösung mit 80 μl RNase-freiem Wasser verdünnt. Diese Verdünnung entspricht 20 pmol/μl und wurde für die PCR eingesetzt.

#### **3.5.6.2. Etablierung**

Um sicher zu sein, dass das Primerpaar das gewünschte Genprodukt vervielfältigt, wurde mit den Primerpaaren ein kPCR-Lauf durchgeführt. Zur Kontrolle des PCR-Ansatzes wurde zusätzlich ein schon etablierter „Housekeeper“ (Kap. 3.5.7) mitamplifiziert. Das PCR-Produkt der zu etablierenden Primer wurde mit Hilfe einer gelelektrophoretischen Trennung und einer Schmelzkurvenanalyse auf die Bildung von Primer-Dimeren geprüft und die gewünschte Länge mit der tatsächlichen Länge des PCR-Produktes verglichen. Primer-Dimere bilden ca. 50 bp lange DNA-Stränge. Damit können sie in der Gelelektrophorese vom gewünschten Produkt unterschieden werden, da sie eine Bande unterhalb der 100bp-Marke erzeugen.

#### **Agarosegelelektrophorese**

Mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese können unterschiedliche DNA-Fragmente nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Hierzu wird die zu untersuchende DNA-Lösung in die Taschen des Agarosegels pipettiert und ein elektrisches Feld angelegt. Durch die Spannung wandert die durch die Phosphatgruppen stets negativ geladene DNA in Richtung positiver Anode. Bei konstanter Feldstärke ist die Wanderungsgeschwindigkeit der Fragmente umgekehrt proportional zu ihrer Größe. Die DNA wurde durch die Zugabe von Ethidiumbromid in das Gel angefärbt und anschließend durch UV-Licht (302 nm) mit dem Chemilmager™5500 (AlphaInnotech) sichtbar gemacht. Das Ablesen der Fragmentgröße wird durch Auftragen eines geeigneten DNA-Größenstandards, der sogenannten „Ladder“ (Gemisch aus Oligonukleotiden bekannter Länge), auf eine separate Spur ermöglicht.

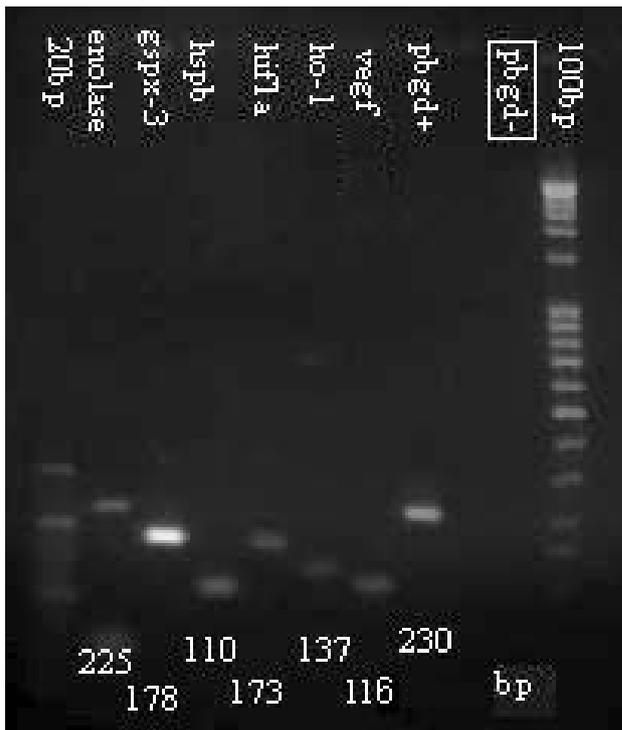


Abb. 13: Primerbanden aller Zielgene und des „Housekeeper“ nach der Gelelektrophorese.

Der Einsatz der Primer nach erfolgtem Temperaturgradienten zeigen Genproduktspezifische Banden im Agarosegel. Die Länge der Produkte kann an der außen aufgetragenen „Ladder“ abgelesen werden: am linken Rand durch die 20bp-Ladder und am rechten Rand durch die 100bp-Ladder. Die erwarteten Produktlängen der Gene sind ganz unten im Bild unter die entsprechenden Gene dazugefügt. bp=Basenpaare, enolase = Enolase 1, gspx-3 = Glutathionperoxidase, Hspb = HSP90 = Hitzeschockprotein 90, hif1a = Hypoxia Inducible Factor 1 $\alpha$ , ho-1 = Hämoxygenase1, vegf = Vascular Endothelial Growth Factor A, pbgd = Porphobilinogendesaminase, + =Positivkontrolle, - =Negativkontrolle

### Schmelzkurvenanalyse

Bei einer Schmelzkurvenanalyse wird die DNA im Thermocycler aufgeschmolzen, indem die Temperatur langsam kontinuierlich erhöht wird (50°C-95°C). Die Fluoreszenz wird ständig gemessen. Bei einer für das Fragment durch Produktlänge und Basenzusammensetzung spezifischen Schmelztemperatur denaturiert der Doppelstrang zu zwei Einzelsträngen. Dabei wird der Fluoreszenzfarbstoff freigesetzt und es kommt zu einem steilen Fluoreszenzabfall. Durch die doppelt reziproke Darstellung des Verlaufs von Temperatur und Fluoreszenz kann der Schmelzpunkt als „Peak“ einer Kurve bestimmt werden. Ohne Primer-Dimere sind annähernd identische Kurven mit einem Peak bei der gleichen Temperatur zu erwarten. Primer-Dimere erzeugen einen wesentlich kleineren Peak durch die geringere Temperatur als das gewünschte Produkt, wie in Abb. 14 zu sehen ist.

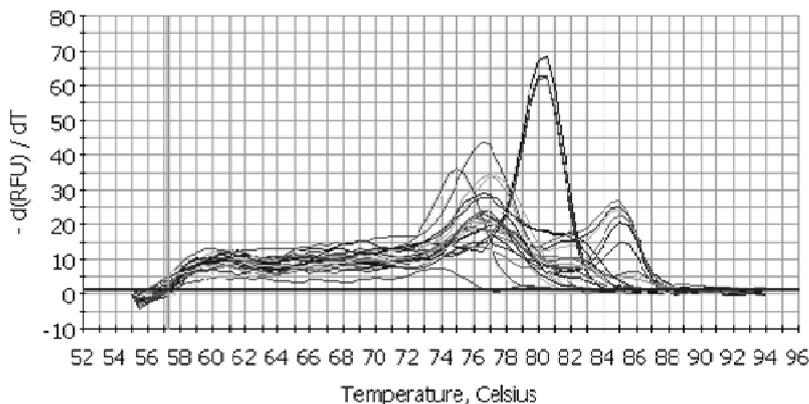


Abb. 14: Schmelzkurvenanalyse.

Zu sehen sind ein Zielgen (großer Peak bei ca. 80°C) und verschiedene Primer-Dimere (kleinere Peaks bei unterschiedlichen Temperaturen). d=delta, RFU=Relative Fluorescence Units, T=Zeit

### **Bestimmung des Temperaturoptimums**

Die optimale „Annealing“-Temperatur variiert je nach Länge der Primer und des GC-Gehalts. Je genauer die „Annealing“-Temperatur am Temperaturoptimum der Primer liegt, desto weniger kommt es zu unspezifischen Bindungen an die DNA. Somit ist ein Temperaturoptimum zur Vermeidung der Bildung von Nebenprodukten wichtig. Daher wurde zur Bestimmung des Temperaturoptimums ein qPCR-Lauf mit einem Temperaturgradienten von 53-67 °C während der Annealing-Elongationsphase durchgeführt. Jeder Ansatz wurde hierfür dreifach (Triplett) pipettiert. Eine Negativkontrolle (Wasser) wurde zur Kontrolle mitgeführt. Durch eine anschließende gelelektrophoretische Auftrennung wurden potentielle Nebenprodukte sichtbar (mehrere Banden). Bei nur einer Bande wurde das Temperaturoptimum bei der stärksten Bande festgelegt.

### **3.5.7. Referenzgene=“Housekeeper“**

„**Housekeeper**“ sind Gene, die essentiell für den Erhalt der Zellfunktion sind, ubiquitär exprimiert werden und deren Transkription nicht von experimentellen Bedingungen beeinflusst werden (Cullen *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2005). Außerdem werden sie in allen Geweben exprimiert, sind durch die Evolution hochkonserviert und dienen gewöhnlich basalen Stoffwechselfunktionen, sodass sie für einen erfolgreichen Abschluss des Zellzyklus verantwortlich sind (Foss *et al.*, 1994). Bei der relativen Quantifizierung wird die Expression der zu untersuchenden Gene (GOIs=Gene of Interest) mit der eines nicht regulierten Referenzgens normalisiert (nichtkompetitive quantitative PCR) (Kap. 3.6.2.1). Dabei werden nicht die absoluten Startkopienzahlen oder -konzentrationen bestimmt, sondern die Expression des zu untersuchenden Gens wird auf ein zweites, ubiquitär und homogen exprimiertes Gen bezogen. Der überwiegende Teil möglicher methodischer Fehler resultiert nicht aus der Messung durch die qPCR selbst, sondern durch die Probenaufbereitung der Prä-PCR (Bustin, 2000). Durch die Verwendung eines „Housekeeping-Gens“ können die globalen methodischen Fehler in der Prä-PCR ausgeglichen werden (Rawer, 2005).

#### **3.5.7.1. Etablierung der „Housekeeping-Gene“ und Primer**

In der Vorgängerarbeit von Stuhrberg (2006) wurde als „Housekeeper“ das Gen  $\beta$ -Aktin verwendet. Da die Expressionsraten von  $\beta$ -Aktin, GAPDH und anderen oft verwendeten „Housekeeper“ in einigen Geweben und bei experimentellen Manipulationen, wie z. B. unter hypoxischen Einflüssen (Zhong und Simons, 1999) oder hyperthermischen Bedingungen (Horowitz, 2003) variieren, muss davon ausgegangen werden, dass  $\beta$ -Aktin für die hier durchgeführten Experimente ungeeignet ist. Auch die Expression von GAPDH ist im Myokard vielfältig reguliert (Taegtmeier, 2000). Die mRNA-Gehalte der ausgewählten Gene wurden mittels quantitativer qPCR nach Inkubation unter chronischem O<sub>2</sub>-Mangel und/oder Temperaturerhöhung bestimmt und mit den mRNA-Gehalten der Referenzgene  $\beta$ -Aktin, 18s,

28s und Porphobilinogendesaminase (PBGD = Hydroxymethylbilane Synthase (HMBS)) verglichen. Dies erfolgte anhand des Programms geNorm.

### **geNorm**

Das geNorm VBA Programm (<http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/> (Stand: 31.03.2010)) für Microsoft Excel bestimmt das stabilste oder die stabilsten „Housekeeping-Gene“ aus einer Reihe von getesteten Genen auf einer cDNA-Probenplatte. Dazu werden sowohl Proben aus Kontrollgruppen als auch aus Versuchsgruppen (hier: Normoxie versus Hypoxie/Hyperthermie) benötigt. Für jede Versuchsgruppe wird ein Normalisierungsfaktor für die Genexpression berechnet. Dieser basiert auf dem geometrischen Mittel einer benutzerdefinierten Menge an „Housekeeping-Genen“. Das Programm berechnet dann ein Genexpressionsstabilitätsmaß  $M$  für ein „Housekeeping-Gen“ mit einer durchschnittlichen paarweisen Variation  $V$  für dieses Gen mit allen anderen getesteten Genen. Ein schrittweiser Ausschluss des Gens mit dem höchsten  $M$ -Wert erlaubt eine Rangordnung der getesteten Gene gemäß ihrer Expressionsstabilität (Vandesompele *et al.*, 2002). Unter den gegebenen Versuchsbedingungen stellte sich PBGD als stabilster „Housekeeper“ heraus (Dittmann und Tönhardt, 2008).

### **3.5.8. Kontrollen**

Für die Qualitätssicherung jedes PCR-Laufs wurden auf jede 96-Well-Platte für jedes untersuchte Gen sowohl eine Negativkontrolle (No Template Control, NTC) als auch eine Positivkontrolle im Dreifachansatz pipettiert.

Die **Negativkontrolle** diente der Überprüfung der qPCR-Spezifität. Als Negativkontrolle fungierte ein PCR-Ansatz ohne Template (No Template Control, NTC), also mit Wasser anstatt Template.

Als **Positivkontrolle** wurde eine Kalibrator-Probe aus gepoolter cDNA verwendet. Dieser externe Standard wurde bei der relativen Quantifizierung dazu verwendet, um die quantitative Aussage verschiedener Versuche miteinander vergleichen zu können. Die *Kalibrator-Probe* stellt meist eine cDNA dar, die Ziel- und „Housekeeping-Gen“ in konstanter, jedoch nicht notwendigerweise bekannter Konzentration enthält. Nicht zu verwechseln mit diesem externen Standard, ist das „Housekeeping-Gen“ als endogener Standard. Dieses stellt ein in der jeweiligen Probe zu quantifizierendes Gen dar, das dem Ausgleich globaler Fehlerquellen in der Prä-PCR dient (Rawer, 2005). Bei dieser Studie wurde der Kalibrator als großer Pool verschiedener cDNAs generiert. Hierzu wurden Fragmente von fünf besonders großen Myokardbiopsien verwendet. Die RNA wurde isoliert und revers transkribiert. Die gewonnene cDNA aller fünf Biopsien wurde in einem großen Gefäß gepoolt und anschließend in Aliquote von 20  $\mu$ l bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Der Kalibrator wurde in jedem System

gleichartiger Reaktionen mitamplifiziert. Der Kalibrator wurde also neben den zu untersuchenden Proben auf jeder 96-Well-Platte für jedes untersuchte Gen mitpipettiert.

Beim **RNA-Kontrolllauf** wurde 1 µl RNA (100 ng/µl) anstatt DNA als Template verwendet (=RT-Proben). Damit wurde die RNA-Probe auf Verunreinigungen mit genomischer DNA überprüft. Bei kompletter Reinheit der RNA-Proben ergeben sich identische Kurven für Negativ- und RNA-Kontrollen, da DNA für eine Amplifikation in diesem Ansatz fehlt.

### **3.6. Auswertung**

#### **3.6.1. Auswertung der morphologischen Untersuchungen**

Die Auswertung erfolgte anhand des Programms SPSS 16.0. Zur Auswertung der Entwicklung von Körper- und Herzmassen sowie des Massenverlusts wurde die relative Masse bzw. der relative Massenverlust gebildet (Formel 1, Formel 2 und Formel 3). Zur statistischen Auswertung wurde zuerst der Kruskal-Wallis-Test, und bei p-Werten < 0,05 anschließend der Mann-Whitney-U-Test herangezogen. Da diese Arbeit einen rein deskriptiven Charakter hat, wurde auf die Korrektur des  $\alpha$ -Niveaus verzichtet. Das Signifikanzniveau wurde auf  $\alpha=5\%$  festgelegt und mit  $p < 0,05$  angegeben.

#### **3.6.2. Auswertung der molekulargenetischen Untersuchungen**

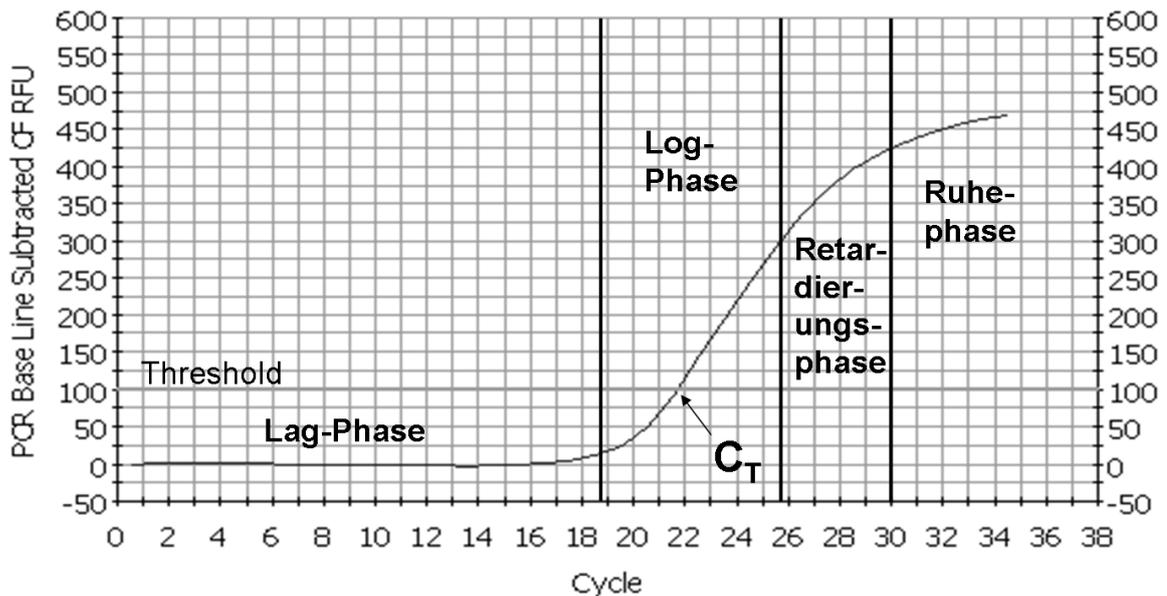
##### **3.6.2.1. Relative Quantifizierung**

Ziel der Relativen Quantifizierung mittels  $\Delta\Delta C_T$ -Methode (S. 49) ist es, ohne Umweg über eine absolute Quantifizierung eine Aussage über das Verhältnis der Genexpression von Zielgen (GOI) zu „Housekeeping-Gen“ (HK) (Kap. 3.5.7) zu treffen (=Normalisierung). Die Vorteile der Normalisierung liegen in der Reduzierung der Varianz der Expressionsergebnisse, da Gewebe- und Matrixeffekte, unterschiedliche RNA-Extraktionseffizienzen sowie Fehler bei der Reversen Transkription (RT) innerhalb einer experimentellen Probe gleichermaßen das zu untersuchende als auch das „Housekeeping-Gen“ betreffen (Pfaffl, 2004).

##### **3.6.2.2. PCR-Kinetik**

1992 führten Higuchi *et al.* mit der qPCR ein Verfahren auf Grundlage des kinetischen Ansatzes ein, das den Verlauf der Reaktion kontinuierlich, z. B. mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green, messen kann. Die PCR besteht aus vier unterschiedlichen kinetischen Phasen (Freeman *et al.*, 1999; Scheffe *et al.*, 2006; Wilhelm und Pingoud, 2003), die eine sigmoide Amplifikationskurve bilden (Abb. 15). Sie startet mit der **lag-Phase** (Verzögerungsphase), in der die exponentielle Amplifikation im Reaktionsansatz schon stattfindet, aber die Fluoreszenz noch nicht die Hintergrundfluoreszenz überschreitet. Als zweite Phase folgt die

**log-Phase** (logarithmisch), in der das exponentielle Wachstum des PCR-Produkts - idealerweise verdoppelt es sich - als Fluoreszenzsignal messbar ist. In der dritten und sogenannten **Retardierungsphase** führen die Anhäufung von PCR hemmenden Faktoren und das Fehlen von Enzym und Substrat zu einer Verlangsamung der Reaktion. In der letzten bzw. **Ruhephase** („stationary phase“) kommt es zum Erliegen der Reaktion (Pannetier *et al.*, 1993; Schefe *et al.*, 2006). Für die qPCR Datenanalyse ist die log-Phase entscheidend (Abb. 15).



**Abb. 15: PCR-Kinetik der sigmoidalen Amplifikationskurve angelehnt an Pfaffl (2004)**

### **C<sub>T</sub>-Wert**

Als Maß für die Quantifizierung der Startmenge werden in der qPCR die sog. C<sub>T</sub> (=Cycle Threshold) -Werte herangezogen. Nach Anregung mit Licht entsprechender Wellenlänge (497 nm) fluoresziert der DNA-Farbstoff SYBR Green in gebundenem Zustand bei einer Emissionswellenlänge von 520 nm (Higuchi *et al.*, 1992; Higuchi *et al.*, 1993). Nach Beendigung des gesamten qPCR-Laufs ergibt die Aneinanderreihung der einzelnen photometrischen Fluoreszenzwerte eine Amplifikationskurve (Abb. 15). Vom Benutzer wird ein bestimmter Wert als sogenannter „Threshold“ (Hintergrundfluoreszenz) festgelegt. Der Zeitpunkt, ausgedrückt in Zyklen, bei dem die Amplifikationskurve den „Threshold“ überschreitet wird als C<sub>T</sub> bezeichnet. Hier wurde der C<sub>T</sub> auf einen Wert von 100 RFU (Relative Fluorescence Units) festgelegt. Der C<sub>T</sub> -Wert ist ein Maß für die Anzahl der Startkopien in der entsprechenden Reaktion. Im Falle einer 100%igen Effizienz der PCR verdoppeln sich mit jedem Zyklus die DNA-Produktmenge und analog dazu das Fluoreszenzsignal des DNA-Farbstoffes SYBR Green. Je stärker ein Gen exprimiert wird, desto kleiner ist also der C<sub>T</sub>-Wert und umgekehrt. Da SYBR Green unspezifisch an doppelsträngige DNA bindet, erfolgt nach jedem qPCR-Lauf eine Schmelzkurvenanalyse, um

zwischen Artefakten, Primer-Dimeren und dem gewünschtem Produkt zu unterscheiden (S. 41). Die Kurven eines Triplets verlaufen im Idealfall identisch.

### 3.6.2.3. **Effizienz (E)**

Die PCR-Effizienz ist für die präzise Quantifizierung von Bedeutung und charakterisiert den Anteil an cDNA, welcher während der Annealing- und Elongationsphase verdoppelt wird. Bei einer Effizienz von 100% findet pro Zyklus eine Verdoppelung der Menge an PCR-Produkt statt. Nach 3,333 Zyklen liegt bei einer hundertprozentigen Effizienz eine Verzehnfachung der Ausgangsmenge vor. Die Effizienz wird durch Variablen wie Amplikonlänge, Sekundärstruktur und Primerqualität beeinflusst und sollte für die Primerkombinationen der Ziel- und Referenzsequenzen annähernd gleich sein (Pfaffl, 2001).

$$\text{Effizienz} = 10^{\left(-\frac{1}{\text{Steigung}}\right)}$$

Formel 4: Gleichung für die PCR-Effizienz (Pfaffl, 2004)

Die theoretisch optimale Effizienz von 100% entspricht nicht der Realität. Tatsächlich wurde in empirischen Untersuchungen eine Effizienz von 0,6 bis 0,9 (65-90%) festgestellt (Tichopad *et al.*, 2003). Mögliche systematische und zufällige Fehlerquellen, die die PCR-Effizienz beeinflussen sind die Sequenzen von Template und Primer, die Auswahl und Konzentrationen der Reaktionspartner und der Pufferverhältnisse, die Anwesenheit von PCR-Inhibitoren, Pipettierfehler, das Template (mRNA- bzw. cDNA-Qualität) sowie die Position der Reaktion im Thermocycler (Reischl und Kochanowski, 1999).

Neben den grundsätzlichen Fragen zur Validität eines „Housekeeping-Gens“ besteht bei dieser nichtkompetitiven qPCR (=„Housekeeper“ und Target-Gen sind nicht identisch) das Problem darin, dass es sich äußerst schwierig gestaltet, die PCR-Effizienzen von „Housekeeping“- und Zielgen gleich zu halten, insbesondere beim Eintritt in die Retardierungsphase. Um dennoch eine Aussage machen zu können, sollte vor Ende der exponentiellen Phase gemessen werden (Mallet, 1999).

#### **Optimale (aber nicht realistische) Effizienz:**

Nur bei einer Effizienz von 100% kann von der Basis=2 ausgegangen werden. Ausgehend von dem Prinzip der PCR-Methode, dass sich je Zyklus die Anzahl der Kopien verdoppeln soll, gilt mathematisch die Formel 5:

$$N_{(C_T)} = N_{(0)\text{Anfang}} \cdot 2^{-n}$$

Formel 5: Allgemeine Formel für die Berechnung der exponentiellen Konzentrationsänderung mit der optimalen Effizienz von 100%; N(CT) = Anzahl der Kopien beim CT; N(0) = Anzahl Kopien am Anfang, ohne Konzentrationsangabe = 1; bei optimaler Basis = 2, also einer Effizienz von 100%; n = Zyklus des dazugehörigen Fluoreszenzwertes

**Korrigierte Effizienz:**

Die reale Effizienz ist von internen Schwankungen betroffen, z. B. je nach Farbstoffintensität, Spannungsschwankungen etc. von Platte zu Platte. Daher wird sie korrigiert als 1+E beschrieben. Wenn Formel 5 zur Basis umgestellt wird, ergibt sich folgendes:

$$\frac{N_{c_T}}{N_0} = (1 + E)^{-n} \Rightarrow \log \frac{N_{c_T}}{N_0} = \log(1 + E) \cdot -n \Rightarrow \frac{\log \frac{N_{c_T}}{N_0}}{-n} = \log(1 + E)$$

$$(1 + E) = 10^{\frac{\log \frac{N_{c_T}}{N_0}}{-n}}$$

Formel 6: Formel 4 aufgelöst nach (1+E). Korrigierte Effizienz modifiziert nach Schefe et al. (2006)

**Schätzung der realen Effizienz**

Die Effizienz kann auf verschiedene Arten berechnet werden, die sich in ihrem Ergebnis leicht unterscheiden.

Standardkurve

Die einfachste aber auch ungenaueste Art die reale Effizienz zu berechnen, ist das Erstellen einer Standardkurve mittels Verdünnungsreihe für jedes verwendete Primerpaar. Die Effizienz (E) kann mit Hilfe der Steigung (m) der Standardkurve berechnet werden. Ausgehend von einer Konzentration von 1 ng/µl cDNA wird eine 6-stufige Verdünnungsreihe mit einem Verdünnungsfaktor von 10<sup>-1</sup> erstellt und jeweils als Dreifachansatz (Triplett) mit Negativkontrollen in einem qPCR-Experiment eingesetzt. Nach der Amplifikation werden die Ausgangsmengen an cDNA in einer logarithmischen Funktion als Regressionsgeraden gegen den C<sub>T</sub>-Wert dargestellt. Die Steigung der Regressionsgeraden gilt als ein Indikator für die Amplifikationseffizienz. Für die qPCR ist diese Methode der Berechnung der Effizienz nicht exakt genug, da sie nicht auf probenindividuelle Unterschiede eingeht und die eigentliche Effizienz überschätzt, oft bis 2,2 (Pfaffl, 2004).

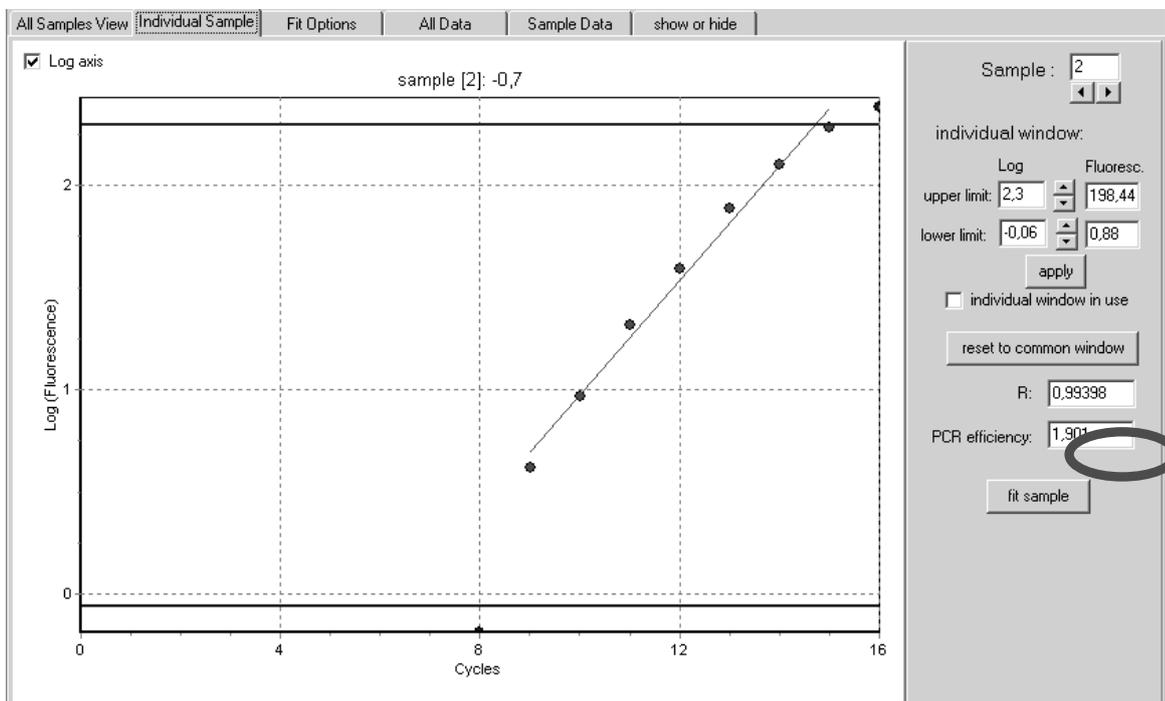
Effizienz per Well

Die genaueste Methode der Effizienzberechnung basiert auf einer Berechnung der Effizienz anhand eines exponentiellen Modells, das der PCR-Kinetik am besten entspricht (Tichopad *et al.*, 2003). Das gesamte Berechnungsschema setzt sich aus mehreren Schritten zusammen: Als erstes wird die Hintergrundfluoreszenz anhand einer linearen Regression bestimmt. Mittels eines „standardized residual“ Algorithmus werden die Fluoreszenzpunkte gesucht, die nicht mehr auf dem leicht steigenden linearen Trend der Hintergrundfluoreszenz liegen. Diese C<sub>T</sub>s verhalten sich entsprechend einer exponentiellen PCR-Funktion. Nun sucht man die C<sub>T</sub>s, die nicht mehr dem exponentiellen Verhalten der PCR-Reaktion

entsprechen. Ab diesem  $C_T$  nimmt die Fluoreszenz nicht mehr im exponentiellen Trend zu. Damit bildet er den letzten Datenpunkt im exponentiellen PCR-Modell. Im Allgemeinen werden 6-10  $C_T$ s zur Berechnung der Effizienz herangezogen. Das Modell zeigt Effizienzen von 1,65 bis 1,90 und im Vergleich mit anderen Effizienzberechnungsmodellen die geringste Varianz und höchste Genauigkeit (Pfaffl, 2004; Tichopad *et al.*, 2003).

### LinRegPCR

Das **LinRegPCR-Programm** (Ramakers *et al.*, 2003; Ruijter und Ramakers, 2003) ist eine Software, die aus den Fluoreszenzrohdaten der Real-Time-Plattform eine Regressionsgerade erstellt. Aus dieser wird die Effizienz innerhalb einer einzelnen experimentellen Probe berechnet und dann in eine neue Effizienz-korrigierte Quantifizierungs- und Statistiksoftware („FC-Wolf“) mit einbezogen. Hierfür werden die vom iCycler generierten Daten in das am Institut entworfenen Excel-Programm „FC\_Wolf“ kopiert. Dazu werden die Fluoreszenzen der einzelnen Zyklen aus dem iCycler benötigt. Zusätzlich werden genaue Identifikationsdaten und die einzelnen  $C_T$ -Werte der Triplets hineinkopiert. Das Programm ist mit dem LinRegPCR Programm verknüpft. Über das LinRegPCR-Programm können die Excel-Tabellen eingelesen werden. Um die einzelnen Daten zu überprüfen und ggf. zu ändern, wird die Registerkarte „Individual Sample“ aktiviert (Abb. 16).



**Abb. 16: Effizienz per Well mit dem LinRegPCR-Programm**

Für jedes Well müssen die Daten für eine aussagekräftige Analyse gleich bearbeitet werden. Die Daten für die Kurve werden immer 2 Zyklen über dem  $C_T$ -Wert beendet und es werden immer Fluoreszenzwerte von mindestens 6 Zyklen in die Berechnung mit einbezogen. Das

Programm errechnet aus der Steigung der Fluoreszenzkurve in der linearen Phase die Effizienz für jedes einzelne Well. Entspricht die Fluoreszenzkurve nicht den obengenannten Kriterien muss der PCR-Lauf wiederholt werden.

Der **Regressionskoeffizient (R)** ist ein Maß für die Abweichung der einzelnen Fluoreszenzrohdaten von der Regressionsgeraden, die in der exponentiellen Phase der Kurven idealerweise durch die Punkte der Fluoreszenzrohdaten gelegt wird. Sie berechnet sich aus den Zyklen (x) und den logarithmierten Fluoreszenzrohdaten (y).

$$r^2 = \left[ \frac{\sum(x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum(x_i - \bar{x})^2} \cdot \sqrt{\sum(y_i - \bar{y})^2}} \right]^2$$

Formel 7: Regressionskoeffizient

Anhand des Regressionskoeffizienten kann abgelesen werden, wie nahe die Fluoreszenzdaten an der Regressionsgeraden liegen. Optimal wäre ein Wert von 1. Aus den so berechneten Werten der realen Effizienz wird das geometrische Mittel gebildet.

$$G = \sqrt[n]{x_1 \cdot x_2 \cdot x_3 \dots x_n}$$

Formel 8: Geometrisches Mittel der Effizienzen pro GOI und HK

#### **3.6.2.4. Genexpressionsprofile**

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Definition der verwendeten Proben und C<sub>T</sub>-Werte folgende Nomenklatur verwendet: Als GOI wird das zu untersuchende Gen/Zielgen („Gene of Interest“) bezeichnet. Die Referenz (HK=Housekeeper) stellt das „Housekeeping-Gen“ PBGD dar. Die experimentell beeinflusste Probe, bei welcher die Abweichung der Expressionsrate des GOI gemessen werden soll, wird als Testprobe (Test) bezeichnet. Die experimentell unbeeinflusste Probe im Bezug zur Testprobe, wird als Kontrolle bezeichnet.

#### **„Fold Change“ (FC)**

Das Ergebnis wird als „Fold Change“ (FC) ausgedrückt und beschreibt die normalisierte Expressionsrate des GOI in der Testprobe (Test) als Vielfaches der normalisierten Expressionsrate des GOI in der Kontrollgruppe (Kontrolle). Die Berechnung des Expressionsunterschieds („Fold Change“) erfolgte in dieser Arbeit über die sog. „Gene Expression’s C<sub>T</sub> Difference“ (GED) –Methode, einer Effizienz-korrigierten ΔΔC<sub>T</sub>-Methode.

#### **ΔΔC<sub>T</sub>-Methode**

Die gemittelten C<sub>T</sub>-Werte einer Probe werden zur Bestimmung der Expressionsrate des GOI mit Hilfe der ΔC<sub>T</sub>-Methode zur relativen Quantifizierung untersucht (Livak und Schmittgen, 2001). Bei diesem Berechnungsschema wird der gemittelte C<sub>T</sub>-Wert des GOI jeder Probe gegen den gemittelten C<sub>T</sub>-Wert des Referenzgens normalisiert.

$$\Delta C_T = C_T GOI - C_T HK$$

Formel 9: Berechnung von  $\Delta C_T$  (Pfaffl, 2004)

Für eine relative Quantifizierung müssen die  $C_T$ -Werte des „Gene of Interest“ (GOI) und des „Housekeeper“ (HK) in der Test- und Kontrollgruppe bekannt sein. Der Expressionsunterschied des GOI in Basis- und Testprobe, normalisiert gegen das Referenzgen (HK), wird in der  $\Delta\Delta C_T$ -Methode mittels folgender Formel berechnet:

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T Test - \Delta C_T Kontrolle$$

Formel 10: Berechnung von  $\Delta\Delta C_T$  (Pfaffl, 2004)

Das  $\Delta\Delta C_T$ -Modell basiert auf dem relativen Quantifizierungsmodell entwickelt von Pfaffl (2001). Damit errechnet sich der FC folgendermaßen:

$$FC = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

Formel 11: Berechnung des „Fold Change“ (FC) (Pfaffl, 2004)

Dieses Berechnungsschema setzt eine Verdoppelung der DNA-Menge in jedem Zyklus voraus (Basis=2). Die „wahre“ **Real-Time PCR-Effizienz** dürfte sich unter optimierten Reaktionsbedingungen im Bereich von 1,7 bis 1,9 bewegen und weist Schwankungsbreiten von 1,5 bis über 2,0 auf (Pfaffl, 2004).

### GED (Gene Expression's $C_T$ Difference)

Diese Berechnungsformel ist eine neue Form der relativen Quantifizierung der qPCR-Daten. Die GED-Methode mit der „wahren“ Real-Time PCR-Effizienz wird nach neuesten Erkenntnissen anhand der Fluoreszenz per Well ermittelt (Scheffe *et al.*, 2006). Die Effizienzen werden für alle Wells mit dem Programm LinRegPCR (Ramakers *et al.*, 2003) einzeln bestimmt und dann gemittelt. Geringste Schwankungen in den Effizienzen von Zielgen zu Referenzgen führen zu enormen Unterschieden in den Expressionsraten (Scheffe *et al.*, 2006). Durch die optimierte Effizienz-korrigierte relative Quantifizierung mit dem LinRegPCR Programm, wird den stark variierenden qPCR-Effizienzen Rechnung getragen. Die GED-Methode ist also die Effizienz-korrigierte  $\Delta\Delta C_T$ -Methode.

$$GED = \frac{[1 + E_{HK\_Test}]^{C_T^{HK\_Test}} \cdot [1 + E_{HK\_Kontrolle}]^{-C_T^{HK\_Kontrolle}}}{[1 + E_{GOI\_Test}]^{C_T^{GOI\_Test}} \cdot [1 + E_{GOI\_Kontrolle}]^{-C_T^{GOI\_Kontrolle}}}$$

Formel 12: Berechnung der Gene Expression's CT Difference (GED) (Scheffe *et al.*, 2006)

Dazu werden die mit dem LinRegPCR Programm ermittelten Effizienzen gemittelt (geometrisches Mittel). Um den enormen Schwankungen durch geringe

Effizienzunterschiede Rechnung zu tragen, müssen für aussagekräftige Analysen Ausreißer aus der Berechnung ausgeschlossen werden oder der PCR-Lauf wiederholt werden. Um mit gemittelten Effizienzen zu arbeiten, müssen die Effizienzen (E) innerhalb eines 95%-Konfidenzintervalls mit einem Mittelwert der Effizienzen von  $E \pm 0,039$  und einer Standardabweichung  $\leq 0,02$  liegen (Bar *et al.*, 2003; Scheffe *et al.*, 2006). Die Standardabweichung der Effizienzen sollte nicht größer als  $\pm 0,039$  sein.

#### **Auswertung der $\Delta C_T$ - und FC-Werte**

Für die Effizienz-korrigierte  $\Delta\Delta C_T$ -Methode wurden die Effizienzen per Well zur Berechnung verwendet. Die Effizienzen per Well aller GOIs und aller HKs je Platte wurden zur sichereren Berechnung des FC-Werts gemittelt und als eine Effizienz betrachtet. Die Differenz der  $C_T$  Werte ( $\Delta\Delta C_T$ ) ergibt als negativer Exponent den FC-Wert.

Ein FC-Wert von 1 bedeutet beispielsweise, dass sich die Genexpression im Vergleich zur Kontrollgruppe verdoppelte. FC-Werte  $>1$  und  $<-1$  wurden als Hoch- (FC $>1$ ) bzw. Herunterregulation (FC $<-1$ ) der Genexpression gegenüber der Kontrollgruppe bezeichnet.

#### **Erstellung der Genexpressionsprofile**

Die mRNA Level der ausgewählten Gene HIF1 $\alpha$ , VEGFA, ENO1, HO1, GPx-3 und HSP90 wurden an den Tagen D10-24h, D10, D12, D16, D18 und D20 mittels quantitativer qPCR nach Inkubation unter chronischem O<sub>2</sub>-Mangel und/oder Temperaturerhöhung bestimmt und gegen die Porphobilinogendesaminase (PBGD) normalisiert. Um die FC-Werte (n=5) der Hypoxiegruppe, Hyperthermiegruppe und Hypoxie+Hyperthermiegruppe mit der Kontrollgruppe zu vergleichen, wurde der Median aller FC-Werte verwendet. Das geometrische Mittel der FC-Werte konnte aufgrund der teilweise negativen Werte nicht gebildet werden. Das arithmetische Mittel wurde ebenso wie die Standardabweichung der FC-Werte berechnet und im Anhang zur Vollständigkeit angegeben (Kap. 9.8.5).

Um die einzelnen Versuchsgruppen untereinander zu vergleichen, wurden sie einer Varianzanalyse unterzogen. Zur statistischen Auswertung wurde zuerst der Kruskal-Wallis-Test, und bei p-Werten  $< 0,05$  anschließend der Mann-Whitney-U-Test herangezogen. Da diese Arbeit einen rein deskriptiven Charakter hat, wurde auf die Korrektur des  $\alpha$ -Niveaus verzichtet. Das Signifikanzniveau wurde auf  $\alpha=5\%$  festgelegt und mit  $p < 0,05$  angegeben. Diese Auswertung der FC-Werte innerhalb der Versuchsgruppen erfolgte mit Hilfe des Programmes SPSS 16.0.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Morphologische Untersuchungen

Die Eimassen vor und nach der Inkubation und die Embryonen- und Herzmassen variierten stark innerhalb einer Gruppe und eines Tages. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde zusätzlich der Massenverlust bestimmt und die relative Masse zur Beurteilung herangezogen (Kap. 3.6.1).

#### Darstellung der Ergebnisse

##### Boxplots

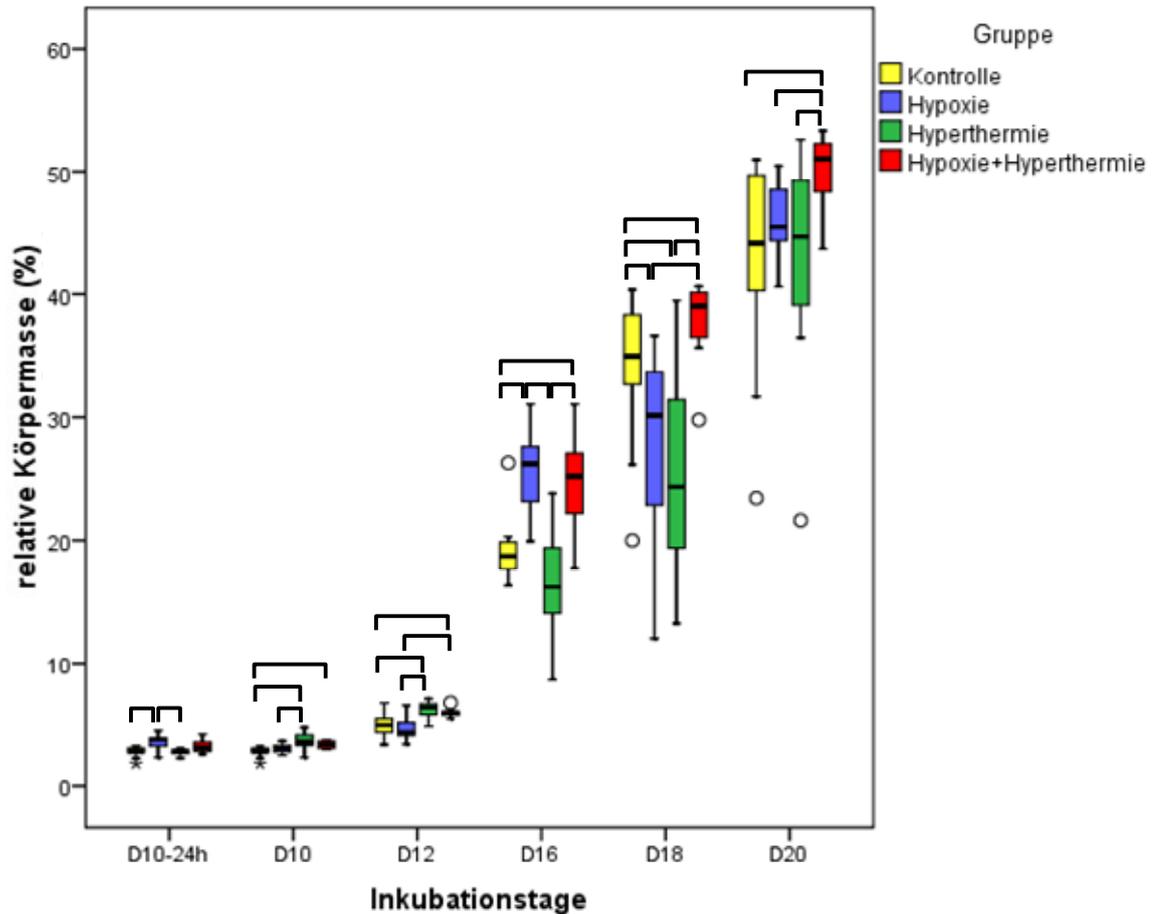
Die schwarze horizontale Linie innerhalb der farbigen Fläche eines Boxplots markiert die Lage des Medians. Die untere Grenze kennzeichnet das 25%-Perzentil, die obere das 75%-Perzentil. Die dünnen Querstriche ober- und unterhalb der Box geben den größten bzw. den kleinsten Wert der jeweiligen Stichprobe an. Ausreißer sind Werte, die zwischen dem 1,5fachen und 3fachen über den farbigen Boxen liegen. Extremwerte liegen mehr als 3fach höher bzw. tiefer als die Boxen. Ausreißer (o) und Extremwerte (\*) sind in der Graphik als solche gekennzeichnet.

##### Statistische Unterschiede der relativen Massen

Zur statistischen Auswertung wurde der Mann-Whitney-U-Test herangezogen. Als signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen gelten p-Werte  $< 0,05$ . In den Diagrammen sind diese entsprechend zwischen den Versuchsgruppen als horizontale schwarze Balken gekennzeichnet.

#### 4.1.1. Relative Körpermasse

Sowohl die absoluten als auch die relativen Körpermassen der wachsenden Hühnerembryonen stiegen altersabhängig an, d.h., der Hühnerembryo wurde während der Inkubationsperiode relativ zum Ei größer. An den Inkubationstagen D10-24h, D10 und D12 wichen die relativen Körpermassen nicht so stark voneinander ab wie an den Tagen D16, D18 und D20 (Abb. 17 und Abb. 18).

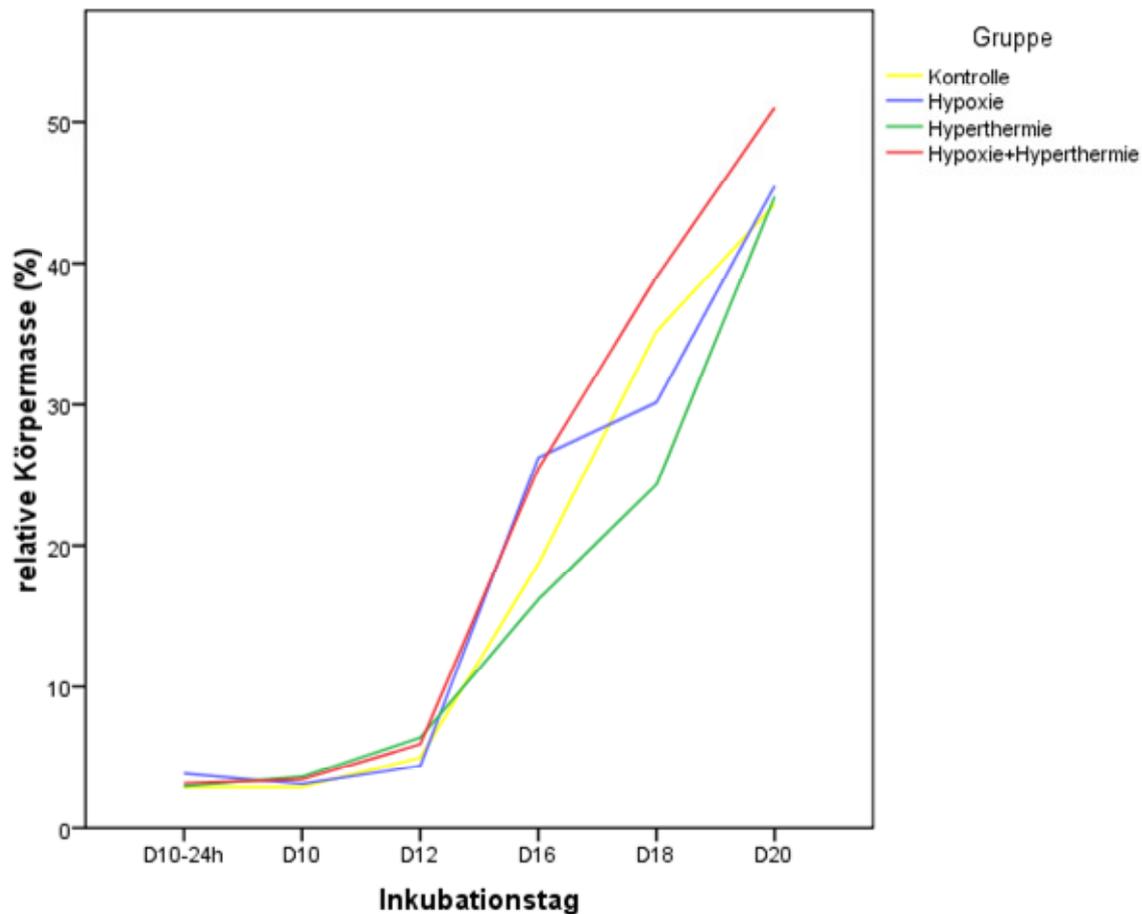


**Abb. 17: Relative Körpermassen der Kontroll- und Versuchsgruppen der Hühnerembryonen zu den unterschiedlichen Inkubationstagen. Die schwarzen Querbalken signalisieren signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den verschiedenen Gruppen.**

Die relativen Körpermassen der **HYPOXIEGRUPPE** waren am D10-24h signifikant höher ( $p < 0,05$ ) als die der Kontrollgruppe und der Hyperthermiegruppe. Am D10 lagen die Embryonenmassen signifikant unter der Hyperthermiegruppe aber wichen nicht signifikant von der Kontrollgruppe oder der Hypoxie+Hyperthermiegruppe ab. Am D12 lagen die Embryonenmassen der Hypoxiegruppe unter allen anderen Gruppen, gegenüber der Hyperthermiegruppe und der Hypoxie+Hyperthermiegruppe waren die Unterschiede signifikant. Die relativen Körpermassen der Hypoxiegruppe nahmen bis D16 zu und bildeten hier die Gruppe mit den höchsten relativen Körpermassen im Vergleich zu allen anderen Gruppen. Bis am D18 nahmen die relativen Körpermassen signifikant ab und fielen unter das Niveau der Kontrollgruppe und der Hypoxie+Hyperthermiegruppe. Am letzten Tag der Untersuchungen (D20) waren die relativen Körpermassen weiterhin unter denen der Hypoxie+Hyperthermiegruppe, aber gleich schwer wie diejenigen der Kontrollgruppe und der Hyperthermiegruppe.

Bezüglich der relativen Körpermassen unterschied sich die **HYPERTHERMIEGRUPPE** am D10-24h signifikant von der Hypoxiegruppe, in der die Embryonenmassen schwerer waren. An

D10 und D12 wogen die Embryonen der Hyperthermiegruppe mehr als die der Kontroll- und Hypoxiegruppe ( $p < 0,05$ ). Die relativen Körpermassen der Hyperthermiegruppe sanken am D16 signifikant unter die Werte der Hypoxiegruppe und der Hypoxie+Hyperthermiegruppe. Am D18 lagen sie unter der Kontrollgruppe und der Hypoxie+Hyperthermiegruppe ( $p < 0,05$ ). Die Embryonen der Hyperthermiegruppe nahmen bis D20 an Körpermasse zu, wogen jedoch signifikant weniger als die Embryonen der Hypoxie+Hyperthermiegruppe.



**Abb. 18:** Die Mediane der relativen Körpermassen der Kontroll- und Versuchsgruppen der Hühnereier vom Beginn der Inkubation bis zu den unterschiedlichen Inkubationstagen. Da die Messungen nur an den dargestellten Inkubationstagen stattfand, soll kein Verlauf dargestellt werden, sondern der Unterschied zwischen den Gruppen veranschaulicht werden.

Die **HYPOXIE+HYPERTHERMIEGRUPPE** wies erst ab D10 signifikante Unterschiede in den relativen Massen der Hühnerembryonen im Vergleich zur Kontrollgruppe auf. Diese Abweichung nach oben gegenüber der Kontrollgruppe blieb an allen Tagen erhalten. Die Hypoxie+Hyperthermiegruppe wies an den Tagen D12, D18 und D20 signifikant höhere relative Körpermassen auf als die Hypoxiegruppe ( $p < 0,05$ ). Die relativen Massen der Embryonen in der Hypoxie+Hyperthermiegruppe erzielten im Vergleich zur Hyperthermiegruppe an den Tagen D16, D18 und D20 signifikant höhere Messergebnisse im Gegensatz zu D10-24h, D10 und D12, an denen die Körpermassen nicht signifikant von der Hyperthermiegruppe divergierten.

#### 4.1.2. Relative Herzmasse

Die absoluten Herzmassen stiegen wie die Embryonenmassen altersabhängig an. Die relativen Herzmassen sanken jedoch, da ihr Anteil relativ zur Gesamtkörpermasse mit dem Alter abnimmt (Abb. 19 und Abb. 20).

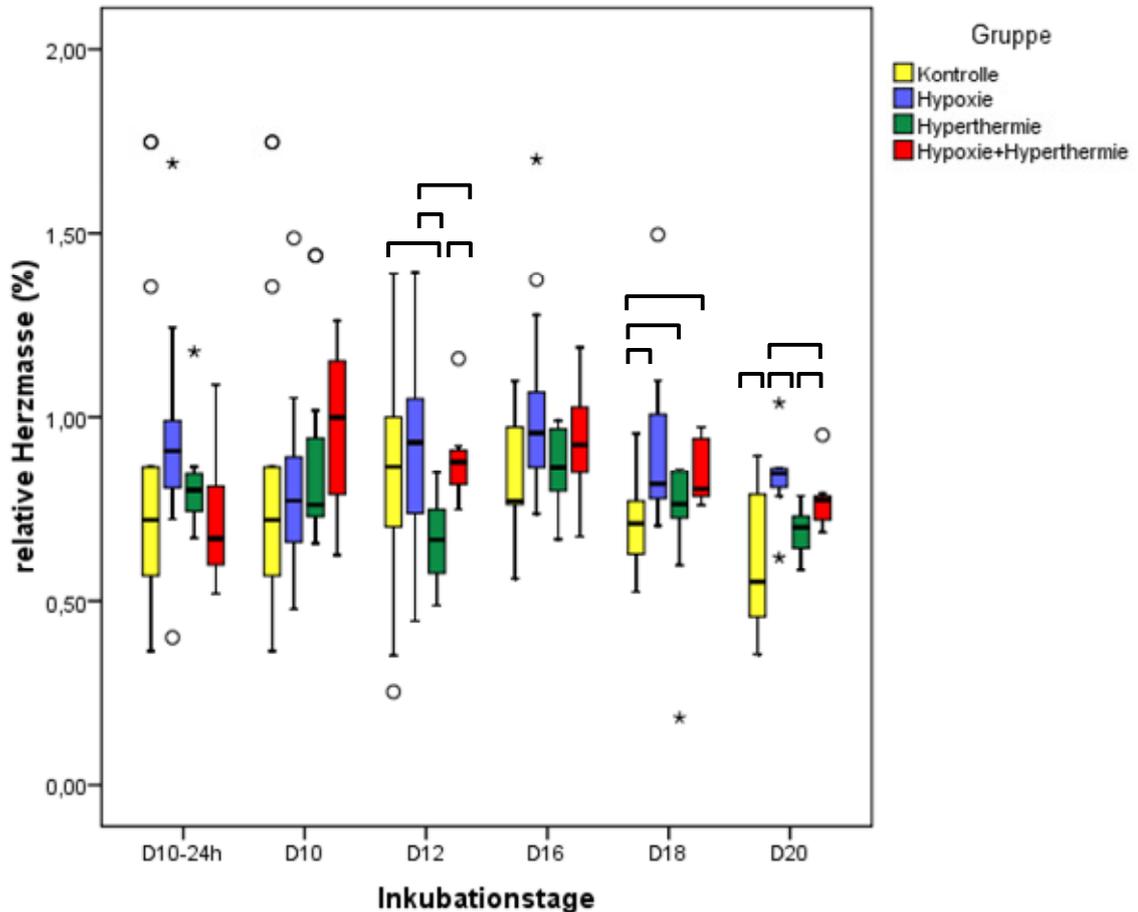
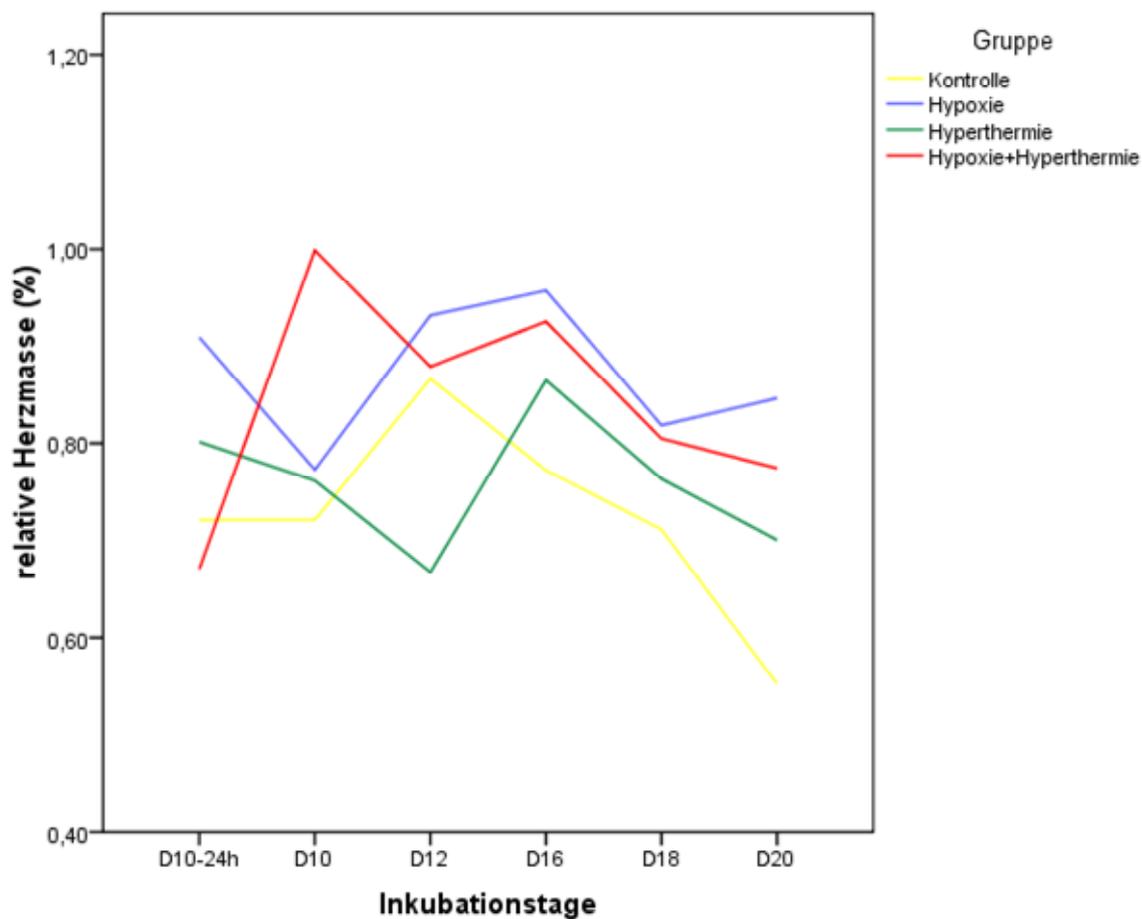


Abb. 19: Relative Herzmasse der Kontroll- und Versuchsgruppen der Hühnerembryonen zu den unterschiedlichen Inkubationstagen. Zur detaillierteren Darstellung wurde am D18 ein Extremwert nach oben in der Hyperthermiegruppe herausgenommen. Die schwarzen Querbalken signalisieren signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den verschiedenen Gruppen.

Die Embryonen der **HYPOXIEGRUPPE** wiesen an allen Tagen höhere relative Herzmassen auf als in der Kontrollgruppe, aber nur an den Tagen D18 und D20 waren die Unterschiede signifikant ( $p < 0,05$ ). Im Vergleich zur Hyperthermiegruppe waren die relativen Herzmassen der Hypoxiegruppe ebenfalls erhöht. Signifikante Unterschiede waren an D12 und D20 festzustellen. Während die relativen Herzmassen der Hypoxie+Hyperthermiegruppe am D10 über denen der Hypoxiegruppe lagen, präsentierten sie sich sonst etwa gleich schwer oder unwesentlich leichter als die der Hypoxiegruppe. An D12 und D20 wogen die relativen Herzmassen der Hypoxie+Hyperthermiegruppe signifikant weniger als die der Hypoxiegruppe.

Die relativen Herzmassen der **HYPERTHERMIEGRUPPE** lagen an D10-24h und D10 leicht über der Kontrollgruppe. Signifikant tiefer als in der Kontrollgruppe waren die Herzmassen am D12. Während sie an D16 und D20 nur tendenziell mehr wogen als in der Kontrollgruppe, waren sie am D18 signifikant schwerer. Die relativen Herzmassen der Hypoxiegruppe lagen über denen der Hyperthermiegruppe, die Unterschiede waren an D12 und D20 signifikant. Bis auf D10-24h lagen die Herzmassen der Hypoxie+Hyperthermiegruppe an allen Tagen über denen der Hyperthermiegruppe. An den Tagen D12 und D20 waren die Unterschiede signifikant.

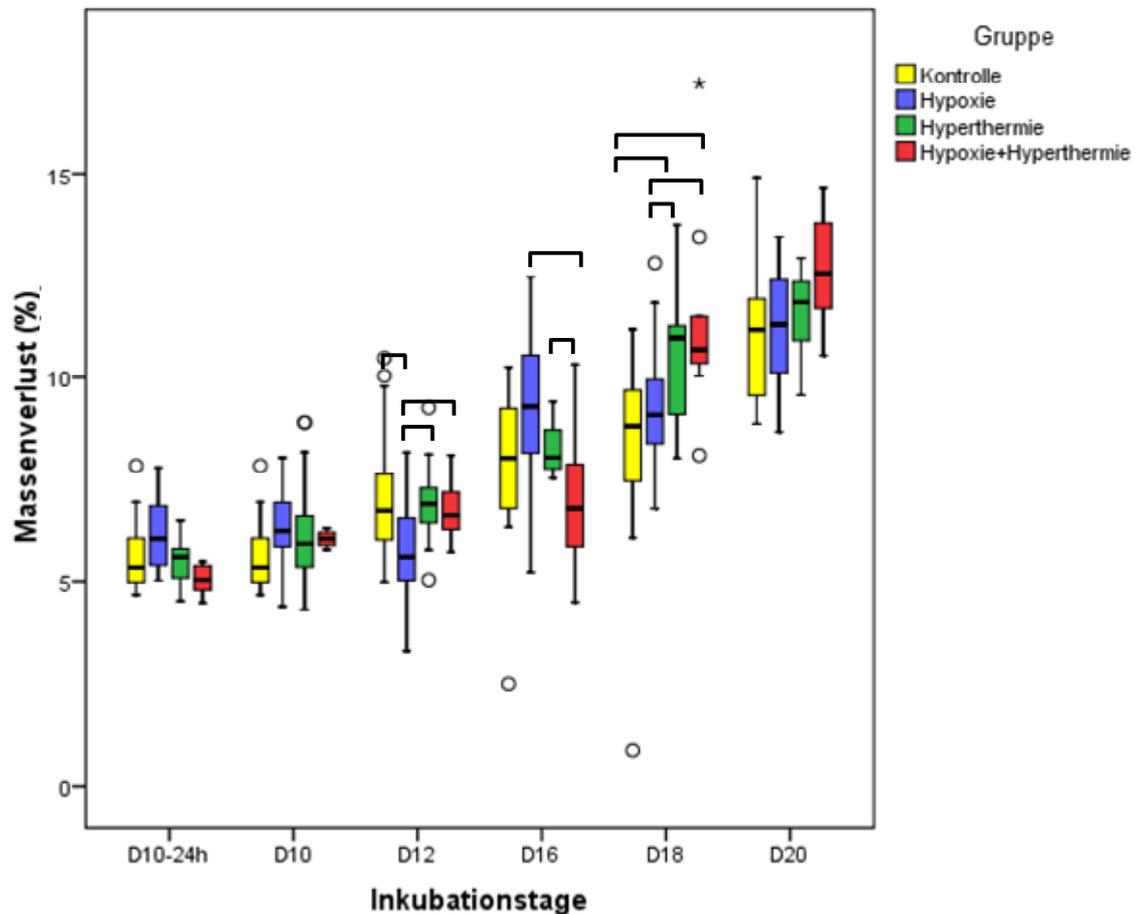


**Abb. 20:** Die Mediane der relativen Herzmassen der Kontroll- und Versuchsgruppen der Hühnereier vom Beginn der Inkubation bis zu den unterschiedlichen Inkubationstagen. Da die Messungen nur an den dargestellten Inkubationstagen stattfand, soll kein Verlauf dargestellt werden, sondern der Unterschied zwischen den Gruppen veranschaulicht werden.

Die Embryonen der **HYPOXIE+HYPERTHERMIEGRUPPE** wiesen bis auf D10-24h höhere relative Herzmassen auf als diejenigen der Kontrollgruppe. Die Unterschiede zur Kontrollgruppe waren am Tag D18 signifikant. Die relativen Herzmassen der Hypoxiegruppe lagen bis auf D10 über der Hypoxie+Hyperthermiegruppe, an D12 und D20 waren die relativen Herzmassen der Hypoxiegruppe signifikant schwerer als die der Hypoxie+Hyperthermiegruppe. Abgesehen von D10-24h waren die Herzen der

Hypoxie+Hyperthermiegruppe durchschnittlich schwerer als die der Hyperthermiegruppe. Die Differenz gegenüber der Hyperthermiegruppe war an den Tagen D12 und D20 signifikant.

#### 4.1.3. Massenverlust

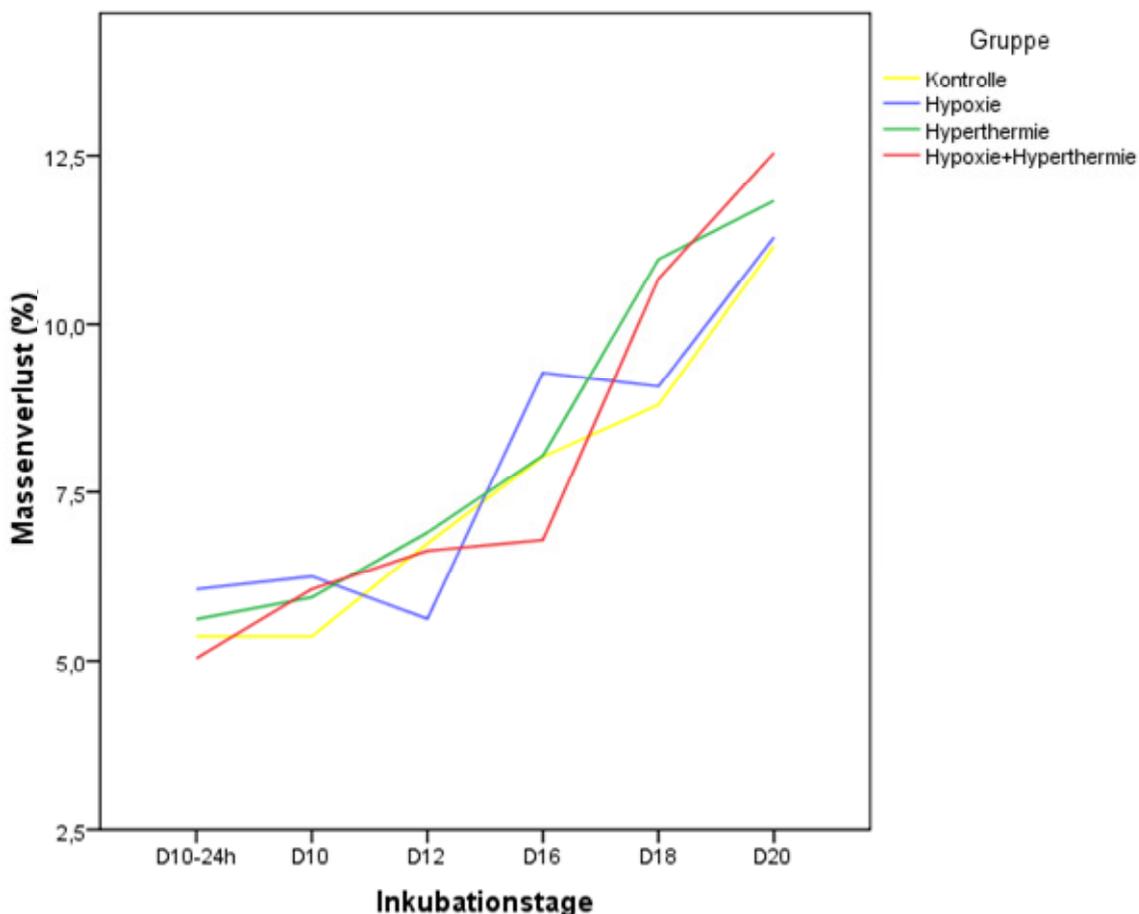


**Abb. 21: Relative Massenverluste der Kontroll- und Versuchsgruppen der Hühnereier vom Beginn der Inkubation bis zu den unterschiedlichen Inkubationstagen. Die schwarzen Querbalken signalisieren signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den verschiedenen Gruppen.**

Mit dem Alter des Embryos nimmt der Massenverlust des Hühnereis während der Inkubation zu. In der **KONTROLLGRUPPE** war der größte Unterschied des Massenverlustes zwischen D18 und D20 zu sehen (Abb. 21 und Abb. 22).

An D12 lag der Massenverlust der Hühnereier in der **HYPOXIEGRUPPE** signifikant unter allen anderen Gruppen. An alle anderen Tagen war der gemessene Massenverlust der Hypoxiegruppe größer im Vergleich zur Kontrollgruppe. Der Massenverlust der Hypoxiegruppe und der Kontrollgruppe war an den Tagen D18 und D20 fast gleich. Während der Massenverlust der Eier in der Hyperthermiegruppe und in der Hypoxie+Hyperthermiegruppe am D16 deutlich unter dem der Hypoxiegruppe lag, stieg er in diesen beiden Gruppen an den Tagen D18 und D20 über das Niveau des Massenverlustes der Hypoxiegruppe an.

Der Massenverlust während der Inkubation der Hühnereier in der **HYPERTHERMIEGRUPPE** war höher als in der Kontrollgruppe. An D18 verloren die Hühnereier der Hyperthermiegruppe signifikant mehr Masse als die der Kontrollgruppe. Am D12 und D18 war der Massenverlust in der Hyperthermiegruppe größer als in allen anderen Gruppen, gegenüber der Hypoxiegruppe und der Hypoxie+Hyperthermiegruppe waren die Massenverluste der Hühnereier signifikant höher. Am D16 waren die Massenverluste der Hühnereier in der Hyperthermiegruppe kleiner als in der Hypoxiegruppe. Am D20 waren nur die Massenverluste in der Hypoxie+Hyperthermiegruppe höher als die in der Hyperthermiegruppe.



**Abb. 22:** Die Mediane der relativen Massenverluste der Kontroll- und Versuchsgruppen der Hühnereier vom Beginn der Inkubation bis zu den unterschiedlichen Inkubationstagen. Da die Messungen nur an den dargestellten Inkubationstagen stattfand, soll kein Verlauf dargestellt werden, sondern der Unterschied zwischen den Gruppen veranschaulicht werden.

An D10-24h und D16 lagen die Massenverluste der Hühnereier in der **HYPOXIE+HYPERTHERMIEGRUPPE** tiefer als in allen anderen Gruppen. Die Verluste in der Hypoxie+Hyperthermiegruppe waren ansonsten höher als in der Kontrollgruppe. Die Massenverluste in der Hypoxie+Hyperthermiegruppe lagen an den Tagen D12 und D18 signifikant über und am D16 unter denen der Hypoxiegruppe. Die Unterschiede der Massenverluste der Hühnereier waren nicht signifikant zwischen der Hyperthermiegruppe

und der Hypoxie+Hyperthermiegruppe. Nur an den Tagen D10 und D20 waren die Massenverluste der Hühnereier in der Hypoxie+Hyperthermiegruppe höher als in der Hyperthermiegruppe. Die Hypoxie+Hyperthermiegruppe war die Gruppe, die die höchsten Massenverluste der Hühnereier während der Inkubation bis zum D20 aufwies.

#### 4.1.4. Mortalität

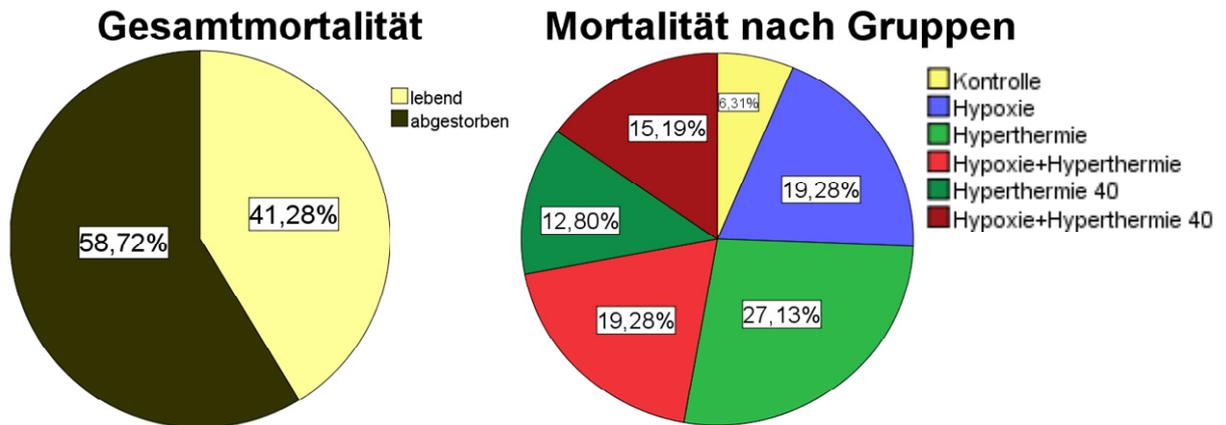


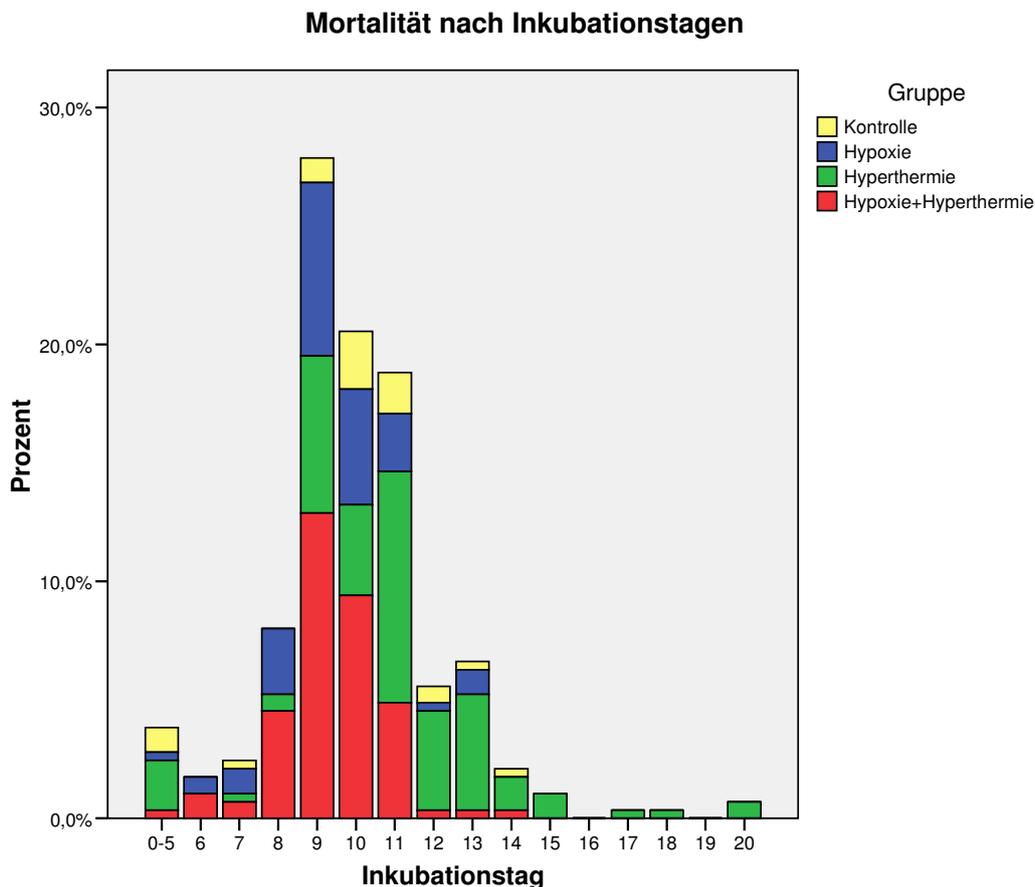
Abb. 23: Gesamtmortalität (links), Aufteilung nach Versuchsgruppen (rechts).

Die Gesamtmortalität der Hühnerembryonen betrug 59% (58,72%). Aufgeteilt nach Gruppen lag die Sterblichkeit in der Kontrollgruppe bei 6,31%, in der Hypoxiegruppe bei 19,28%, in der Hyperthermiegruppe bei 39,93% (27,13% bei 39,5°C und 12,80% bei 40°C) und in der Hypoxie+Hyperthermiegruppe bei 34,47% (19,28% bei 39,5°C und 15,19% bei 40°C) (Abb. 23). Bei Verwendung einer Inkubationstemperatur von 40°C bestand während der Belastungsininkubation von D6-12 eine fast 100%ige Mortalität (96,15% in der Hyperthermiegruppe und 94,68% in der Hypoxie+Hyperthermiegruppe). Deswegen wurde die Temperatur der Hyperthermiegruppe und der Hypoxie+Hyperthermiegruppe auf 39,5°C gesenkt und die Belastungsininkubation von D6-12 auf D8-12 verkürzt. Durch mikrobielle Stichprobenuntersuchungen wurde eine Kontamination der Inkubatoren sowie der bebrüteten Eier mit Bakterien, Pilzen und Hefen ausgeschlossen.

##### 4.1.4.1. Mortalität in Relation zu den Inkubationstagen

In der Mortalität waren während D0 bis D6 keine Gruppenunterschiede zu erkennen. Die Sterblichkeit war während der Inkubation unter chronischem O<sub>2</sub>-Mangel und/oder erhöhter Temperatur am höchsten. Rund 80% aller Embryonen, die die Embryonalentwicklung nicht überlebten, starben zwischen D8-12. Am D8 starben vor allem die Embryonen der Hypoxiegruppe und der Hypoxie+Hyperthermiegruppe. In Abb. 25 ist zu sehen, wie sich die Mortalität in den Gruppen verteilt. Der größte Anteil (67,26%) der Embryonen aller Gruppen starben an den Tagen D9-11. Dabei starben am Tag D9 die meisten Embryonen (27,88%), gefolgt vom D10 mit 20,56% und D11 mit 18,82% (Abb. 24). Abb. 24 zeigt, dass die

Hühnerembryonen, die den Inkubationsstress durch 15%ige chronische Hypoxie während der Zeit D6-12 überstanden, den Rest der Inkubationsdauer überlebten. Auch bei der Hypoxie+Hyperthermiegruppe starben nur noch vereinzelt Embryonen nach D12. Die Hyperthermiegruppe hatte nach erfolgter Hyperthermieexposition die höchste Mortalität im Gegensatz zu den anderen Gruppen.



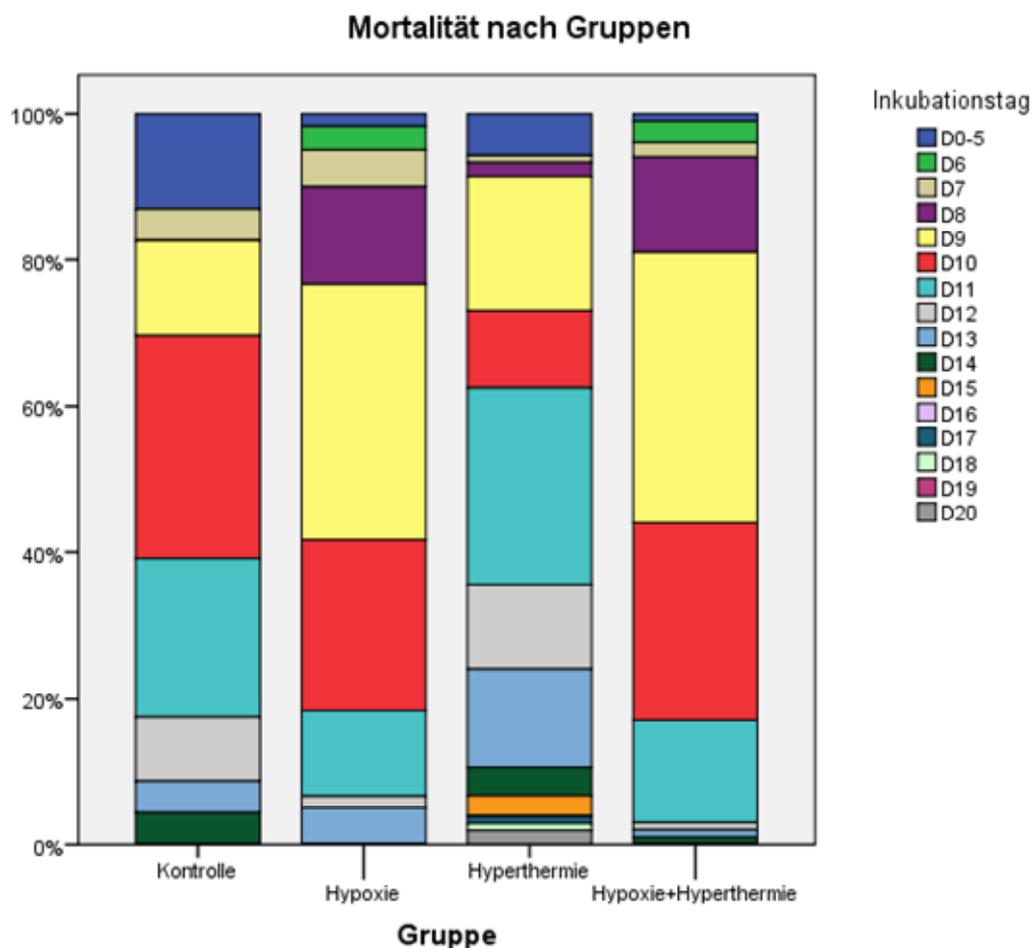
**Abb. 24: Mortalität der Hühnerembryonen an den einzelnen Inkubationstagen aufgeschlüsselt nach Gruppen.**

#### 4.1.4.2. Mortalität innerhalb der Versuchsgruppen

Die Darstellung in Abb. 25 zeigt die Mortalität der Hühnerembryonen innerhalb der Gruppen. Die Embryonensterblichkeit in der **KONTROLLGRUPPE** war am D10 (30,4%) und D11 (21,7%) am höchsten. Bis zu 93,1% der Embryonen starben innerhalb der ersten 12 Entwicklungstage. Embryonen, die den D14 erreichten, überlebten mit über 99% Wahrscheinlichkeit bis zum Ende der Inkubationsperiode.

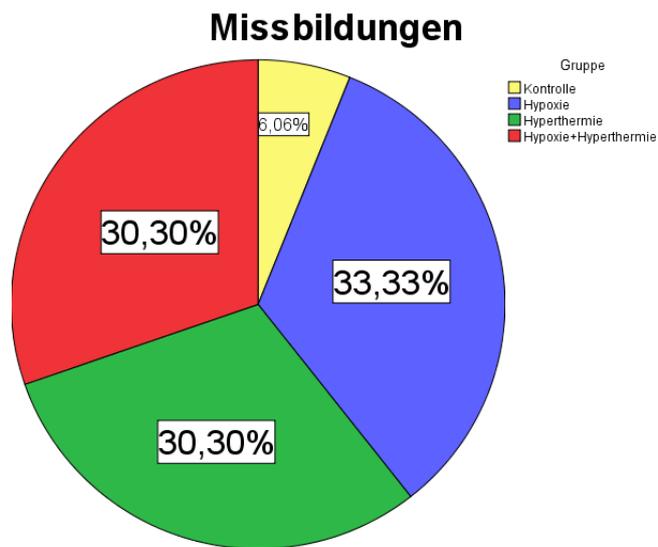
Die Embryonen, die ab D6 unter **HYPOXIE** bebrütet wurden, wiesen eine leicht erhöhte Mortalität am D7 auf gegenüber allen anderen Gruppen. Gegenüber der Kontrollgruppe starben mehr Embryonen am D8 und D9. 83,3% der Embryonen starben an den Tagen D8-11. Ab dem D13 sank die Embryonensterblichkeit in der Hypoxiegruppe gegen Null.

Die **HYPERTHERMIEGRUPPE** hatte die größten Verluste an den Tagen D9 (18,3%) und D11 (26,9%). Im Gegensatz zu den anderen Gruppen lag die Sterblichkeit am Tag D10 nur bei 10,6%. Die Hyperthermie, der die Hyperthermiegruppe von D8-12 ausgesetzt war, wirkte sich ab dem D9 auf die Sterblichkeit aus. In der Hyperthermiegruppe war gegenüber den anderen Gruppen die höchste Sterblichkeit am D12 (11,5%) zu beobachten und auch nach dem Ende der Stressinkubation war die Wahrscheinlichkeit während der restlichen Inkubationsdauer zu sterben mit 24% am höchsten. In der **HYPOXIE+HYPERTHERMIEGRUPPE** starben die meisten Embryonen am D9 (37%) gefolgt vom D10 mit 27%, D11 (14%) und D8 (13%). Die Verteilung der Sterblichkeit über die Tage war vergleichbar mit derjenigen der Hypoxiegruppe. Nach D12 überlebten die Embryonen der Hypoxie+Hyperthermiegruppe mit hoher Wahrscheinlichkeit (98%) den Rest der Inkubation.



**Abb. 25: Mortalität innerhalb der Gruppen aufgeschlüsselt nach Inkubationstagen.**

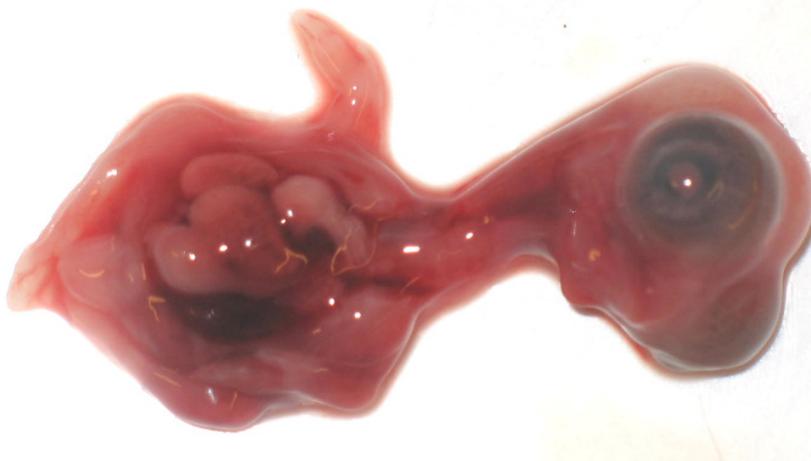
#### 4.1.5. Missbildungen



**Abb. 26: Missbildungen in der Kontrollgruppe und unterschiedlichen Gruppen.**

Insgesamt kam es bei 8,25% der Hühnerembryonen zur Ausbildung fehlerhafter anatomischer Strukturen während der Inkubation. Wie in Abb. 26 aufgeteilt nach Gruppen zu sehen ist, waren am wenigsten Missbildungen in der Kontrollgruppe zu finden (6,06%). Die reine Hypoxiegruppe hatte mit 33,33% einen wesentlich höheren Anteil der Missbildungen. Die

Hyperthermiegruppe und die Hypoxie+Hyperthermiegruppe bildeten mit jeweils 30,30% gleich große Gruppen in denen Missbildungen vorkommen. Die häufigste Form der Missbildung in dieser Studie, war die nicht vollständige Schließung der Bauchdecke nach O<sub>2</sub>-Mangel bzw. zu hohen Umgebungstemperaturen. Abb. 27 zeigt einen Hühnerembryo nach der Inkubation unter 15%iger chronischer Hypoxie und 39,5°C Hyperthermie.



**Abb. 27: Hühnerembryo mit offener Bauchdecke aus der Hypoxie+Hyperthermiegruppe am D10. Durch den fehlenden Schluss der Bauchdecke waren die inneren Organe des Embryos sichtbar. Dieser Embryo war zudem auffallend mehr durchblutet als die Kontrolltiere.**

Auffällig waren weiterhin die teilweise sehr niedrigen Embryonenmassen und die hohen Herzmassen im Vergleich zu Hühnerembryonen des gleichen Entwicklungsstadiums der Kontrollgruppe. Die Embryonen der Versuchsgruppen waren zudem auffallend stärker durchblutet als die Embryonen des gleichen Entwicklungsstadiums der Kontrollgruppe.

## 4.2. Molekulargenetische Untersuchungen

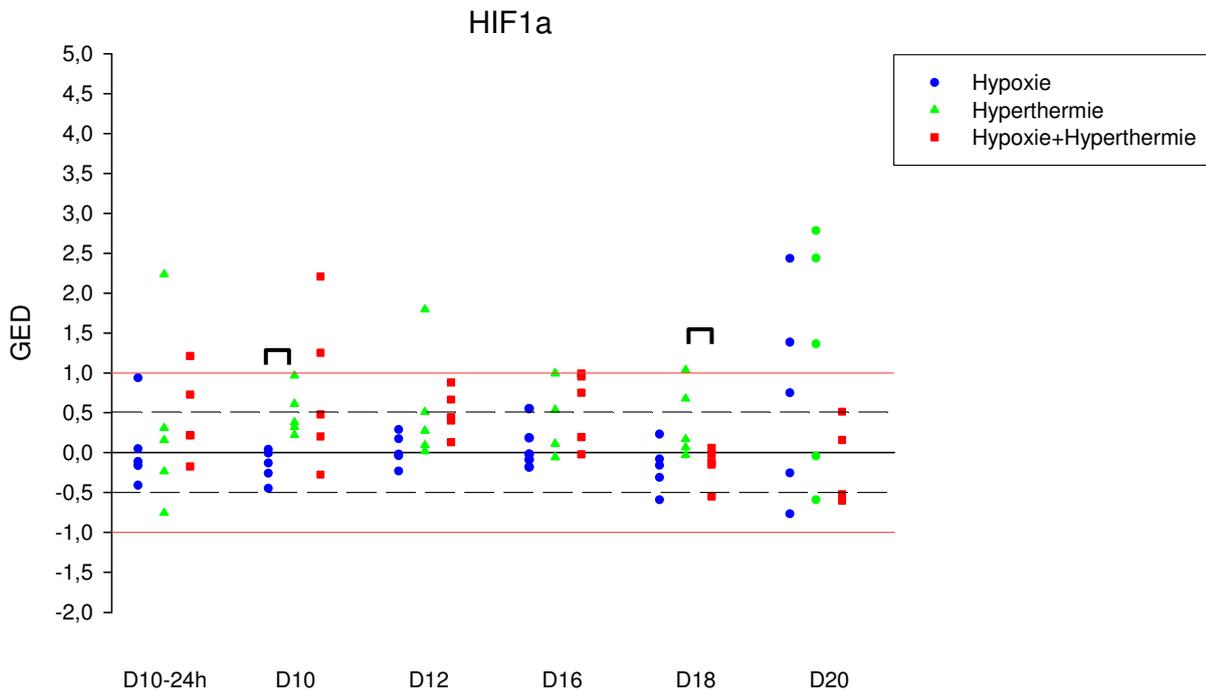
Die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse wurden anhand der FC-Werte („Fold change“) dargestellt. Die FC-Werte dienten als Maß der Gene Expression's Difference (GED) und bezogen sich immer auf die Kontrollgruppe, die bei 37,5°C und 21% O<sub>2</sub> bebrütet wurden. Die Kontrollgruppe wurde als Basis bzw.  $x=0$  (schwarze durchgezogene Linie) dargestellt. Die y-Achse steht für den „Fold change“ (FC) der behandelten Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe. FC-Werte von  $<0,5$  und  $>-0,5$  (Bereich zwischen den gestrichelten schwarzen Linien) waren nicht als Regulationen gegenüber der Kontrollgruppe anzusehen. FC-Werte zwischen 0,5 und 1 waren als Tendenz zur Hochregulation der Genexpression bzw. zwischen  $-0,5$  bis  $-1$  als Tendenz zur Herunterregulation der Genexpression (Bereiche zwischen den gestrichelten schwarzen und den roten Linien) zu betrachten. Erst ab FC-Werten  $>1$  und  $<-1$  (Bereich über/unter den roten Linien) kann von einer Hoch- bzw. Herunterregulation der Genexpression gesprochen werden (S. 51).

Es handelt sich bei den Ergebnissen um Einzelwerte. Jeder Punkt (FC-Wert) kann der mRNA eines embryonalen Herzens zugeordnet werden. Die Gruppen wurden anhand des Medians der FC-Werte beurteilt. Das arithmetische Mittel sowie die Standardabweichung wurden berechnet (9.8.5)

Zusätzlich wurden die Versuchsgruppen einer univariaten Varianzanalyse unterzogen. Nur wenn ein Ergebnis einen p-Wert von  $<0,05$  erreichte, wurde von einem signifikanten Unterschied der FC-Werte zwischen der Versuchsgruppen ausgegangen. Dies wurde in den Abbildungen mit einem horizontalen schwarzen Balken zwischen den Gruppen gekennzeichnet.

## 4.2.1. Genexpressionsprofile der ausgewählten Zielgene

### 4.2.1.1. Expressionsprofil des Hypoxia Inducible Factor 1 $\alpha$ (HIF1 $\alpha$ )



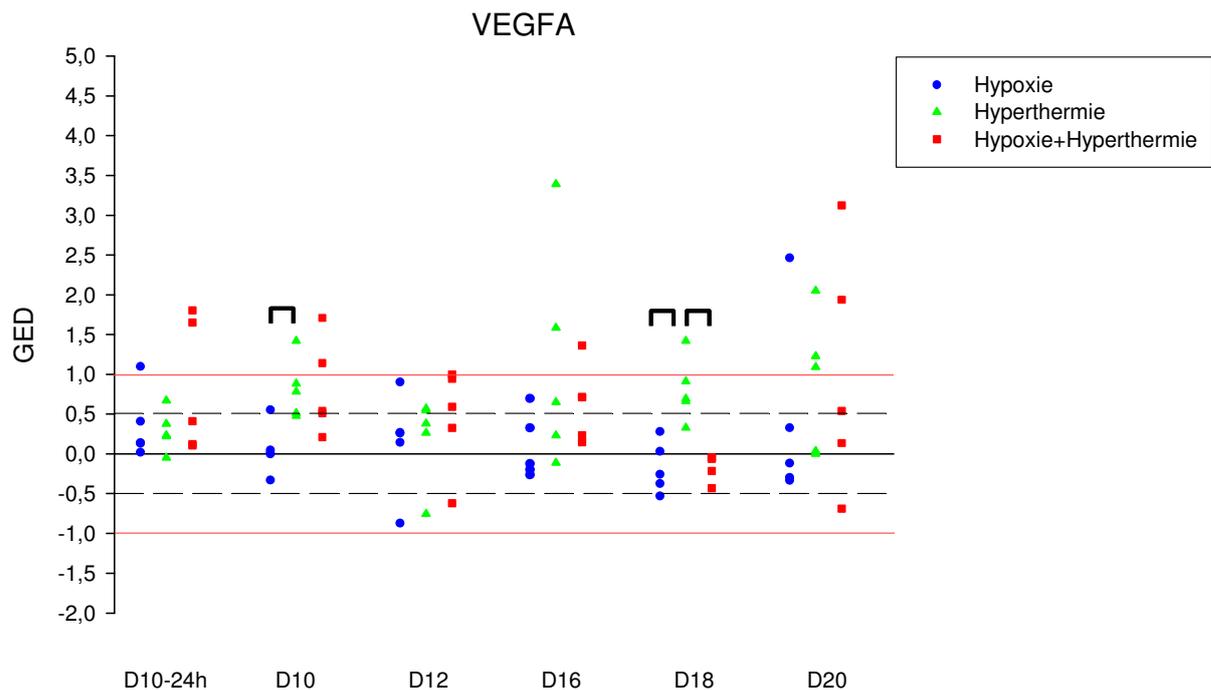
**Abb. 28: Expressionsprofil von HIF1 $\alpha$  an allen Inkubationstagen. Die schwarzen Querbalken signalisieren signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen.**

Der Abb. 28 ist zu entnehmen, dass zwischen der Kontrollgruppe und den Versuchsgruppen eine 1,36fache Hochregulation der Expression von HIF1 $\alpha$  am D20 in der Hyperthermiegruppe festgestellt werden konnte. Bei HIF1 $\alpha$  in der Hypoxiegruppe ist am D20 eine Tendenz zur Hochregulation sichtbar. Außerdem ist am D16 eine Tendenz zur Hochregulation von HIF1 $\alpha$  in der Hyperthermiegruppe und in der Hypoxie+Hyperthermiegruppe gegenüber der Kontrollgruppe zu sehen.

Die FC-Werte von HIF1 $\alpha$  der Hypoxiegruppe lagen unter denen der Kontrollgruppe. Die FC-Werte der Hyperthermiegruppe lagen über denen der Hypoxiegruppe und waren über der Kontrollgruppe. Die Hyperthermiegruppe hatte an D16 und D20 die höchsten FC-Werte aller Versuchsgruppen. Die FC-Werte der Hypoxie+Hyperthermiegruppe waren bis auf D18 und D20 über den FC-Werten der Hyperthermiegruppe und über der Kontrollgruppe. Am D20 war die Hypoxie+Hyperthermiegruppe die Gruppe mit den niedrigsten FC-Werten.

Am D10 waren die FC-Werte der Hyperthermiegruppe signifikant höher ( $p < 0,05$ ) als die der Hypoxiegruppe. Am D18 lagen die mRNA-Gehalte der Hyperthermiegruppe signifikant über denen der Hypoxie+Hyperthermiegruppe.

#### 4.2.1.2. Expressionsprofil des Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGFA)



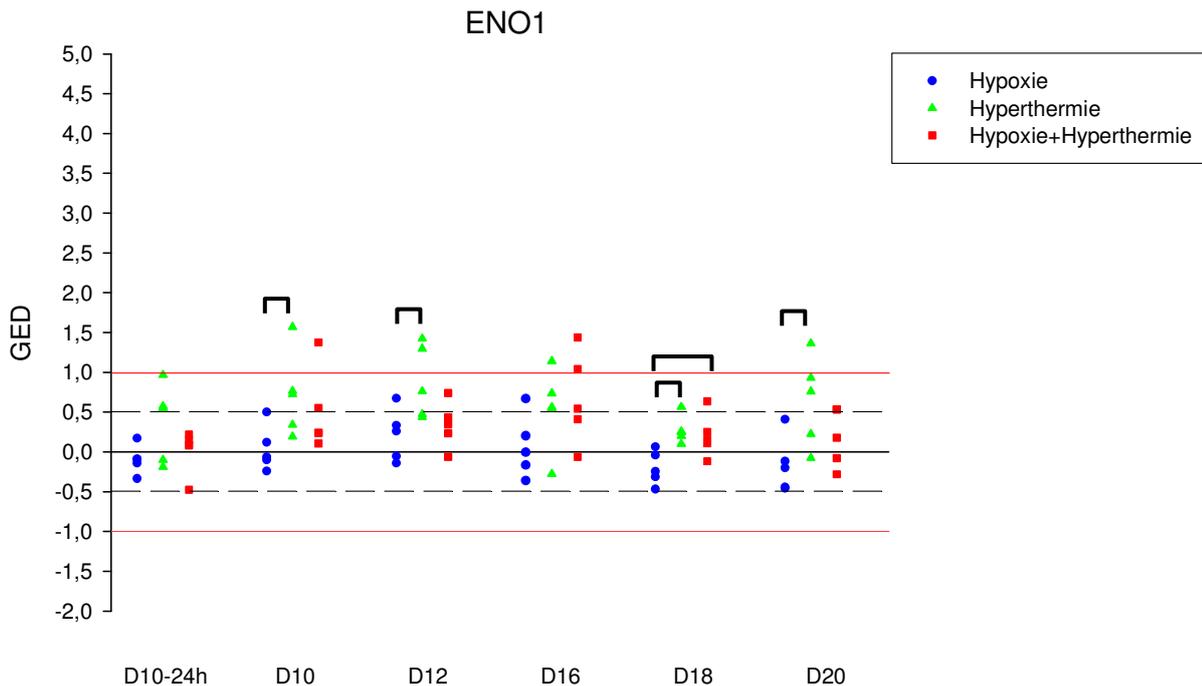
**Abb. 29: Expressionsprofil von VEGFA an allen Inkubationstagen. Die schwarzen Querbalken signalisieren signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen.**

Abb. 29 zeigt, dass das Gen VEGFA in der Hyperthermiegruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe am D20 1,09fach hochreguliert war. Eine Tendenz zur Hochregulation von VEGFA im Vergleich zur Kontrollgruppe war am D10 in der Hyperthermiegruppe und der Hypoxie+Hyperthermiegruppe, am D12 in der Hypoxie+Hyperthermiegruppe, am D16 in der Hyperthermiegruppe und der Hypoxie+Hyperthermiegruppe, am D18 in der Hyperthermiegruppe und am D20 in der Hypoxie+Hyperthermiegruppe zu finden.

Die FC-Werte der Hypoxiegruppe lagen unter denen der Hyperthermiegruppe und der Hypoxie+Hyperthermiegruppe. Von D16-20 lagen sie unter denen der Kontrollgruppe. Die FC-Werte der Hyperthermiegruppe lagen über der Kontrollgruppe. Die FC-Werte der Hypoxie+Hyperthermiegruppe waren bis auf D18 über der Kontrollgruppe und unter den FC-Werten der Hyperthermiegruppe abgesehen von D10-24h und D12. Am D16 lagen die FC-Werte der Hyperthermiegruppe und der Hypoxie+Hyperthermiegruppe auf gleicher Höhe.

Die Hyperthermiegruppe hatte vor allem an D10, D18 und D20 höhere FC-Werte als die anderen Versuchsgruppen. An D10 und D18 lagen die FC-Werte der Hyperthermiegruppe signifikant ( $p < 0,05$ ) höher als die der Hypoxiegruppe. Die FC-Werte der Hypoxie+Hyperthermiegruppe lagen am D18 signifikant unter denen der Hyperthermiegruppe, ansonsten waren sie weder von der Hypoxie- noch von der Hyperthermiegruppe deutlich abzugrenzen.

#### 4.2.1.3. Expressionsprofil der Enolase 1 (ENO1)



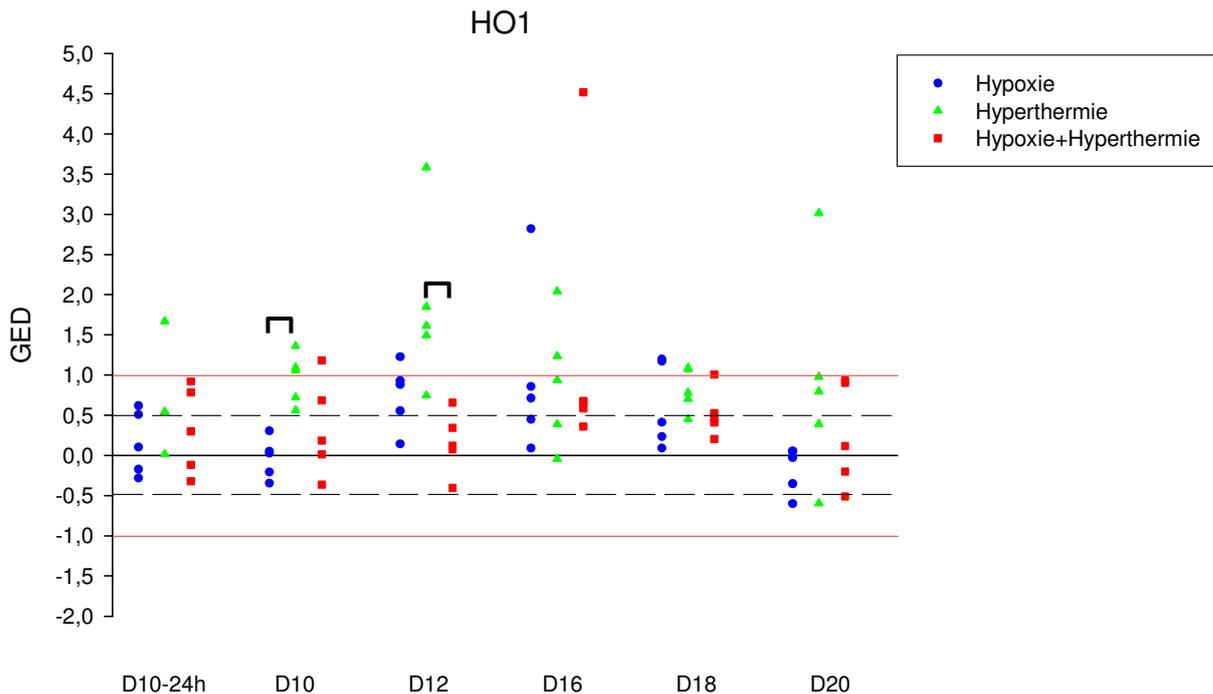
**Abb. 30: Expressionsprofil von ENO1 an allen Inkubationstagen. Die schwarzen Querbalken signalisieren signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen.**

Aus Abb. 30 ist ersichtlich, dass es bei der Enolase keine Hoch- oder Herunterregulationen gab. Bis auf D18 wurde an allen Inkubationstagen eine Tendenz zur Hochregulation in der Hyperthermiegruppe gemessen. Der Tag 16 wies zusätzlich eine Tendenz zur Hochregulation in der Hypoxie+Hyperthermiegruppe auf.

Die FC-Werte der Hypoxiegruppe lagen bis auf D12 unter der Kontrollgruppe. Die Hyperthermiegruppe lag mit ihren FC-Werten an allen Tagen über den anderen beiden Gruppen. Die FC-Werte der Hypoxie+Hyperthermiegruppe lagen allesamt etwas höher als in der Hypoxiegruppe aber unter der Hyperthermiegruppe.

An den Tagen D10, D12, D18 und D20 waren die FC-Werte in der Hyperthermiegruppe signifikant höher ( $p < 0,05$ ) als in der Hypoxiegruppe. Die FC-Werte in der Hypoxie+Hyperthermiegruppe lagen an allen Tagen über denen der Hypoxiegruppe, am D18 war der Unterschied zwischen den FC-Werten signifikant höher ( $p < 0,05$ ).

#### 4.2.1.4. Expressionsprofil der Hämoxigenase 1 (HO1)



**Abb. 31: Expressionsprofil von HO1 an allen Inkubationstagen. Die schwarzen Querbalken signalisieren signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen.**

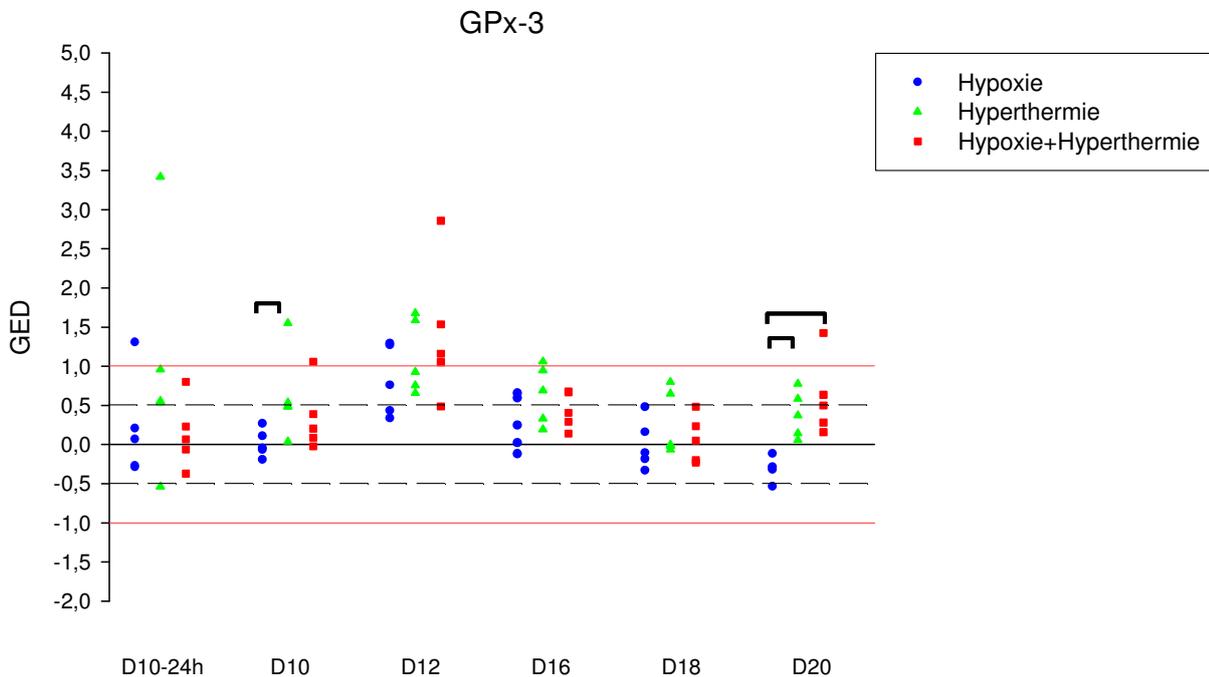
In der Hyperthermiegruppe bestand an allen Tagen eine Erhöhung der FC-Werte gegenüber der Kontrollgruppe (Abb. 31). Am deutlichsten war dies an D10 und D12, an denen HO1 in der Hyperthermiegruppe 1,06fach am D10 und 1,61fach am D12 hochreguliert war. An allen anderen Tagen zeigte sich in der Hyperthermiegruppe eine Tendenz zur Hochregulation des Gens HO1 gegenüber der Kontrollgruppe. Am D12 war HO1 in der Hypoxiegruppe und am D16 in der Hypoxiegruppe sowie in der Hypoxie+Hyperthermiegruppe tendenziell hochreguliert.

Die Hypoxiegruppe hatte die niedrigsten FC-Werte. Die FC-Werte der Hyperthermiegruppe lagen an allen Tagen höher als die der anderen beiden Gruppen. Die FC-Werte der Hypoxie+Hyperthermiegruppe lagen über denen der Hypoxiegruppe bis auf D12. Am D16 und D18 lagen die FC-Werte der Hypoxiegruppe und der Hypoxie+Hyperthermiegruppe auf gleicher Höhe. Insgesamt waren die FC-Werte der HO1 an allen Tagen über denen der Kontrollgruppe angesiedelt, ausgenommen die FC-Werte in der Hypoxiegruppe am D20.

An D12 und D18 lagen alle FC-Werte der Hypoxiegruppe über denen der Kontrollgruppe. In der Hypoxiegruppe war ab D18 eine tendenzielle Absenkung des mRNA-Gehalts von HO1 bis zum D20 zu erkennen. Am D10 war die Differenz der FC-Werte der Hyperthermiegruppe signifikant höher gegenüber der Hypoxiegruppe. Die FC-Werte der Hypoxie+Hyperthermiegruppe lagen am D12 signifikant ( $p < 0,05$ ) unter der Hyperthermiegruppe. Zwischen den verschiedenen Tagen der Embryonalentwicklung war

am D12 tendenziell ein Anstieg der FC-Werte vor allem in der Hypoxiegruppe und der Hyperthermiegruppe zu beobachten.

#### 4.2.1.5. Expressionsprofil der Glutathionperoxidase 3 (GPx-3)



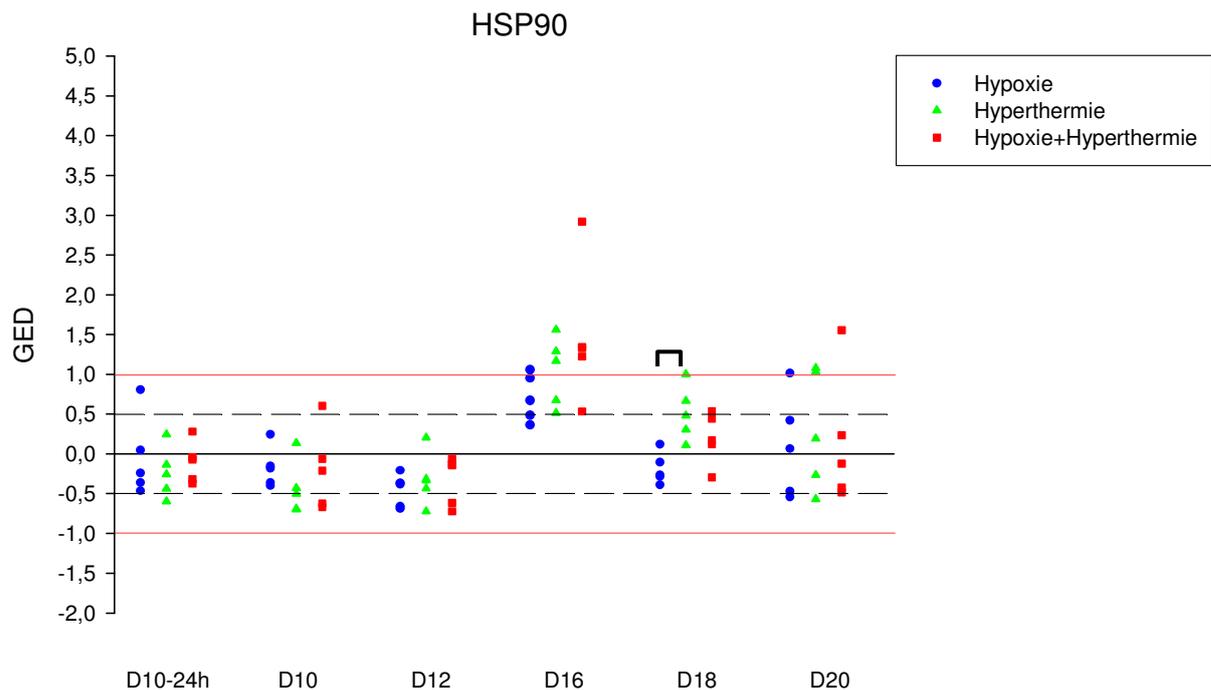
**Abb. 32: Expressionsprofil von GPx-3 an allen Inkubationstagen. Die schwarzen Querbalken signalisieren signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen.**

Wie die obige Abb. 32 zeigt, wies das Gen GPx-3 in der Hypoxie+Hyperthermiegruppe am D12 eine 1,16fache Hochregulation auf gegenüber der Kontrollgruppe. Auch die anderen beiden Behandlungsgruppen enthielten am D12 mehr mRNA als die Kontrollgruppe und waren tendenziell hochreguliert, wobei die FC-Werte der Hyperthermiegruppe über denjenigen der Hypoxiegruppe lagen. Weiterhin gab es in der Hyperthermiegruppe der Tage D10-24h und D16 eine Tendenz zur Hochregulation im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Die FC-Werte der Hypoxiegruppe waren bei der GPx-3 am tiefsten. An D10, D18 und D20 lagen die FC-Werte unter der Kontrollgruppe. An den Tagen D10-24h, D10 und D16 lagen die FC-Werte der Hyperthermiegruppe über denen der Hypoxie+Hyperthermiegruppe. An den Tagen D12, D18 und D20 waren die FC-Werte der Hypoxie+Hyperthermiegruppe höher als die FC-Werte der Hyperthermiegruppe.

Die FC-Werte der Hyperthermiegruppe lagen an D10 und D20 signifikant höher ( $p < 0,05$ ) als in der Hypoxiegruppe. Die FC-Werte der Hypoxie+Hyperthermiegruppe lagen außer am D10-24h höher als diejenigen der Hypoxiegruppe. Am D20 lag die Hypoxie+Hyperthermiegruppe mit ihren FC-Werten signifikant ( $p < 0,05$ ) über der Hypoxiegruppe. Nachdem die FC-Werte nach D12 in allen Gruppen wieder absanken, stiegen sie an D20 wieder an. Eine Ausnahme machte hier nur die Hypoxiegruppe, die am D20 die tiefsten FC-Werte aller Tage aufwies.

#### 4.2.1.6. Expressionsprofil des Hitzeschockproteins 90 (HSP90)



**Abb. 33: Expressionsprofil von HSP90 an allen Inkubationstagen. Die schwarzen Querbalken signalisieren signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen.**

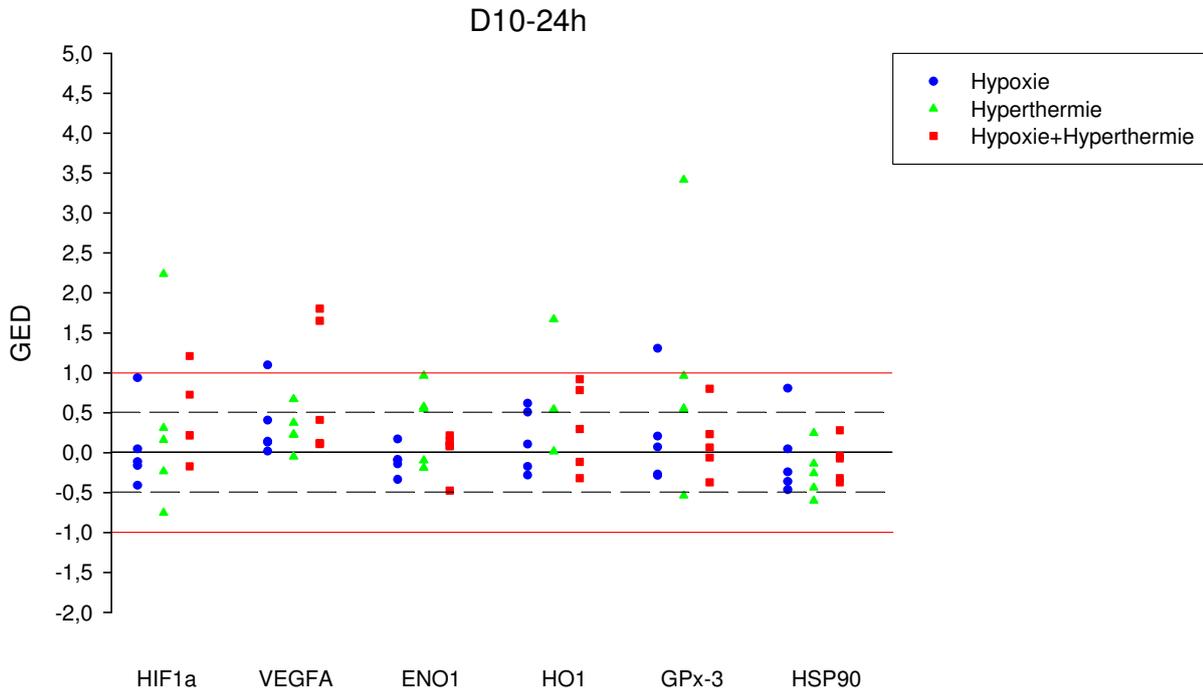
Während die mRNA-Level aller Versuchsgruppen von HSP90 an den Inkubationstagen D10-24h, D10 und D12 eine minimale Tendenz zur Herunterregulation von HSP90 gegenüber der Kontrollgruppe erkennen ließen (Abb. 33), waren sie am D16 in allen Gruppen erhöht und wiesen eine Tendenz zur Hochregulation in der Hypoxiegruppe auf. HSP90 war in der Hyperthermiegruppe 1,17fach und in der Hypoxie+Hyperthermiegruppe 1,33fach hochreguliert. An D18 und D20 sanken die mRNA-Gehalte im Vergleich zu D16 in allen Versuchsgruppen ab.

Die mRNA-Gehalte (und damit die FC-Werte) aller Versuchsgruppen bis zum D12 lagen unter den mRNA-Gehalten der Kontrollgruppe. Am D16 waren alle FC-Werte über denen der Kontrollgruppe. Am D18 lag nur die Hypoxiegruppe und am D20 die Hypoxie+Hyperthermiegruppe bezüglich der FC-Werte unter der Kontrollgruppe. Während die FC-Werte der Hyperthermiegruppe an den Tagen D10-24h und D10 tiefer als bei den anderen beiden Gruppen lagen, lagen sie am D16 und D18 zwischen den anderen Gruppen. Am D20 waren die FC-Werte der Hyperthermiegruppe am höchsten. Die Hypoxie+Hyperthermiegruppe hatte bis zum D16 die höchsten FC-Werte im Vergleich zu den anderen Gruppen. Am D20 lagen die FC-Werte der Hypoxie+Hyperthermiegruppe unter denen der anderen Gruppen.

Am D18 waren die FC-Werte der Hyperthermiegruppe signifikant ( $p < 0,05$ ) höher als die der Hypoxiegruppe.

## 4.2.2. Ergebnisse an den unterschiedlichen Entwicklungstagen

### 4.2.2.1. Expression der untersuchten Gene am Inkubationstag D10-24h



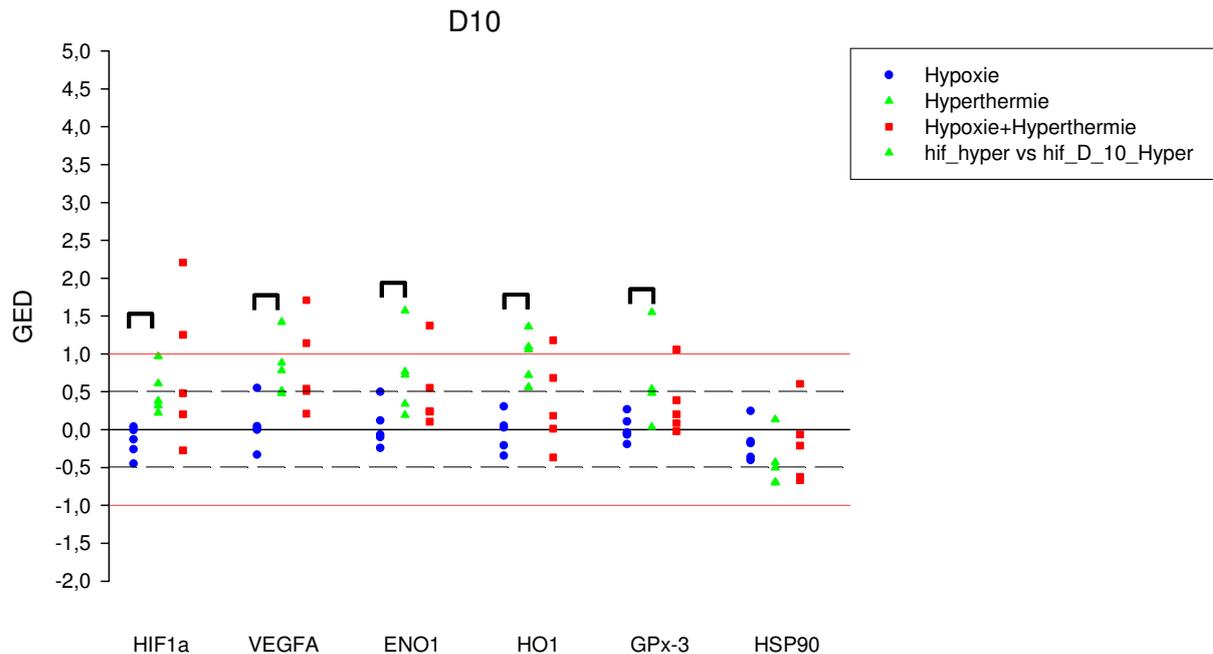
**Abb. 34: Expressionsprofil aller untersuchten Gene am D10-24h.**

Am D10-24h wurden die Myokardproben am Inkubationstag D10 den Hühnerembryonen entnommen, nachdem diese nur 24h den veränderten Bedingungen wie Hypoxie, Hyperthermie oder Hypoxie kombiniert mit Hyperthermie ausgesetzt waren. Die Gene ENO1, HO1 und GPx-3 waren in der Hyperthermiegruppe gegenüber der Kontrollgruppe tendenziell hochreguliert (Abb. 34).

Die FC-Werte der Hypoxiegruppe von HIF1 $\alpha$  und ENO1 sowie aller Versuchsgruppen von HSP90 lagen unter denen der Kontrollgruppe. Die anderen Gene und Gruppen hatten höhere FC-Werte als die Kontrollgruppe. Die Gene HIF1 $\alpha$ , VEGFA, ENO1 und HO1 in der Hypoxiegruppe hatten gegenüber den anderen Gruppen die niedrigsten FC-Werte. Bei GPx-3 waren die FC-Werte der Hypoxiegruppe gleich hoch wie in der Hypoxie+Hyperthermiegruppe. Bei HSP90 waren die FC-Werte der Hyperthermiegruppe am niedrigsten. Die Hyperthermiegruppe hatte bei den Genen ENO1, HO1 und GPx-3 die höchsten FC-Werte. Die Hypoxie+Hyperthermiegruppe hatte bei den Genen HIF1 $\alpha$ , VEGFA und HSP90 die höchsten FC-Werte.

Am D10-24h waren bei allen Genen keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen zu verzeichnen.

#### 4.2.2.2. Expression der untersuchten Gene am Inkubationstag D10



**Abb. 35: Expressionsprofil aller untersuchten Gene am D10. Die schwarzen Querbalken signalisieren signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen.**

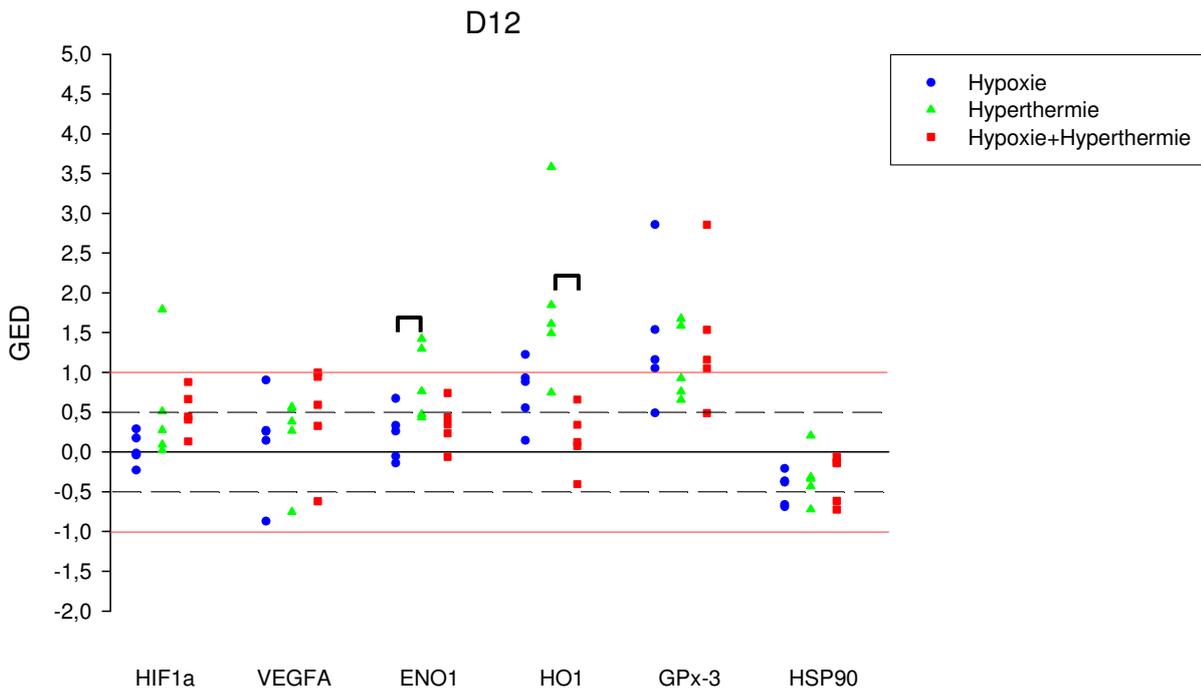
Im Gegensatz zum D10-24h wurden die Myokardproben vom D10 den Hühnerembryonen entnommen, die ab dem D6 bzw. D8 den unterschiedlichen Versuchsbedingungen unterworfen waren. Wie die Abb. 35 zeigt, war die Expression der Gene leicht verändert zum D10-24h.

Die HO1 war in der Hyperthermiegruppe 1,06fach hochreguliert. Bei VEGFA und ENO1 fand sich in der Hyperthermiegruppe eine Tendenz zur Hochregulation, bei VEGFA außerdem in der Hypoxie+Hyperthermiegruppe.

Die FC-Werte der Gene HIF1 $\alpha$ , ENO1 und GPx-3 der Hypoxiegruppe sowie die Werte von HSP 90 von allen Gruppen lagen unterhalb der Kontrollgruppe. Die Hypoxiegruppe war bei allen Genen bis auf HSP90 die Gruppe mit den niedrigsten FC-Werten im Vergleich zu den anderen Gruppen. Die Gene VEGFA, ENO1, HO1 und GPx-3 hatten in der Hyperthermiegruppe die höchsten Werte gegenüber den anderen Gruppen. Bei HSP90 hatte die Hyperthermiegruppe die niedrigsten FC-Werte. Bei den Genen HIF1 $\alpha$  und HSP90 hatte die Hypoxie+Hyperthermiegruppe höhere FC-Werte als die anderen Gruppen.

Die FC-Werte waren bei den Genen HIF1 $\alpha$ , VEGFA, ENO1, HO1 und GPx-3 in der Hyperthermiegruppe signifikant erhöht ( $p < 0,05$ ) und lagen über denen der Hypoxiegruppe. In der Hyperthermiegruppe zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zur Hypoxie+Hyperthermiegruppe.

#### 4.2.2.3. Expression der untersuchten Gene am Inkubationstag D12

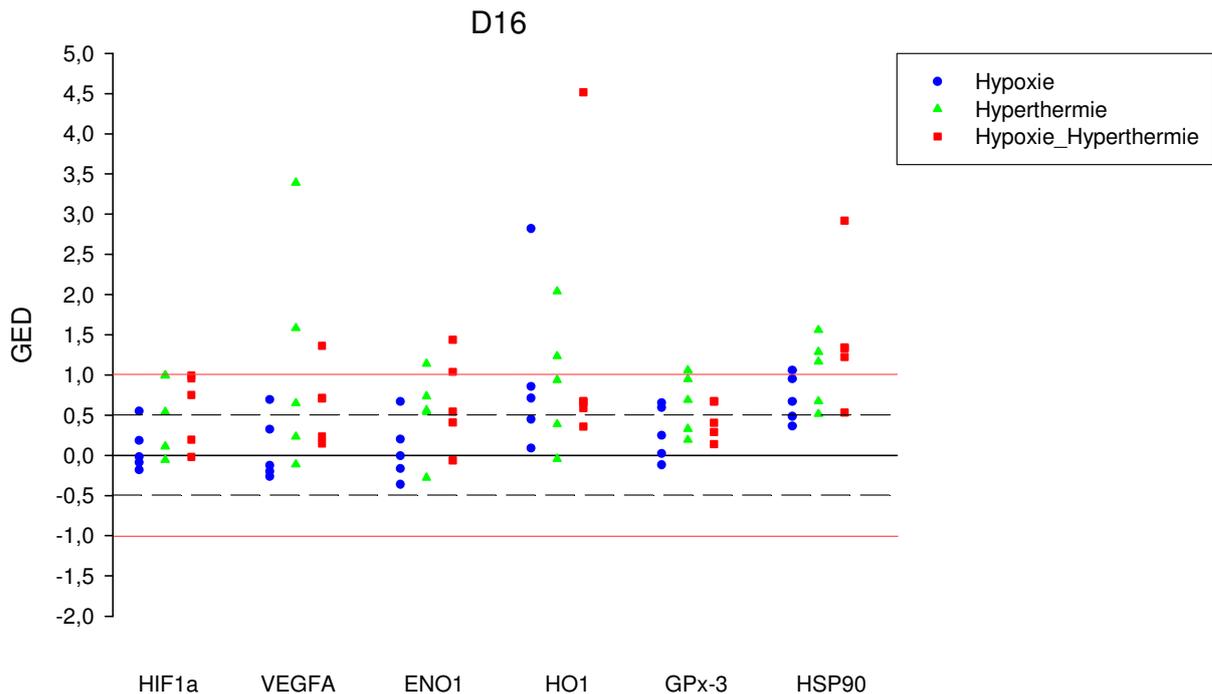


**Abb. 36: Expressionsprofil aller untersuchten Gene am D12. Die schwarzen Querbalken signalisieren signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen.**

Wie in Abb. 36 zu sehen ist, war HO1 in der Hyperthermiegruppe um das 1,61fache und GPx-3 in der Hypoxie+Hyperthermiegruppe um das 1,16fache hochreguliert. Die Gene HO1 und GPx-3 waren in der Hypoxiegruppe, die Gene ENO1 und GPx-3 in der Hyperthermiegruppe sowie das Gen VEGFA in der Hypoxie+Hyperthermiegruppe tendenziell hochreguliert.

Am D12 lagen nur noch die FC-Werte der Hypoxiegruppe von HIF1 $\alpha$  und alle Gruppen von HSP90 unter der Kontrollgruppe. Bis auf HO1 waren die FC-Werte der Hypoxiegruppe in allen Genen niedriger als die der anderen Gruppen. Die Hyperthermiegruppe hatte bei der ENO1 und HO1 höhere FC-Werte als die anderen Gruppen. Bei den Genen HIF1 $\alpha$ , VEGFA, Gpx-3 und HSP90 hatte die Hypoxie+Hyperthermiegruppe die höchsten FC-Werte. Bei HO1 lagen die FC-Werte der Hypoxie+Hyperthermiegruppe unter denen der anderen Gruppen. Die FC-Werte von HO1 der Hyperthermiegruppe lagen deutlich höher über denen der Hypoxiegruppe und der Hypoxie+Hyperthermiegruppe. Gegenüber der Hypoxie+Hyperthermiegruppe waren die Unterschiede signifikant ( $p < 0,05$ ). Gegenüber der Hypoxiegruppe waren die FC-Werte der ENO1 in der Hyperthermiegruppe signifikant ( $p < 0,05$ ) erhöht.

#### 4.2.2.4. Expression der untersuchten Gene am Inkubationstag D16



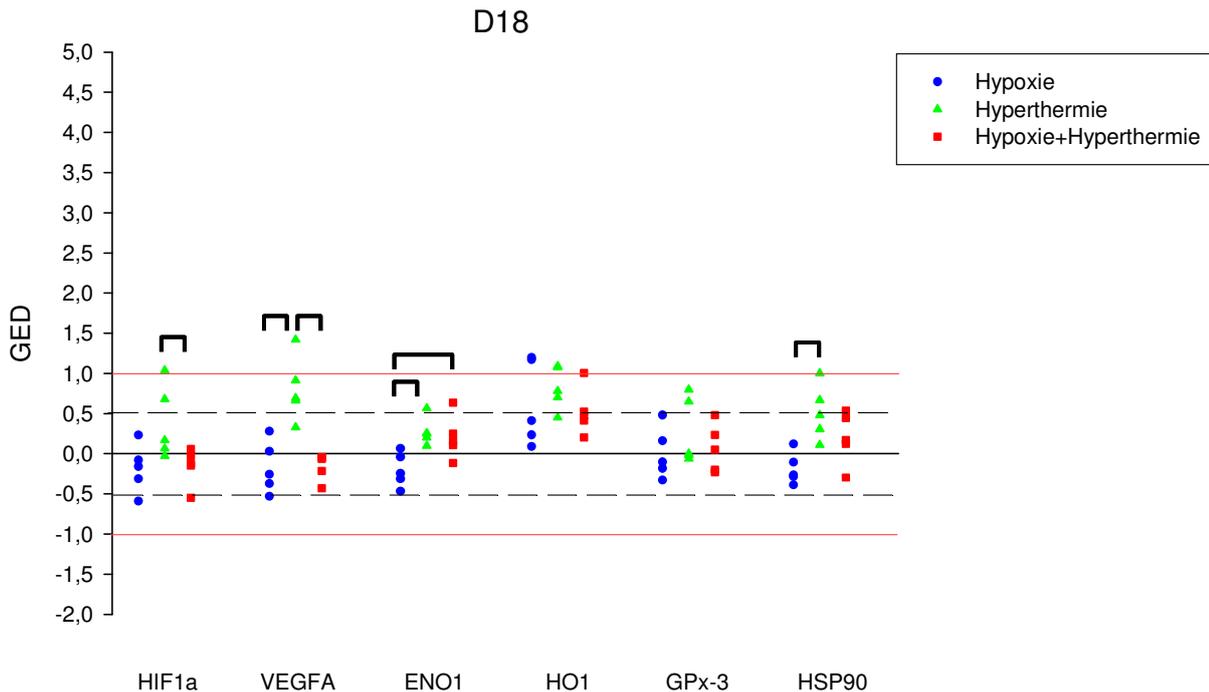
**Abb. 37: Expressionsprofil aller untersuchten Gene am D16.**

Aus Abb. 37 wird ersichtlich, dass die Gene HO1 und HSP90 in der Hypoxiegruppe tendenziell hochreguliert waren. Alle Gene waren in der Hyperthermiegruppe tendenziell hochreguliert. HSP90 war in der Hyperthermiegruppe 1,17fach hochreguliert. Alle Gene mit Ausnahme von GPx-3 waren in der Hypoxie+Hyperthermiegruppe tendenziell hochreguliert. HSP90 war in der Hypoxie+Hyperthermiegruppe 1,33fach gegenüber der Kontrollgruppe hochreguliert.

Die FC-Werte der Hypoxiegruppe lagen bei den Genen HIF1 $\alpha$ , VEGFA und ENO1 unter, alle anderen Werte lagen über den FC-Werten der Kontrollgruppe. Die FC-Werte der Hypoxiegruppe aller Gene bis auf HO1 waren unter den FC-Werten der anderen Versuchsgruppen. Die Hyperthermiegruppe lag mit ihren FC-Werten bei den Genen ENO1, HO1 und GPx-3 über denjenigen der anderen Versuchsgruppen. Bei den Genen HIF1 $\alpha$ , VEGFA und HSP90 lag die Hypoxie+Hyperthermiegruppe mit ihren FC-Werten über den anderen Gruppen, bei HO1 war es die Gruppe mit den niedrigsten FC-Werten.

Die Unterschiede der FC-Werte zwischen den Behandlungsgruppen waren statistisch nicht signifikant.

#### 4.2.2.5. Expression der untersuchten Gene am Inkubationstag D18



**Abb. 38: Expressionsprofil aller untersuchten Gene am D18. Die schwarzen Querbalken signalisieren signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen.**

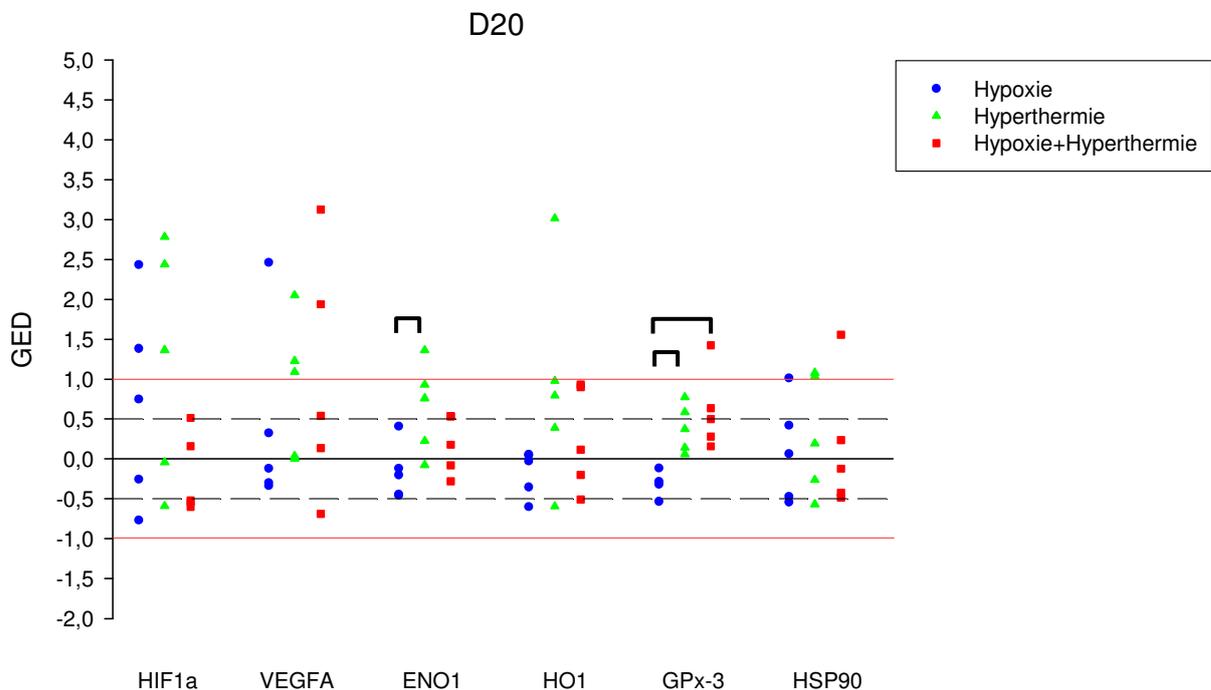
Am D18 kam es, wie Abb. 38 zeigt, zu keinen Genregulationen. Während die FC-Werte der Hypoxiegruppe unter der Kontrollgruppe lagen, befanden sich die FC-Werte der Hyperthermiegruppe aller Gene am D18 über denen der Kontrollgruppe, was auf eine minimale Tendenz zur Hochregulation der Gene gegenüber der Kontrollgruppe hindeutet. Die Gene VEGFA und HO1 waren in der Hyperthermiegruppe tendenziell hochreguliert. Die mRNA-Gehalte des Gens HO1 waren alle über denen der Kontrollgruppe, was für eine minimale Tendenz zur Hochregulation von HO1 in allen Versuchsgruppen gegenüber der Kontrollgruppe spricht.

Die FC-Werte der Hypoxiegruppe lagen bei allen Genen außer HO1 unter denjenigen der Kontrollgruppe. Die FC-Werte der Hyperthermiegruppe befanden sich oberhalb der Kontrollgruppe. Bei der Hypoxie+Hyperthermiegruppe waren nur die FC-Werte von HIF1 $\alpha$  und VEGFA unter denen der Kontrollgruppe. Alle Gene in der Hypoxiegruppe hatten niedrigere FC-Werte als die anderen Versuchsgruppen. Die FC-Werte der Hyperthermiegruppe lagen mit Ausnahme von GPx-3 höher als die der anderen Gruppen. Die Hypoxie+Hyperthermiegruppe hatte bei GPx-3 die höchsten FC-Werte.

Die FC-Werte der Hypoxiegruppe lagen am D18 unter denen der Hyperthermiegruppe. Die Unterschiede waren bei den Genen VEGFA, ENO1 und HSP90 signifikant ( $p < 0,05$ ). Bei den Genen ENO1 und HSP90 lagen die FC-Werte der Gruppe „Hypoxie kombiniert mit Hyperthermie“ über denen der Hypoxiegruppe, bei ENO1 war der Unterschied signifikant

( $p < 0,05$ ). Die FC-Werte der Hypoxie+Hyperthermiegruppe waren bei VEGFA und HIF1 $\alpha$  signifikant ( $p < 0,05$ ) unter denen der Hyperthermiegruppe.

#### 4.2.2.6. Expression der untersuchten Gene am Inkubationstag D20



**Abb. 39: Expressionsprofil aller untersuchten Gene am D20. Die schwarzen Querbalken signalisieren signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen.**

Am D20 war HIF1 $\alpha$  unter hypoxischen Bedingungen tendenziell hochreguliert. Das Gen HIF1 $\alpha$  war um das 1,36fache und VEGFA um das 1,09fache in der Hyperthermiegruppe hochreguliert. Die Gene ENO1 und HO1 waren tendenziell in der Hyperthermiegruppe hochreguliert. Nach der Inkubation unter Hypoxie kombiniert mit Hyperthermie war das Gen VEGFA tendenziell hochreguliert (Abb. 39).

Die FC-Werte in der Hypoxiegruppe lagen bei allen Genen außer HIF1 $\alpha$  und HSP90 unter denen der Kontrollgruppe und waren niedriger als die FC-Werte der anderen Gruppen. Bei HIF1 $\alpha$  und HSP90 waren die FC-Werte in der Hypoxie+Hyperthermiegruppe unter denen der Kontrollgruppe und niedriger als die der anderen Versuchsgruppen. Die Hyperthermiegruppe hatte bei allen Genen mit Ausnahme von GPx-3 höhere FC-Werte als die anderen Gruppen. Bei GPx-3 lagen die FC-Werte der Hypoxie+Hyperthermiegruppe am höchsten.

Der Unterschied des mRNA-Gehalts war zwischen der Hyperthermiegruppe und der Hypoxiegruppe der Gene ENO1 und GPx-3 signifikant höher ( $p < 0,05$ ). Die FC-Werte der Hypoxie+Hyperthermiegruppe der GPx-3 befanden sich ungefähr auf gleicher Höhe mit denjenigen der Hyperthermiegruppe. Die FC-Werte in der Hypoxie+Hyperthermiegruppe waren bei GPx-3 signifikant höher ( $p < 0,05$ ) als in der Hypoxiegruppe.

### 4.3. Zusammenfassung der Ergebnisse

#### 4.3.1. Morphologische Untersuchungen

##### 4.3.1.1. Relative Embryonen- und Herzmassen und relativer Massenverlust

Die **relativen Embryonenmassen** variierten stark je nach Entwicklungstag. Während die Massen der Hypoxiegruppe bis zum D12 eher unter jenen der Kontrollgruppe lagen, nahmen sie bis D16 zu und hatten an D16 die höchsten Massen aller Gruppen. Am D18 sanken die Massen wieder ab, um am D20 etwa auf gleicher Höhe wie bei denen der Kontrollgruppe zu sein. Die Embryonenmassen der Hyperthermiegruppe wuchsen bis D12 an, um von D16 bis D18 die Gruppe mit den niedrigsten Massen zu bilden. Am D20 lagen die Massen etwa auf gleicher Höhe mit der Hypoxiegruppe und der Kontrollgruppe. Die Massen in der Hypoxie+Hyperthermiegruppe waren ab D10 höher als in der Kontrollgruppe. Während die Kontrollgruppe am D16 bezüglich der Embryonenmassen kurz von der Hypoxiegruppe überholt wurde, erhöhte sie ihren Vorsprung gegenüber allen anderen Gruppen bis zum D20. Die **relativen Herzmassen** der Kontrollgruppe waren niedriger als in den Versuchsgruppen. Eine Ausnahme bildete nur D12. In der Hypoxiegruppe lagen die Herzmassen immer über denen der Kontrollgruppe und der Hyperthermiegruppe. Die Hyperthermiegruppe hatte am D12 die niedrigeren Herzmassen gegenüber den anderen Gruppen. Ab D16 waren die Herzmassen höher als in der Kontrollgruppe. Die Herzmassen der Hypoxie+Hyperthermiegruppe lagen mit Ausnahme von D10-24h deutlich über der Kontrollgruppe. An den Tagen D10-24h, D12 und D20 lagen die Herzmassen der Hypoxiegruppe deutlich über denen der Hypoxie+Hyperthermiegruppe. Während die Körpermassen an allen Inkubationstagen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen aufwiesen, waren die Unterschiede der Herzmassen zwischen den Gruppen nur an den Tagen D12, D18 und D20 signifikant.

Die **relativen Massenverluste** der Hühnereier während der Inkubation stiegen in allen Gruppen mit zunehmendem Alter an. Eine Ausnahme bildete nur die Hypoxiegruppe, in der die Massenverluste der Eier am D12 signifikant unter allen anderen Gruppen lag, am D16 über allen anderen Gruppen lag und am D18 unter denen der Hyperthermiegruppe und der Hypoxie+Hyperthermiegruppe. Die Massenverluste der Hyperthermiegruppe lagen über denen der Kontrollgruppe und bis auf D10 und D20 über denen der Hypoxie+Hyperthermiegruppe. Die Massenverluste in der Hypoxie+Hyperthermiegruppe lagen bis auf D10 und D16 über der Kontrollgruppe. Die Massenverluste in der Hypoxie+Hyperthermiegruppe waren am D20 höher als in allen anderen Gruppen und am D12 und D18 signifikant über und am D16 signifikant unter der Hypoxiegruppe.

##### 4.3.1.2. Mortalität und Missbildungen

Über die Hälfte aller Hühnerembryonen überlebten die Inkubation unter O<sub>2</sub>-Mangel und/oder erhöhter Temperatur nicht. Anfängliche Versuche mit einer Temperatur von 40°C in den

Gruppen der Hyperthermie und der Hypoxie+Hyperthermie führten während der Stressinkubation von D6-12 fast zu einer 100%igen Sterblichkeit der Hühnerembryonen. Deshalb wurde die Temperatur in diesen Gruppen umgehend auf 39,5°C gesenkt und die Dauer der Beeinflussung durch die Stressoren von D6-12 auf D8-12 verkürzt. Die größten Verluste waren in der Hyperthermiegruppe (ca. 40%), gefolgt von der Hypoxie+Hyperthermiegruppe (ca. 35%) zu beobachten. Die Hypoxiegruppe wies eine Mortalität von ca. 20% auf. Die meisten Hühnerembryonen starben während der Stressinkubation zwischen den Tagen D6-12 bzw. D8-12. Die Embryonen der Hyperthermiegruppe wiesen auch nach der Stressinkubation eine erhöhte Sterblichkeit auf. Die Hypoxie- und die Hypoxie+Hyperthermiegruppe zeigten einen ähnlichen Verlauf bezüglich der Bebrütungstage, an denen die Embryonen starben. Die meisten Missbildungen traten in der Hypoxiegruppe auf, die Hyperthermiegruppe und die Hypoxie+Hyperthermiegruppe zeigten gleich große Anteile an missgebildeten Embryonen. Die Embryonen waren zudem auffallend mehr durchblutet als die Kontrolltiere.

#### **4.3.2. Molekulargenetische Untersuchungen**

##### **4.3.2.1. Übersicht der Expression der untersuchten Zielgene**

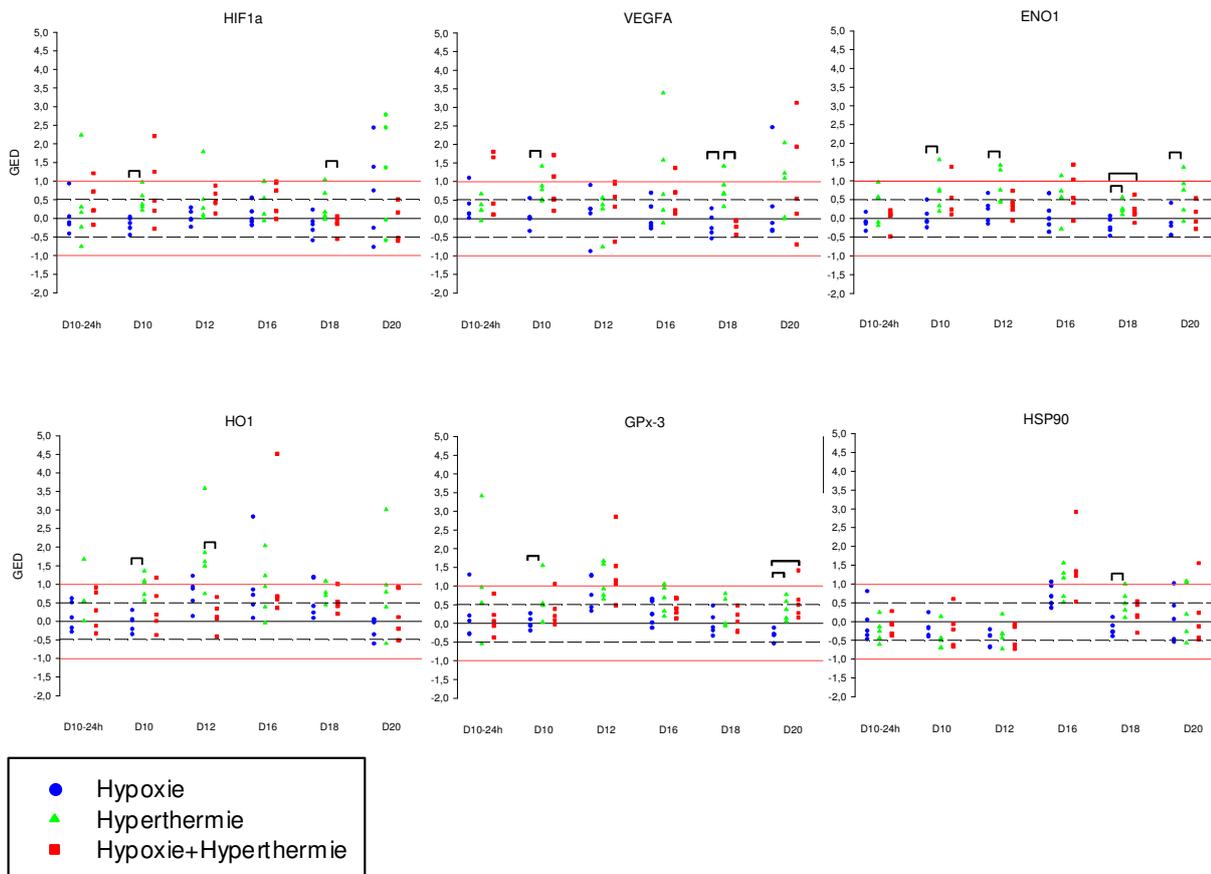
Wie in Abb. 40 zu sehen ist, gibt es in fast allen Genexpressionsprofilen Ausreißer. Die untersuchten Gene weichen an allen untersuchten Tagen nach der Inkubation von D6-12 unter **15%IGER CHRONISCHER HYPOXIE** tendenziell weniger von der Kontrollgruppe ab als in den anderen Versuchsgruppen. Die FC-Werte der untersuchten Gene liegen fast immer niedriger als in den anderen Gruppen. Über die Hälfte aller FC-Werte in der Hypoxiegruppe sind kleiner als diejenigen der Kontrollgruppe.

Die Gene, die von D8-12 unter **CHRONISCHER HYPERTHERMIE (39,5°C)** bebrütet wurden sind im Vergleich zu den anderen Behandlungsgruppen an allen untersuchten Tagen am häufigsten signifikant hochreguliert. Es zeigen sich zudem mehr Tendenzen zur Hochregulation als in den anderen Versuchsgruppen. Fast alle FC-Werte aller Gene in der Hyperthermiegruppe liegen über denen der Kontrollgruppe.

Die Hypoxie+Hyperthermiegruppe weist nach der Inkubation von D8-12 unter **CHRONISCHER HYPOXIE UND HYPERTHERMIE** bei zwei Genen eine Hochregulation auf und ist weniger oft tendenziell hochreguliert als unter alleiniger Hyperthermie. Die FC-Werte der Hypoxie+Hyperthermiegruppe sind meist höher als die der Hypoxiegruppe aber zum Großteil niedriger als die der Hyperthermiegruppe. Die FC-Werte liegen mehrheitlich über denen der Kontrollgruppe, wenn auch nicht so häufig wie diejenigen der Hyperthermiegruppe.

Die Gene **HIF1 $\alpha$**  und **VEGFA** sind am D20 in der Hyperthermiegruppe hochreguliert. Das Gen **HO1** ist an D10 und D12 in der Hyperthermiegruppe hochreguliert. **GPx-3** ist am D12 in

der Hypoxie+Hyperthermiegruppe hochreguliert. Eine Hochregulation des Gens **HSP90** findet am D16 in der Hyperthermiegruppe und der Hypoxie+Hyperthermiegruppe statt.



**Abb. 40: Expression aller Zielgene während der unterschiedlichen Entwicklungsstadien im Überblick. Die schwarzen Querbalken signalisieren signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen.**

#### 4.3.2.2. Übersicht über die Genexpressionen an den Inkubationstagen

Wie Abb. 41 zeigt, gab es an fast allen Inkubationstagen Ausreißer. Am **D10-24h**, an dem die Behandlungsgruppen nur für 24h den entsprechenden hypoxischen bzw. hyperthermischen Bedingungen ausgesetzt waren, lagen die mRNA-Gehalte der Versuchsgruppen sehr dicht beieinander und an der Kontrollgruppe. Die FC-Werte der Hyperthermiegruppe und der Hypoxie+Hyperthermiegruppe lagen über denen der Hypoxiegruppe. Die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant.

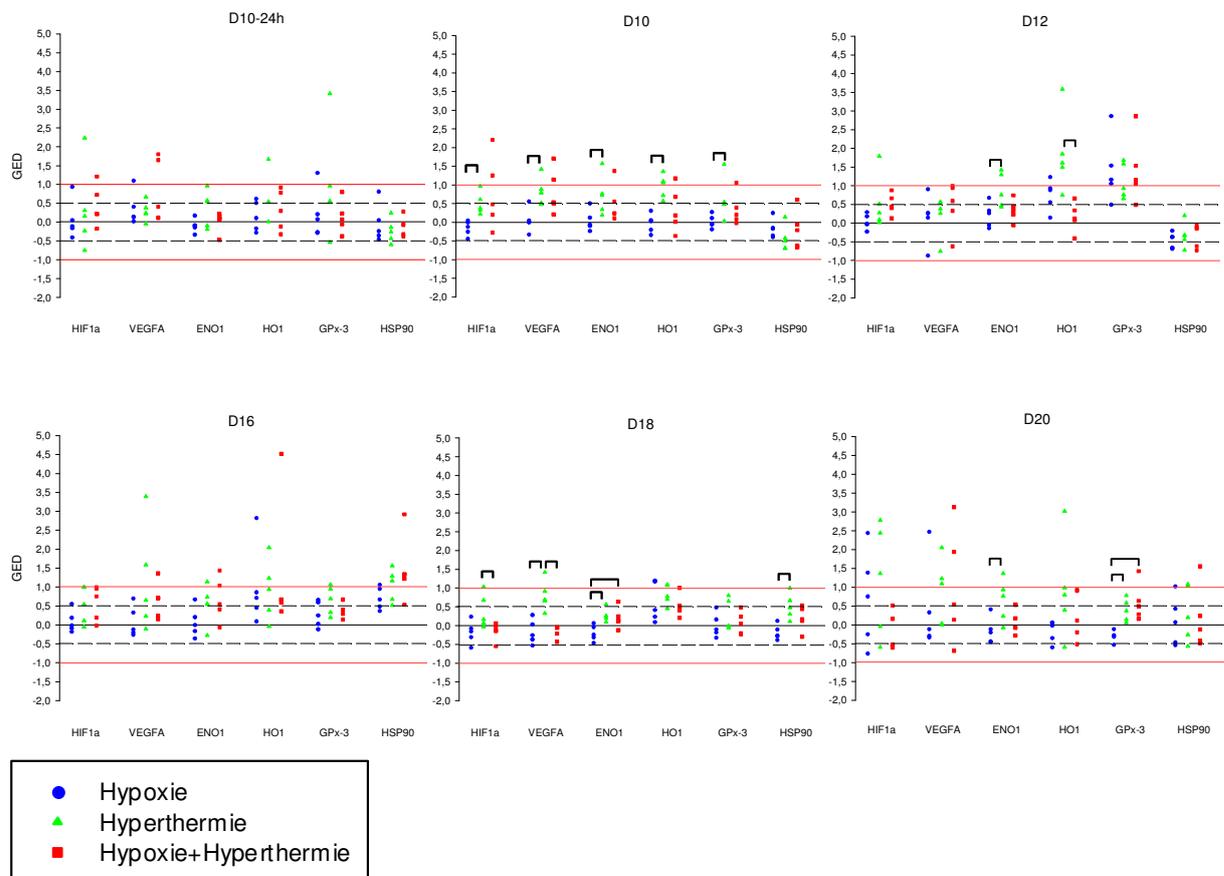
Ab **TAG D10**, bei dem die Versuchsgruppen schon seit dem D6 bzw. D8 unter O<sub>2</sub>-Mangel und/oder Hyperthermie bebrütet wurden, wurden die Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen deutlich. Die FC-Werte der Hyperthermiegruppe lagen über denen der Hypoxie+Hyperthermiegruppe und bei fast allen Genen bis auf HSP90 signifikant höher als in der Hypoxiegruppe. Das Gen HO1 war in der Hyperthermiegruppe hochreguliert.

Am **TAG D12**, an dem die Hühnerembryonen am längsten (vom D6-12 bzw. D8-12) den Versuchsbedingungen unterworfen wurden, waren die Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen am deutlichsten. Die FC-Werte der Hypoxiegruppe waren niedriger als

die der anderen Gruppen. Am D12 war eine Hochregulation von HO1 in der Hyperthermiegruppe und von GPx-3 in der Hypoxie+Hyperthermiegruppe zu verzeichnen.

An **D16, D18 UND D20**, bei denen alle Versuchsgruppen nach der Phase der Stressbebrütung vom D6-12 unter Normoxie und Normothermie bebrütet wurden, war weiterhin ein Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen sichtbar. Alle Gene der Hypoxiegruppe wiesen an den Tagen D16, D18 und D20 die niedrigsten FC-Werte auf. Die FC-Werte lagen oft unter denjenigen der Kontrollgruppe. Am D16 waren die Gene in der Hyperthermiegruppe und in der Hypoxie+Hyperthermiegruppe tendenziell hochreguliert, die Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen waren aber nicht signifikant. HSP90 war in der Hyperthermiegruppe und in der Hypoxie+Hyperthermiegruppe hochreguliert.

Bis auf die Hochregulation von HIF1 $\alpha$  und VEGFA in der Hyperthermiegruppe am D20 gab es am D18 und D20 gegenüber der Kontrollgruppe keine großen Unterschiede. Am D10-24h, an dem die Behandlungsgruppen nur für 24h den entsprechenden hypoxischen bzw. hyperthermischen Bedingungen ausgesetzt waren, lagen die mRNA-Gehalte der Versuchsgruppen sehr dicht beieinander und an der Kontrollgruppe. Die FC-Werte der Hyperthermiegruppe und der Hypoxie+Hyperthermiegruppe lagen über denen der Hypoxiegruppe. Die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant.



**Abb. 41: Übersicht über die Expression der untersuchten Gene aufgeteilt nach den unterschiedlichen Entwicklungsstadien in Hinblick auf die zu untersuchenden Gene. Die schwarzen Querbalken signalisieren signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen.**

#### 4.3.2.3. Tabellarische Übersicht der Genregulationen

Die Genregulationen in Tab. 3 sind nach den GOIs (Gene of Interest) sortiert mit Angabe des Medians der FC-Werte, nachdem die Ergebnisse beurteilt wurden. Das arithmetische Mittel

GOI	Inkubationstag und Gruppe	FC (Median)
HIF1a	D16 G2	0,54
HIF1a	D16 G3	0,75
HIF1a	D20 G1	0,75
<b>HIF1a</b>	<b>D20 G2</b>	<b>1,36</b>
VEGFA	D10 G2	0,78
VEGFA	D10 G3	0,54
VEGFA	D12 G3	0,59
VEGFA	D16 G2	0,65
VEGFA	D16 G3	0,71
VEGFA	D18 G2	0,69
<b>VEGFA</b>	<b>D20 G2</b>	<b>1,09</b>
VEGFA	D20 G3	0,54
ENO1	D10-24h G2	0,55
ENO1	D10 G2	0,73
ENO1	D12 G2	0,76
ENO1	D16 G2	0,56
ENO1	D16 G3	0,54
ENO1	D20 G2	0,76
HO1	D10-24h G2	0,54
<b>HO1</b>	<b>D10 G2</b>	<b>1,06</b>
HO1	D12 G1	0,88
<b>HO1</b>	<b>D12 G2</b>	<b>1,61</b>
HO1	D16 G1	0,71
HO1	D16 G2	0,94
HO1	D16 G3	0,66
HO1	D18 G2	0,78
HO1	D20 G2	0,79
GPx-3	D10-24h G2	0,55
GPx-3	D12 G1	0,76
GPx-3	D12 G2	0,93
<b>GPx-3</b>	<b>D12 G3</b>	<b>1,16</b>
GPx-3	D16 G2	0,69
HSP90	D16 G1	0,67
<b>HSP90</b>	<b>D16 G2</b>	<b>1,17</b>
<b>HSP90</b>	<b>D16 G3</b>	<b>1,33</b>

und die Standardabweichung der FC-Werte sind im Anhang aufgelistet (9.8.5)

Alle aufgelisteten FC-Werte waren erhöht gegenüber der Kontrollgruppe, also (tendenzielle) Hochregulationen. Es fiel auf, dass die meisten Genregulationen in der Hyperthermiegruppe stattfanden. Die Hypoxie+Hyperthermiegruppe wies nur halb so viele hochregulierte Gene auf. Die Hypoxiegruppe war nur halb so oft wie die Hypoxie+Hyperthermiegruppe auf der mRNA-Ebene verändert gegenüber der Kontrollgruppe.

An den Tagen D10-24h und D18 waren am wenigsten Gene in den Versuchsgruppen reguliert. D12 und vor allem D16 waren die Tage, an denen die meisten Veränderungen auf der Transkriptionsebene in allen Gruppen gemessen wurden. Die Gene HO1 und VEGFA waren nach der Inkubation unter chronischer Hypoxie und/oder Hyperthermie am häufigsten reguliert. Bei VEGFA und ENO1 waren nur die Hyperthermiegruppe und die Hypoxie+Hyperthermiegruppe von den Genregulationen betroffen. Während GPx-3 nur bis zum D16 Genregulationen aufwies, war das Gen HIF1 $\alpha$  nur an D16 und D20 reguliert. HSP90 war nur am D16 dafür in allen Versuchsgruppen hochreguliert.

**Tab. 3: Genregulationen – Übersicht über alle tendenziellen Hochregulationen und Hochregulationen (fett) der „Genes of Interest“, FC=„Fold change“, G1=Hypoxiegruppe, G2=Hyperthermiegruppe, G3=Hypoxie+Hyperthermiegruppe**

## 5. Diskussion

### 5.1. Auswahl der Probenstage

Die Probennahme am **10. Inkubationstag** nach nur **24-stündiger** Beeinflussung vom D9-10 mit den Stressoren Hypoxie und/oder Hyperthermie (**D10-24h**) sollte über deren Wirkung auf mRNA-Ebene im Unterschied zur mehrtägigen Beeinflussung der Versuchsgruppen Aufschluss geben.

**Inkubationstag 10 (D10)** wurde gewählt, falls die Änderungen auf transkriptioneller Ebene mehrere Tage in Anspruch nehmen sollten. Das Maximum der Ausbreitung der Oberfläche der CAM ist nach Starck und Ricklefs (1998) am D10 erreicht. Das Herz ist zu dieser Zeit vermutlich fähig, auf veränderte Bedingungen zu reagieren.

Ab dem **12. Inkubationstag (D12)** ist eine funktionierende parasympathische Innervierung des Herzens ausgebildet (Kirby und Stewart, 1986; Pappano und Loffelholz, 1974). Am D12 bedeckt die CAM die innere Schalenmembran vollständig, eine weitere Ausdehnung ihrer Oberfläche ist nicht mehr möglich (Ackerman und Rahn, 1981; Freeman und Vince, 1974).

**Inkubationstag 16 (D16):** Ab dem D14 entwickelt sich die glykogenbildende Funktion der embryonalen Leber (Romanoff, 1960). Der Embryo ist also am D16 schon zunehmend zur aeroben Energiegewinnung fähig. Die funktionierende sympathische Innervierung ab D16 (Kirby und Stewart, 1986) schließt den Regelkreis der neuralen Kontrolle des Herzens. Erst im letzten Viertel (ab D16) der Inkubation ist ein adrenerger Tonus vorhanden, der auf der steigenden Konzentration der im Blut zirkulierender Katecholamine beruht (Crossley und Altimiras, 2000). Die Proben, die am D16 genommen wurden, waren seit dem D13 ohne Beeinflussung äußerer Stressoren. Sie unterlagen der fortschreitenden physiologischen Hypoxie, die sich im Hühnerembryo nach dem Ende der Ausbildung der CAM entwickelt, da die Permeabilität für O<sub>2</sub> über die Eischale und deren Membranen nur langsam zunimmt (Freeman und Vince, 1974).

Das Maximum der ab dem D13 zunehmenden physiologischen Hypoxie tritt bei normoxisch bebrüteten Hühnerembryonen am **Inkubationstag D18** vor dem Internal Pipping (IP) auf. Blutgaswerte, die ab D13 einen sinkenden PO<sub>2</sub> aufwiesen, bestätigen dies. Liegt der PO<sub>2</sub> am D10 noch bei 83,5 mmHg (ca. 11,11 kPa), so sinkt er bis auf 57,2 mmHg (ca. 7,61 kPa) am D18 (Tazawa *et al.*, 1971).

Am **Inkubationstag D20** atmet der Embryo über die Lunge. Der Gasaustausch findet nicht mehr über Diffusion sondern über Konvektion statt (Romanoff, 1960; Tullett und Burton, 1985). Der Embryo befindet sich nach dem IP allerdings weiterhin in einer zunehmenden hypoxischen Umgebung bis zum External Pipping (EP). Druyan *et al.* (2007) fanden eine Hochregulation von HIF1 $\alpha$  und HO1 während dieser Phase bei normoxisch bebrüteten Hühnerembryonen. Die adrenerge Beeinflussung des Herzens erreicht die maximale

Konzentration an zirkulierendem Adrenalin und Noradrenalin an D19-20 (Crossley und Altimiras, 2000; von Blumröder und Tönhardt, 2002; Wittmann und Prectl, 1991).

## 5.2. Einfluss der Stressoren auf die morphologischen Parameter

### 5.2.1. Einfluss der Stressoren auf die Embryonen- und Herzmassen und den Massenverlust

Die Schlupfmasse ist ein konstanter Anteil der Eimasse. Alle Eier verlieren während der Inkubation den gleichen Anteil an Wasser (beim Huhn ca. 16%) und der Embryo inkorporiert bis zum Schlupf das Dotter und das Albumen. Der Verlust einer angemessenen Menge an Wasser ist für die physiologische Entwicklung wichtig. Zu hohe Wasserverluste führen zum Tod durch Austrocknung (Mortola, 2009). Die großen Streuungen innerhalb der Embryonenmassen sind im Wesentlichen auf die unterschiedlichen Eigrößen und –massen vor der Inkubation zurückzuführen, obwohl die Eier von der gleichen Herde und gleichaltrigen Muttertieren abstammten. Um eine bessere Vergleichbarkeit zur Beurteilung der Körper- und Herzmasse zu erreichen, wurden die relativen Körpermassen im Vergleich zu den Eimassen vor der Inkubation berechnet. Gleichzeitig wurde der Massenverlust der verschiedenen Gruppen bestimmt, um den prozentualen Massenverlust innerhalb der Gruppen beurteilen zu können.

Nach einem anfänglichen Anstieg sank die relative Herzmasse der **KONTROLLGRUPPE** bezüglich der Körpermasse mit zunehmendem Wachstum des Embryos vergleichbar mit den in der Literatur beschriebenen Verläufen (Romanoff, 1960) (Abb. 17 und Abb. 18). Es besteht eine signifikante Korrelation zwischen dem Wachstum des Embryos und seinen Organen. Die Organe wachsen generell proportional mit dem Gesamtkörper. Der größte Unterschied des Massenverlustes zwischen D18 und D20 in der Kontrollgruppe (Abb. 21) stimmt mit dem von Mortola (2009) beobachteten drastisch steigenden Wasserverlust ab dem EP überein.

Die **CHRONISCHE 15%IGE HYPOXIE** für nur 24h von D9 bis D10 führte zu erhöhten Körper- und Herzmassen am D10-24h gegenüber denen der Kontrollgruppe und der Hyperthermiegruppe (Abb. 17 und Abb. 19). Der erhöhte Massenverlust unter chronischer Hypoxie am D10-24h weist auf eine hypermetabolische Antwort hin, die nur bei längerer Exposition bei O<sub>2</sub>-Mangel in eine hypometabolische Antwort des Embryos übergeht (Abb. 21). Die Erhöhung der Embryonen- und Herzmassen ist außerdem auf eine Hypoxie-bedingte **Umverteilung des Blutes** von Dottersackkreislauf und Allantoiskreislauf zugunsten des Körperkreislaufs zurückzuführen. Für diese Hypothese spricht, dass die Embryonen- und Herzmassen am D10 nach mehr als 24h sich nicht von denen der Kontrollgruppe unterschieden. Die chronische 15%ige Hypoxie während der Tage D6-12 bewirkte eine **Hypoxie-induzierte hypometabolische Wachstumsverzögerung** am D12, was durch den signifikant

verringerten Massenverlust bestätigt wird (Abb. 22). Hühnerembryonen, die von D6-12 chronischer Hypoxie ausgesetzt wurden, hatten in den Versuchen von Dzialowski *et al.* (2002) eine reduzierte Körpermasse. Zu den Langzeiteffekten des Hypoxie-induzierten Hypometabolismus zählen eine Reduktion des Organwachstums und eine geringere Geburtsmasse (Mortola, 2004). Die **erhöhte relative Herzmasse** an allen Tagen bis auf D10 (Abb. 19) stimmt mit früheren Ergebnissen überein (Dzialowski *et al.*, 2002). Dabei wurde festgestellt, dass der Wasseranteil weder in den Embryonen noch in deren Herzen von der normoxisch bebrüteten Gruppe abwich. Neueste Untersuchungen von Jonker *et al.* (2010) wiesen bei Schaffeten nach, dass chronische Anämie zu einer Erhöhung der fetalen Herzmasse führte. Diese massive Volumenerhöhung (39%) des Muskels durch Kardiomyozytenwachstum, beruhend auf der Vergrößerung, der Enddifferenzierung und der Proliferation der Kardiomyozyten, kann auch für die eigenen vergrößerten Hühnerherzen angenommen werden. Nach Ende des hypoxischen Einflusses führte die folgende **hypermetabolische Phase** zu einem **kompensatorischen Wachstum**, bestätigt durch den höheren Massenverlust. Dadurch lagen die relativen Körpermassen der Hypoxiegruppe am D16 signifikant über allen anderen Gruppen inklusive der Kontrollgruppe. Dieser Befund stimmt mit denen von Mortola (2004) überein. Das erneute Absinken der relativen Körpermassen am D18 und der verringerte Massenverlust unter jene der Kontrollgruppe (Abb. 17) ist auf die **steigende physiologische Hypoxie** am Ende der Inkubation zurückzuführen. Der Beginn der Lungenatmung um den D19 und das Anpicken erst der inneren Membran und dann der Eischale sind das natürliche Ende der physiologischen Hypoxie und erklären das Aufholen der Körpermassen auf das Niveau der Kontrollgruppe am D20. Zudem nimmt der Embryo während des Schlupfes die Reste des Dotters auf, wodurch sich die Massen der Embryonen am D20 der Kontrollgruppe angleichen.

Die **CHRONISCHE HYPERTHERMIE VON 39,5°C** hatte am D10 innerhalb von 24h keine Auswirkung auf die Körpermasse der Embryonen. Während der Tage D8-12 bewirkte Hyperthermie eine **Erhöhung der relativen Embryonenmassen** (Abb. 17) wie auch in der Literatur beschrieben (Boehm *et al.*, 1987; von Blumröder und Tönhardt, 2002). **Hyperthermisch bebrütete Embryos erreichten früher die entsprechenden Entwicklungsstufen** (Burggren, 1998). Das beschleunigte Wachstum und die Erwärmung während der ektothermen Entwicklungsphase des Embryos führten zu einem erhöhten O<sub>2</sub>-Bedarf und damit zu einer erhöhten Herzleistung. Übereinstimmend kam es bis auf D12 zu **erhöhten relativen Herzmassen** gegenüber der Kontrollgruppe. Dass die relativen Herzmassen unter denen der Hypoxiegruppe lagen, deutet darauf hin, dass das Herz die chronische Hyperthermie schlechter kompensieren kann als eine chronische Hypoxie. Das vermehrte Wachstum wurde auch durch den erhöhten Massenverlust am D12 belegt (Abb. 21). Der höhere Massenverlust bei höheren Temperaturen entsteht durch Wasserverlust

(Okuda und Tazawa, 1988). Die vermutete erhöhte Diffusion der Atemgase und des Wassers war aber nicht so markant wie erwartet. Die Hyperthermie hatte während der ektothermen Phase **auf die weitere Entwicklung des Embryos nachteilige Effekte**. Am D12 lag die Herzmasse signifikant unter allen anderen Gruppen. Die Belastungsinkubation von D8-12 konnte vom embryonalen Herzen nicht kompensiert werden. Die physiologisch steigende Hypoxie im Embryo führte unter **Hyperthermie zu einer Wachstumsverzögerung** gegenüber den anderen Gruppen am D16 und D18 und brachte den embryonalen Organismus an den Rand seiner Leistungsfähigkeit. Möglicherweise versetzte die physiologisch zunehmende Hypoxie den embryonalen Organismus mehr als in den anderen Gruppen in eine hypometabolische Stoffwechsellage, die die Wachstumsverzögerung erklären könnte. Nach Romanoff (1972) sinkt der  $O_2$ -Verbrauch bei hyperthermisch bebrüteten Embryonen durch eine Verlangsamung des Stoffwechsels ab. Gegen einen Hypometabolismus und einen geringeren  $O_2$ -Verbrauch sprechen die generell durch erhöhte Temperaturen **beschleunigte Reaktionsgeschwindigkeit chemischer Reaktionen** (Kap. 1.5.4.). Auch die erhöhten Massenverluste in der Hyperthermiegruppe am D18 sprechen für einen besonders hohen metabolischen Umsatz. Die Tatsache, dass sich die Körpermassen am D20 nicht von der Kontrollgruppe unterschieden, lag vermutlich an der beschleunigten Entwicklung während der hyperthermischen Phase. Die Ergebnisse stimmen überein mit den Untersuchungen von Romanoff (1972), der bei langzeitigen Temperaturerhöhungen ( $39,5^\circ\text{C}$ ) am Anfang der Inkubationsperiode ein beschleunigtes Wachstum und am Ende eine Verlangsamung beobachtete.

Der Einfluss der **CHRONISCHEN 15%IGEN HYPOXIE GEPAART MIT DER CHRONISCHEN HYPERTHERMIE VON  $39,5^\circ\text{C}$**  für nur 24h von D9 bis D10 führte zu leicht höheren embryonalen Massen am D10-24h gegenüber der Kontrollgruppe und der Hyperthermiegruppe. Die gleichzeitig niedrigeren Massenverluste sprechen gegen einen Hypermetabolismus. Eine **Umverteilung des Blutflusses zugunsten des Körperkreislaufs** ist anzunehmen. Die Embryonenmassen lagen aber unter denen der Hypoxiegruppe. Bis auf D10-24h waren die Unterschiede gegenüber der Kontrollgruppe signifikant, was auf die **beschleunigte Entwicklung der Embryonen** durch die erhöhten Temperaturen zurückzuführen ist. Die durch die Hypoxie ausgelöste Antwort im Stoffwechsel führte trotz der erhöhten Temperatur während mehrerer Tage zu einer **reduzierten Stoffwechselrate im Vergleich zur reinen Hyperthermiegruppe** (Abb. 17). Das stimmt mit den niedrigeren Massenverlusten im Vergleich zur alleinigen Hyperthermiegruppe am D12 überein (Abb. 21). Die Messung des pH-Werts im Blut von Hühnerembryonen unter gleichen Versuchsbedingungen in der eigenen Arbeitsgruppe bestätigt diese Annahme. Alle Versuchsgruppen hatten niedrigere pH-Werte als die Kontrollgruppe am D12. Die niedrigsten pH-Werte am D12 zeigten sich in der Hyperthermiegruppe. In der Hypoxiegruppe und in der Hypoxie+Hyperthermiegruppe

waren die Werte vergleichbar (Tab. 4, Feske, 2009). Die Absenkung des pH-Werts entsteht aufgrund einer erhöhten anaeroben Energiegewinnung. Nach Beendigung der Belastungsinakubation lagen die relativen Körpermassen am Inkubationstag D16 noch leicht unter denen der reinen Hypoxiegruppe und signifikant über denen der Kontrollgruppe und Hyperthermiegruppe. Die geringen Massenverluste am D16 in der Hypoxie+Hyperthermiegruppe sprechen dafür, dass **kein Hypermetabolismus** wie in der alleinigen Hypoxiegruppe stattfand. Ab dem D18 und D20 lagen die relativen Körpermassen signifikant über allen anderen Gruppen. Die gleichzeitig höheren Massenverluste deuten hin auf eine durch die erhöhten Temperaturen beschleunigte Entwicklung der Embryonen (Burggren, 1998) oder weniger wahrscheinlich auf einen hypermetabolischen Effekt nach Ende der Belastungsinakubation durch die Hypoxie (Mortola, 2004). Gegenüber der Kontrollgruppe wiesen die Herzen erhöhte relative Massen auf. Die Erhöhung der Herzfrequenz (Khandoker *et al.*, 2004), der veränderte vaskuläre Widerstand und die modifizierte Verteilung des Blutflusses zugunsten des Herzens und des Gehirns (Crossley *et al.*, 2003), führen auf Dauer zu **einem vergrößerten Herzen bzw. relativen Herzmassen**. Das Herz unter chronischer Hyperthermie kombiniert mit chronischer Hypoxie hat eine höhere Kompensationsfähigkeit als unter alleiniger chronischer Hyperthermie, was aus den höheren Herzmassen geschlussfolgert werden kann. Die größte Anpassungsfähigkeit besitzt das embryonale Herz bei alleiniger chronischer Hypoxie.

Das Vergleichen spezifischer Organmassen zu festen Zeitpunkten der Entwicklung zwischen normoxischen und hypoxischen Embryonen, birgt nach Azzam und Mortola (2007) die Gefahr einer Fehlinterpretation, da Embryonen unter Hypoxie eine veränderte Wachstumsrate haben und die spezifischen Organmassen während der Entwicklung variieren. Ihre Methode, die Organmassen anhand der Körpermassen und nicht nach dem Alter zu beurteilen, ergab nur minimale Effekte der Hypoxie auf das Wachstum spezifischer Organe. Sie schlossen daraus, dass die Unterschiede zwischen den Organmassen, die zu jedem Entwicklungsstadium zu beobachten sind, zum größten Teil dem gehemmten Wachstum zuzuschreiben sind. Nach Azzam und Mortola (2007) sind die energiesparenden und schützenden Effekte der O<sub>2</sub>-Versorgung (z. B. Abfall der Thermogenese, periphere Vasokonstriktion, erhöhte pulmonare Ventilation, erhöhtes Herzminutenvolumen und erhöhter Hämatokrit), die bei erwachsenen oder jungen postnatalen Organismen auftreten, in der frühen embryonalen Phase minimal oder gar nicht wirksam. Die vegetative Kontrolle des Blutflusses kommt erst in der zweiten Hälfte der Inkubation zum Einsatz (Mulder *et al.*, 1998; Mulder *et al.*, 2002). Die Hauptüberlebensstrategie des Embryos bei Hypoxie ist das reduzierte Körperwachstum. Durch gleichzeitiges verspätetes Organwachstum wird ein Schutz der Schlüsselorgane, wie z. B. Herz und Gehirn, erreicht. Ein langsames Wachstum impliziert, dass diese Organe für einen längeren Zeitraum einen größeren Teil der

relativen Körpermasse ausmachen (Azzam und Mortola, 2007). Das posthypoxische hypermetabolische Wachstum konnte in diesen früheren Versuchen weder für den ganzen Embryo noch für die einzelnen Organe bis auf die Niere bestätigt werden. Da in den Versuchen von Azzam und Mortola (2007) die Embryonen fast doppelt so lang einem hypoxischen Einfluss im Vergleich zu den eigenen Versuchen ausgesetzt waren, sind die Ergebnisse nicht miteinander vergleichbar. Die deutlich höheren relativen Embryonenmassen in den eigenen Versuchen am D16 in der Hypoxiegruppe gegenüber der Kontrollgruppe und der deutlich höhere Massenverlust der hypoxisch inkubierten Hühnerembryonen im Vergleich zu allen anderen Gruppen sind ohne das hypermetabolische Wachstum kaum zu erklären. Die signifikant geringeren relativen Körpermassen in der Hypoxiegruppe gegenüber der Kontrollgruppe am D12 lassen annehmen, dass die Hypoxie während der Inkubation zu einer Wachstumsverzögerung führte. Der aufgrund dieser Wachstumsverzögerung angenommene Hypoxie-induzierte Hypometabolismus und die entstehende hypermetabolische Phase am D16 sind folglich eine nachvollziehbare Erklärung.

### **5.2.2. Einfluss der Stressoren auf die Entstehung von Missbildungen und auf die Mortalität**

Das Wachstum des Embryos folgt der ontogenetischen Allometrie. Die Ausbildung der entsprechenden funktionierenden anatomischen Strukturen ist für das Überleben essentiell. Die Versuchsbedingungen in dieser Studie führten bei 8,25% aller Embryonen zu Missbildungen. Die meisten Missbildungen waren bei Embryonen in der Hypoxiegruppe zu beobachten, gefolgt von denen der Hyperthermiegruppe und der Hypoxie+Hyperthermiegruppe. Auch in der **KONTROLLGRUPPE** kam es zu Missbildungen. Der damit einhergehende Funktionsverlust von Organen und Organsystemen ist der wesentliche Grund für die hohe Mortalität. Die Embryonensterblichkeit lag in der Kontrollgruppe bei 6,31% (Abb. 23).

Die Mortalität bei **CHRONISCHER 15%IGER HYPOXIE** war um das 3fache gegenüber der Kontrollgruppe erhöht (Abb. 23). Die Lebensfähigkeit verhält sich proportional zum O<sub>2</sub>-Gehalt. Die niedrigere Mortalität im Gegensatz zu den anderen Versuchsgruppen ging mit einer erhöhten Rate an Missbildungen einher. Die nicht vollständige Schließung der Bauchdecke als häufigste Missbildung wurde vermutlich durch die Umverteilung des Blutes zugunsten der O<sub>2</sub>-sensitiven Organe (=Zentralisierung) verursacht (Crossley *et al.*, 2003). **Anomalitäten der Koronararterien** sind eine weitere mögliche Ursache wie bei milder chronischer Hypoxie beobachtet (Nanka *et al.*, 2008). Sind die Anomalien nicht lebensbedrohlich, induzieren sie veränderte Blutflussmuster und erhöhen die Disposition für Herzkranzgefäßkrankheiten (Wikenheiser *et al.*, 2009).

Die **CHRONISCHE HYPERTHERMIE** führt bei Hühnerembryonen nach den Erkenntnissen von Klemm (2002) und Romanoff (1972) nicht nur zu einem verfrühten Schlupf, sondern auch zu

einer gesteigerten Anzahl an Fehllagen und Missbildungen verbunden mit erhöhter Mortalität (6fach höher gegenüber der Kontrollgruppe, Abb. 23). Die Inkubation der Hühnerembryonen bei 40°C führte zu einer fast 100%igen Mortalität übereinstimmend mit Versuchen von Romanoff (1972). Die Hyperthermie-induzierte **Zentralisierung** führt zu einem **ungleichen Wachstum** der Organe, das auf Dauer für das Überleben des Gesamtorganismus nicht kompatibel ist (Mortola, 2004). Die Versuche von French (1998) an Puteneiern zeigten, dass im zweiten Viertel der Inkubationsperiode hyperthermisch bebrütete Embryonen die niedrigste Schlupfrate haben. Der negative Effekt erhöhter Temperaturen steigt mit der Dauer der Exposition. Ab fünf Tagen Bebrütung bei 38,5°C sank die Schlupfrate signifikant. Am empfindlichsten waren die Embryonen, die von D6-12 erhöhten Temperaturen ausgesetzt waren. Auch in den eigenen Versuchen starben fast alle Embryonen bei einer Inkubation bei 39,5°C von D6-12. Die Hyperthermiegruppe stach zudem mit einer 24%igen Sterblichkeit nach D12 aus den anderen Gruppen heraus (Abb. 24). Das Überleben der Hühnerembryos ist mit der Erhaltung eines Kohlenhydratreservoirs verbunden. Hyperthermisch bebrütete Embryonen sind unfähig, das External Pipping abzuschließen. Nach Christensen (2001) liegt die Ursache in der ungenügenden Akkumulation von Glykogen in der Leber und dem Musculus complexus. Die in der eigenen Arbeitsgruppe von Feske (2009) gemessenen Glukosewerte bestätigen diese Vermutung. Am D18 und D20 waren die Blutglukosewerte bei den Embryonen der Hyperthermiegruppe niedriger als in allen anderen Gruppen (Tab. 4, Feske, 2009).

Die **KOMBINIERTE CHRONISCHE 15%IGE HYPOXIE MIT DER CHRONISCHEN HYPERTHERMIE VON 39,5°C** führte zu einer erhöhten Rate an Missbildungen (Abb. 26) und zu einer mehr als 5fach höheren Mortalität als in der Kontrollgruppe (Abb. 23). Die Ergebnisse stimmen mit denen von Mortola (2004) überein, der nachwies, dass die Erwärmung eines hypoxischen Neonatalen während der ektothermen Phase zum Anstieg des O<sub>2</sub>-Verbrauchs führt und energieverbrauchende Reaktionen provoziert, die nachteilig für das Überleben sind. Der metabolisch herabgesetzte Stimulus für die Atmung wird bei einer gleichzeitigen Anhebung der Umgebungstemperatur lebensbedrohlich. Überraschenderweise scheint die Kombination aus chronischer Hypoxie und Hyperthermie einen positiven Effekt auf die Überlebensfähigkeit der Hühnerembryonen auszuüben, da weder die Missbildungsrate noch die Mortalität der Hypoxie+Hyperthermiegruppe höher war als bei alleiniger Hypoxie bzw. Hyperthermie (Abb. 23 und Abb. 26).

Die sichtbare **höhere Durchblutung** der Embryonen in allen Versuchsgruppen während der Belastungsinkubation deutet im Vergleich zur Kontrollgruppe auf eine vermehrte Vaskularisierung hin (Abb. 27). Dieses Phänomen stimmt mit den Ergebnissen von Michiels (2004) überein. O<sub>2</sub>-Mangel führt zu einer **verbesserten Vaskularisierung** innerhalb von Stunden bis Tagen.

Es fällt außerdem auf, dass die Hypoxiegruppe und die Hypoxie+Hyperthermiegruppe einen ähnlichen Verlauf der Mortalität hinsichtlich der Inkubationstage aufwiesen (Abb. 25). Die kleinen Unterschiede entstanden wahrscheinlich, weil die Embryonen der Hypoxiegruppe länger (von D6-12) als die der Hypoxie+Hyperthermiegruppe (von D8-12) unter veränderten Bedingungen bebrütet wurden. Die Embryonen der Hyperthermiegruppe, die auch von D8-12 der erhöhten Temperatur unterlagen, zeigen einen gänzlich anderen Verlauf der Mortalität bezüglich der Inkubationstage. Viele Hühnerembryonen der Hyperthermiegruppe starben nach beendeter Hyperthermiephase (Abb. 24). Die gleichzeitige Hypoxie scheint einen positiven Effekt auf das Überleben zu haben. In unserer Versuchsanordnung waren die **Inkubationstage D9-11 besonders kritisch**, da auch in der Kontrollgruppe die Sterblichkeit an diesen Tagen am höchsten war. Insgesamt starben in diesem Versuch fast 70% aller während der Embryonalentwicklung abgestorbenen Hühnerembryonen von D9-11 ab. Die Verteilung der embryonalen Mortalität bei Vögeln teilt sich nach Romanoff (1972) in drei kritische Phasen auf. Diese drei Phasen liegen beim Hühnerembryo bei D4, D11 und D19. Da die meisten Eier in den eigenen Versuchen nicht bis zum Ende bebrütet wurden, ist keine erhöhte Sterblichkeit am D19 zu beobachten. Die Empfindlichkeit am D11 stimmt mit den eigenen Messungen überein. Wenn die Embryonen den 12. Inkubationstag überlebt hatten, überlebten alle bis auf die der Hyperthermiegruppe sehr wahrscheinlich den Rest der Inkubationszeit. Das Herz besitzt schon an D8 seine adulte Form. Die erhöhte Sterblichkeit während der Tage D9-11 und die erhöhten Überlebenschancen nach D12 legt die Vermutung nahe, dass die **vollständige, artgerechte und funktionsfähige Ausbildung der Chorioallantoismembran (CAM) als gasaustauschendes Organ** von entscheidender Bedeutung für das Überleben des Embryos ist.

Insgesamt überlebten über die Hälfte aller Embryonen die Versuchsbedingungen nicht. Die erniedrigten pH-Werte und erhöhten Laktatwerte in allen Versuchsgruppen gegenüber der Kontrollgruppe am D12 (Tab. 4, Feske, 2009) sind ein weiterer Nachweis für eine verringerte O<sub>2</sub>-Verfügbarkeit. Die hohen Mortalitätsraten sind auf ein Ungleichgewicht zwischen embryonalem O<sub>2</sub>-Bedarf und –verfügbarkeit zurückzuführen. Nur Embryonen, die schnell genug an die jeweiligen Stressoren adaptierten, konnten überleben. Das ist ohne starke Anpassungsmechanismen auf molekularer Ebene nicht möglich.

	Kontrolle	Hypoxie	Hyperthermie	Hypoxie+Hyperthermie
pH	7,7	7,51	7,39	7,51
Laktat [mmol/l]	2,7	6,3	4,4	3,9
Glukose [mmol/l]	6,77	7,88	7,05	7,33

**Tab. 4: Werte gemessen im Blut der Hühnerembryonen am D12 unter gleichen Bedingungen in der gleichen Arbeitsgruppe (Feske, 2009)**

## 5.3. Einfluss der Stressoren auf die Genexpression

### 5.3.1. Einfluss der Stressoren auf die Expression von HIF1 $\alpha$

Zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen war eine grundsätzliche Tendenz zu erkennen. Die HIF1 $\alpha$  Expression wurde am wenigsten durch chronische 15%ige Hypoxie und am stärksten durch chronische Hyperthermie (39,5°C) beeinflusst. Die gleichzeitige chronische Hypoxie schwächt die Hyperthermie-induzierte HIF1 $\alpha$  Expression ab (Abb. 28).

Deutliche Änderungen in der HIF1 $\alpha$  Sequenz wurden bei Menschen (Sowter *et al.*, 2003) und bei verschiedenen Stämmen von Mäusen gefunden (Poellinger und Johnson, 2004). Wenger *et al.* (1998) zeigten, dass die zwei **Isoformen von HIF1 $\alpha$**  bei Mäusen regional unterschiedlich exprimiert werden. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass Isoformen von HIF1 $\alpha$  beim Huhn vorkommen und die eigenen Ergebnisse daher weniger deutlich ausfallen. Auch eine Beteiligung von **HIF2 $\alpha$**  an der Adaptation an O<sub>2</sub>-Mangel kann nicht ausgeschlossen werden. HIF1 $\alpha$  und HIF2 $\alpha$  mRNA und Proteinlevel variieren zwischen verschiedenen Zelllinien und Geweben (Talks *et al.*, 2000), sind also zell- und gewebsspezifisch reguliert. Dagegen sprechen Ergebnisse aus Zellkulturen, in denen HIF1 $\alpha$ , aber nicht HIF2 $\alpha$ , primär und vielleicht exklusiv für die transkriptionelle Antwort auf Hypoxie verantwortlich war. Der Grund dafür könnte sein, dass HIF2 $\alpha$  nicht in den Zellkern transportiert wird (Park *et al.*, 2003).

In Versuchen von Catron *et al.* (2001) unter chronischer Hypoxie zeigten inkubierte embryonale Hühnerherzen (D9) einen 400%igen Anstieg der HIF1 $\alpha$  mRNA nach 24h mit 15% O<sub>2</sub>. Die gleichen Bedingungen führten im Herzen zu einem 30fachen Anstieg des Hypoxiegewebemarkers H-misonidazol gegenüber der normoxischen Kontrollgruppe. In den eigenen Versuchen kam es nur an D20 in der Hyperthermiegruppe zu einer Hochregulation von HIF1 $\alpha$ . Nau *et al.* (2002) vermuten, dass die Regulation der HIF1 $\alpha$  Aktivierung hauptsächlich **posttranskriptionellen** Mechanismen unterliegt. Somit sind die weitestgehend gleich bleibenden mRNA Gehalte unter O<sub>2</sub>-Mangel bei den eigenen Untersuchungen nicht überraschend (Schofield und Ratcliffe, 2004). Ein hoher HIF1 $\alpha$  mRNA Gehalt ist aber in vielen Zellen die Voraussetzung für eine schnelle HIF1 $\alpha$  Akkumulation unter Hypoxie (Fong, 2008). Die von Moeller *et al.* (2004) beschriebene Bildung von **Stressgranula** unter Hypoxie verdeutlicht die posttranskriptionelle Bedeutung von HIF1 $\alpha$  regulierten Genen. Die Stressgranula binden HIF1 regulierte Transkripte und führen zu einer Herunterregulation der HIF1 Kaskade. Die Aufnahme in die Stressgranula variiert von Gen zu Gen. Diese Form der posttranskriptionellen Regulation hilft der Zelle, sich vom hypoxischen Schock zu erholen. Viele synthetisierte mRNAs werden dadurch erst bei der Reoxygenierung translatiert.

Durch **negative Feedbackmechanismen** wurden bei verlängerter Hypoxie eine Herunterregulation der HIF1 $\alpha$  mRNA beobachtet (Wenger *et al.*, 1998). Über 40 Inhibitoren

wurden bisher entdeckt. Sie beruhen auf verschiedenen Mechanismen: Hemmung der HIF1 $\alpha$  mRNA Expression, HIF1 $\alpha$  Proteinexpression, HIF1 DNA-Bindungsaktivität und HIF1 vermittelte Gentranskription (Semenza, 2007). Die hypoxische Antwort muss immer im Zusammenhang mit der Mikroumgebung und allen Produkten der HIF1 Transkription gesehen werden. Ausmaß und zeitlicher Ablauf der HIF1 $\alpha$  Expression sind **gewebsspezifisch** (Poellinger und Johnson, 2004; Stroka *et al.*, 2001). Hohe Level von HIF1 $\alpha$  wurden auch in nicht-hypoxischen Zellen gefunden. Daraus leitete Iyer *et al.* (1998) ab, dass **zelltypspezifische** Signalwege zur Expression von HIF1 $\alpha$  führen. Diese Beobachtungen und die **Induktion von HIF1 $\alpha$  von nicht-hypoxisch vermittelten Signalwegen** könnten ein Grund sein, wieso es zu keiner Induktion von HIF1 $\alpha$  in den eigenen Versuchen kam, da HIF1 $\alpha$  auch in der Kontrollgruppe erhöht gewesen sein könnte.

### 5.3.2. Einfluss der Stressoren auf die Expression von Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGFA)

Die Expression von VEGF kann als Indikator für eine durch Gewebshypoxie induzierte Vaskulogenese gesehen werden (Waltenberger *et al.*, 1996). Es zeichnete sich ein Trend zwischen den Versuchsgruppen ab. Chronische Hyperthermie von 39,5°C induzierte das Gefäßwachstum stärker als 15%ige chronische Hypoxie. Bei zusätzlicher 15%iger Hypoxie war das durch die Hyperthermie induzierte Gefäßwachstum abgeschwächt (Abb. 29). Hypoxie induziert sowohl eine erhöhte Transkription als auch eine verminderte Degradation der VEGF mRNA (Levy *et al.*, 1996) in Kardiomyozyten (Levy *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 1995). Damit wird die O<sub>2</sub>-Versorgung in den Geweben durch Gefäßbildung verbessert (Hashimoto *et al.*, 1994). Das kann durch die Ergebnisse in dieser Arbeit bestätigt werden: während der Belastungssinkubation waren die mRNA-Gehalte von VEGFA in allen Gruppen gegenüber der Kontrollgruppe erhöht. Die FC-Werte von VEGFA waren auch nach D12 in der Hyperthermiegruppe und Hypoxie+Hyperthermiegruppe erhöht (Abb. 29).

Die Existenz von verschiedenen **VEGFA-Isoformen** als Grund für das Fehlen einer ausgeprägteren Genregulation ist unwahrscheinlich, da alle VEGFA Isoformen auf mRNA Niveau unter Hypoxie gleichmäßig induziert werden (Bunn und Poyton, 1996; Levy *et al.*, 1995). Die Bedeutung von HIF2 $\alpha$  in der Regulation der VEGFA-Expression wurde in dieser Studie nicht überprüft. Der VEGF-Rezeptor Flk1 ist nachgewiesenermaßen HIF2 $\alpha$  reguliert (Elvert *et al.*, 2003). Es gibt bisher aber keine genaue Unterscheidung zwischen der Funktion von HIF1 $\alpha$  und HIF2 $\alpha$  (Fong, 2009).

VEGF wird **transkriptionell und posttranskriptionell reguliert** (Bunn *et al.*, 1998). Die von Forsythe *et al.* (1996) beobachtete starke Übereinstimmung zwischen der HIF1 Aktivität und der VEGF Expression, passt zu den in dieser Studie gemessenen Hochregulationen der Gene VEGFA (1,09fach) und HIF1 $\alpha$  (1,36fach) am D20 in der Hyperthermiegruppe. Es kann davon ausgegangen werden, dass ebenso die Proteinkonzentration erhöht ist. Geva *et al.*

(2002) fanden eine enge Korrelation zwischen mRNA- und Proteinkonzentration von VEGFA. Bei der Inkubation eines Hühnereies am D10 für 24h mit 15% O<sub>2</sub> wurde vom 2,5fachen Anstieg der VEGF mRNA im Vergleich zur Kontrollgruppe berichtet (Ivnitski-Steele *et al.*, 2004). Die Erhöhung der Umgebungstemperatur auf 40,0°C in Kombination mit der Absenkung des O<sub>2</sub>-Angebotes auf 15% am D10 für 24h löste eine 2,4 fache Hochregulation der VEGFA Expression bei Hühnerembryonen aus (Stuhrberg *et al.*, 2003; Stuhrberg, 2006). Dieser Effekt konnte in den eigenen Versuchen nicht bestätigt werden.

Die physiologische Hypoxie spielt eine Schlüsselrolle in der Ausbildung des embryonalen Gefäßsystems (Fong, 2009). Ob es zu einer proliferativen Reaktion kommt, die das Überleben der Zelle sichert, oder zur **Apoptose** ist vom **Grad der Hypoxie** abhängig (Fong, 2008). Gesunde Blutgefäße oder instabile und undichte Gefäßen werden gebildet (Fong, 2009). Es ist zu vermuten, dass die in dieser Studie gewählten Inkubationsbedingungen zu einer erhöhten Apoptose der Endothelzellen durch eine zu schwere Hypoxie und zur Ausbildung unreifer Gefäße in den Hühnerembryonen geführt haben. Dies würde die erhöhte Rate an Missbildungen und das Absterben der Embryonen durch eine nicht mehr gegebene Funktionalität erklären.

Die Effekte der angiogenetischen Faktoren sind **gewebsspezifisch**. HIFs können die Expression eines angiogenetischen Gens in **verschiedenen Zelltypen** unterschiedlich regulieren (Fong, 2008; Manalo *et al.*, 2005). Versuche an HIF1 $\alpha$  Knockout-Mäusen zeigten, dass auch andere Stimuli als HIF1 $\alpha$  für die Induktion der VEGF mRNA verantwortlich sind (Pugh und Ratcliffe, 2003). Die zwei bis dreifache Überexpression von VEGFA in Mäusen führte zu Anomalitäten in der Herzentwicklung und erhöhter embryonaler Mortalität. Miquerol *et al.* (2000) folgern daraus, dass das Überleben der Embryonen ein enges Fenster der VEGFA Expression erfordert. Tomanek *et al.* (1999) konnten zudem einen **Gradienten der VEGF Expression** in den ventrikulären Wänden von Rattenherzen nachweisen, mit der höchsten Expression nahe dem Epikard.

### 5.3.3. Einfluss der Stressoren auf die Expression von Enolase 1 (ENO1)

Aus den FC-Werten lässt sich schließen, dass die chronische Hyperthermie (39,5°C) mehr glykolytische Prozesse nutzt, während die chronische Hypoxie wie oben beschrieben zu einem hypoxischen Hypometabolismus führt. Die stoffwechsellenkende Wirkung der 15%igen chronischen Hypoxie machte sich auch in der Kombination mit der chronischen Hyperthermie bemerkbar (Abb. 30). Vermutlich führt der Hypometabolismus auch zu niedrigeren Körpertemperaturen und wirkt damit der vom Organismus empfundenen Hyperthermie entgegen (Mortola, 2004).

O<sub>2</sub> ist nicht nur ein Regulator der Glykolysegeschwindigkeit, sondern auch ein Regulator der Genexpression glykolytischer Enzyme (Webster, 1987). Chronische Hypoxie erzeugt eine signifikante und aufeinander abgestimmte Aktivierung der Transkription folgender

glykolytischer Gene: Fructose-2,6-bi(s)phosphataldolase, Triosephosphatisomerase, Phosphoglyceratkinase, Enolase, Pyruvatkinase und Laktatdehydrogenase (Semenza *et al.*, 1994; Semenza *et al.*, 1996; Webster, 1987). Das ließe eine Hochregulation der Enolase in den eigenen Versuchen erwarten. Die basalen Level von ENO1 mRNA verlaufen parallel zum HIF1 $\alpha$  Proteinlevel (Nau *et al.*, 2002). HIF2 $\alpha$  ist nicht an der Aktivierung glykolytischer Enzyme beteiligt (Hu *et al.*, 2003). Damit kann HIF2 $\alpha$  als Grund für die fehlende Hochregulation ausgeschlossen werden.

Stuhrberg (2006) zeigte, dass eine Bebrütung mit 15% O<sub>2</sub> kombiniert mit einer Erhöhung der Umgebungstemperatur auf 40,0°C am D10 für 24h eine 3,5 fache Hochregulation der Enolase auslöst. Diese Ergebnisse konnten in den eigenen Versuchen am D10 bei einer 15%igen Hypoxie kombiniert mit einer Hyperthermie von 39,5°C für 24h nicht bestätigt werden. Versuche an anämischen Schafen ergaben nach 3tägiger Anämie eine Änderung der mRNA Expression glykolytischer Enzyme nicht aber von HIF1 $\alpha$  und ENO1 (Mascio *et al.*, 2005). Das entspricht den eigenen Ergebnissen. Die Induktion von primären HIF1-Zielgenen wurde von Manalo *et al.* (2005) mit 8h angegeben. Sekundäre HIF1-Zielgene werden erst nach über 24h induziert. In den eigenen Versuchen wurde eine Induktion der Enolase weder nach 8h noch nach 24h erzielt, obwohl es ein primäres HIF1-Zielgen ist.

Die Glykolyse ist im sich entwickelnden Herzen hauptsächlich für die ATP-Produktion verantwortlich (Jones und du Toit, 1985; Lopaschuk *et al.*, 1991). Sie wird der Verstoffwechslung von Fettsäuren vorgezogen, da weniger O<sub>2</sub> benötigt wird (Baumann und Meuer, 1992). Romano *et al.* (2001) und Rudolph (1985) schlussfolgern daraus, dass das Herz während der Embryonalentwicklung bereits unter physiologischen Bedingungen am oberen Limit seiner Leistungsfähigkeit arbeitet. Unter Normoxie generiert der 2 bis 4 Tage alte Embryo 30% des ATPs über die anaerobe Glykolyse (Romano *et al.*, 2001). Diese Beobachtungen legen nahe, dass die Embryonen in den eigenen Versuchen schon die maximale Kapazität der Glykolyse ausschöpften und es deswegen zu keiner Regulation auf der mRNA-Ebene kam. Dagegen sprechen die Laktat-Messungen im Blut der Hühnerembryonen unter gleichen Bedingungen in der eigenen Arbeitsgruppe. Am Ende der Belastungsinubation am D12 wiesen alle Gruppen gegenüber der Kontrollgruppe **erhöhte Laktatwerte** auf (Tab. 4, Feske, 2009). Das spricht für eine erhöhte glykolytische Energiegewinnung und passt nicht zu den eigenen gemessenen mRNA-Gehalten der Enolase.

Ruijtenbeek *et al.* (2000) fanden heraus, dass es **regionale Unterschiede innerhalb des Herzens** gibt. So ist die oxidative und glykogenolytische Kapazität des Atriums höher gegenüber dem Restmyokard. Die Untersuchung des Gesamtherzens ist vermutlich der Grund dafür, dass keine Genregulation gemessen werden konnte.

#### 5.3.4. Einfluss der Stressoren auf die Expression von Hämoxigenase 1 (HO1)

HO1 wird als **Indikator für oxidativen Stress** gesehen (Maini *et al.*, 2007). Die Ergebnisse zeigten, dass die chronische Hypoxie (15%) den geringsten und die chronische Hyperthermie (39,5°C) den stärksten oxidativen Stress in den Herzen der Embryonen bewirkte. Die gleichzeitige chronische Hypoxie schwächte die Wirkung der Hyperthermie ab. Die chronische Hypoxie und/oder Hyperthermie löste bei allen Hühnerembryonen am D12 den größten oxidativen Stress aus (Abb. 31).

HO1 wird primär transkriptionell reguliert und zählt auch zu den primären HIF1 Zielgenen (Lee *et al.*, 1997). Chronische Hypoxie im Rattenmyokard erhöht die HIF1 $\alpha$  Expression und andere protektive Proteine wie die Hämoxigenase (Kolar und Ostadal, 2004). Die relativ geringen Änderungen der mRNA-Gehalte der eigenen Versuche widersprechen den pH- und Laktatmessungen im Blut der Hühnerembryonen von Feske (2009) (Tab. 4), die auf eine Verschiebung des oxidativen Status gegenüber der Kontrollgruppe hinweisen (Kap. 5.7).

#### 5.3.5. Einfluss der Stressoren auf die Expression der Glutathionperoxidase (GPx-3)

GPx-3 gilt als **Indikator für oxidativen Stress** (Maini *et al.*, 2007). Dieser wurde in den Herzen der Embryonen unter chronischer Hypoxie und/oder Hyperthermie am D12 bestätigt. Die erhöhten mRNA-Level der GPx-3 am D12 bis zur 1,16fache Hochregulation in der Hypoxie+Hyperthermiegruppe stimmte mit den Messergebnissen der HO1 überein. Die alleinige 15%ige chronische Hypoxie löste wenig bis gar keinen oxidativen Stress aus im Gegensatz zur chronischen alleinigen Hyperthermie und gleichzeitigen Hypoxie (Abb. 32).

Das erneute Ansteigen der FC-Werte am D20 in der Hyperthermiegruppe und der Hypoxie+Hyperthermiegruppe (Abb. 32) ist mit der O<sub>2</sub>-Mangelsituation vor dem EP zu erklären. Die Eischale ist noch nicht durchbrochen, womit der oxidative Stress in den hyperthermischen Gruppen trotz eingesetzter Lungenatmung wieder steigt. Das Absinken der FC-Werte in der Hypoxiegruppe am D20 unter die der Kontrollgruppe deutet darauf hin, dass die von D6-12 mit chronischer Hypoxie behandelten Hühnerembryonen auf diesen erneuten physiologischen hypoxischen Reiz eine adaptive Antwort zeigten. Gerade weil die FC-Werte wie die der anderen Gene am Gesamt Herzen erstellt worden sind, sind auch kleine Änderungen als aussagekräftig anzusehen, da die tatsächlichen Änderungen vermutlich weitaus größer sind.

#### 5.3.6. Einfluss der Stressoren auf die Expression von Hitzeschockprotein 90 (HSP90)

Im Gegensatz zu den Indikatoren für oxidativen Stress (HO1 und GPx-3) sanken die mRNA-Gehalte von HSP90 an den Tagen D10-24h, D10 und D12 unter die mRNA-Gehalte der Kontrollgruppe. Die Abwehr des oxidativen Stresses über HSPs findet auf dem Proteinlevel statt. HSP90 ist eines der am häufigsten vorkommenden Proteine und macht auch im unbelasteten Zustand ca. 1% aller Proteine in Zellen von Säugetieren aus (Latchman, 2001).

Horowitz *et al.* (2004) berichten von hohen zellulären Reserven, wodurch die Wärmeakklimatisation auch ohne De-novo-Synthese von HSPs erfolgen kann. HSPs sind ein integraler Bestandteil der Antwort auf Wärmeakklimatisation. HSP90 steigt generell bei Temperaturerhöhungen in allen Spezies (Tomanek und Somero, 2002). Die von Horowitz *et al.* (2004) mit dem Anstieg des Proteinlevels festgestellte einhergehende Erhöhung des Transkriptionslevels von HSP90, konnte nur am D16 bestätigt werden. HSP90 war in der Hypoxiegruppe um das 1,17fache in der Hyperthermiegruppe und um das 1,33fache in der Hypoxie+Hyperthermiegruppe hochreguliert (Abb. 33). Die erhöhte Transkription von HSPs setzte vermutlich erst nach Ende der Stressoreinwirkung ein. An D18 und D20 sanken die mRNA-Gehalte in allen Versuchsgruppen ab. Es kann angenommen werden, dass der oxidative Stress durch die HSPs auf der Proteinebene reguliert wurde. Der steigende oxidative Stress durch die zunehmende physiologische Hypoxie wurde vermutlich posttranskriptionell reguliert.

Da die Proteinebene und **andere HSPs** neben HSP90 in den eigenen Untersuchungen nicht gemessen wurden, kann darüber keine Aussage gemacht werden. Die **Hitzeschockantwort** ist zusätzlich zu den unterschiedlichen HSPs von vielen Faktoren abhängig. Die Reaktion erfolgt **zellspezifisch** (Leger *et al.*, 2000). Untersuchungen der verschiedenen HSPs in Zellkulturen zeigten, dass eine HSP90-Überexpression die Zellen vor erneuter Hyperthermie aber nicht vor erneuter Hypoxie schützen konnte. HSP60 und 56 hatten keine protektiven Effekte. Eine HSP70-Überexpression schützt die Zellen vor beiden Stressoren. Diese Studien indizieren, dass unterschiedliche HSPs unterschiedliche protektive Effekte ausüben. Sie müssen deshalb in jeder Situation auf ihre spezifischen Wirkungen getestet werden (Latchman, 2001).

Die eigenen Studien legen nahe, dass, wie von Tomanek und Somero (2002) herausgefunden, die chronische Hypoxie bzw. Hyperthermie die intrazelluläre HSP-Konzentration steigen lässt. Damit verbunden kommt es zu einer vermehrten Bildung des Multiproteinkomplexes und zu einer Hochregulation der Schwelle, ab der ein Stressor die Genexpression als Hitzeschockantwort bei Hyperthermie oder Hypoxie auslöst. Damit spielen die HSPs nicht nur bei Hyperthermie in Form eines „**zellulären Thermometers**“ eine wichtige autoregulatorische Rolle (Morimoto, 1998), sondern auch bei O<sub>2</sub>-Mangel in Form eines „**zellulären Oxymeters**“.

Die gemessenen mRNA-Gehalte von HSP90 zwischen den Versuchsgruppen lassen **stressspezifische** Unterschiede erkennen (Abb. 33). Die Hyperthermiegruppe löste die stärkste Hitzeschockantwort aus. Katschinski *et al.* (2002) fanden eine Hyperthermie-induzierte HIF1 $\alpha$  Expression und ein HIF1 $\alpha$  Proteinmuster, die von der Hypoxie-induzierten Expression abweicht. Das Wachstum der Zellkulturen auf einer O<sub>2</sub>-durchlässigen Membran schließt eine Induktion durch Hypoxie bzw. durch einen erhöhten O<sub>2</sub>-Verbrauch bei

Hyperthermie aus. Katschinski *et al.* (2002) schlossen daraus, dass die Hyperthermie-induzierte Proteinexpression hauptsächlich durch eine Stabilisierung und weniger auf einer Modifikation der Proteine beruht. Der Anstieg von HSP90 unter erhöhten Temperaturen stabilisiert HIF1 $\alpha$  auch unter normoxischen Bedingungen. Hyperthermie-induziertes HIF1 $\alpha$  wandert in den Zellkern, aktiviert aber nicht die HIF1-Zielgene und bindet nicht an DNA. Zusätzliche posttranslationale Modifikationen sind nach Katschinski *et al.* (2002) nötig, um diese Funktionen zu aktivieren. Unter Hypoxie wird HIF1 $\alpha$  phosphoryliert, was die Interaktion mit HSP90 verhindert. Bei Hyperthermie und gleichzeitiger Hypoxie erfolgt keine Hemmung der DNA-Bindung und HIF1-Zielgene werden aktiviert. Diese These wird gestützt durch die Beobachtung, dass HSP90-Inhibitoren sowohl die Hypoxie- als auch die Hyperthermie-induzierte Akkumulation verhindert. HSP90 spielt also eine entscheidende Rolle in der Regulation von HIF1 unter Hypoxie und Hyperthermie (Katschinski *et al.*, 2002).

### 5.3.7. Altersabhängige Unterschiede in der Genexpression

Eine 24h-Exposition der Hühnerembryonen unter den entsprechenden hypoxischen bzw. hyperthermischen Bedingungen reichten nicht aus, um eine genregulative Adaptation auf Transkriptionsebene am D10-24h zu bewirken (Abb. 34).

Erst ab D10, bei dem die Versuchsgruppen schon seit D6 bzw. D8 unter O<sub>2</sub>-Mangel und/oder Hyperthermie bebrütet wurden, war zwischen den Versuchsgruppen ein Unterschied je nach Bedingung zu erkennen. Das macht eine Regulation auf der Proteinebene am Tag D10-24h wahrscheinlich. Da auch am D10 die mRNA-Gehalte der Hypoxiegruppe kaum von denen der Kontrollgruppe abwichen (Abb. 35), ist anzunehmen, dass eine moderate chronische Hypoxie, den physiologischen PO<sub>2</sub> im Myokard von ca. 2% (Semenza, 1999) nicht unterschreitet. Erst ab diesem **Grenzwert** kommt es zu einer genregulativen hypoxischen Antwort. Möglich wäre außerdem, dass der **Hypoxie-induzierte Hypometabolismus** (Boutillier, 2001) den O<sub>2</sub>-Verbrauch so abgesenkt hat, dass es zu keiner O<sub>2</sub>-Schuld des Organismus kommt. Am D12 ist das Maximum der Vaskularisierung der CAM erreicht. Der wachsende Verbrauch und die Versorgung durch den sich entwickelnden Embryo stoßen also an ihre physiologischen Grenzen. Die tendenzielle Hochregulation von **HO1** und **GPx-3** in der Hyperthermiegruppe sowie der Hypoxie+Hyperthermiegruppe am D12 spricht dafür, dass am D12 in den Behandlungsgruppen tatsächlich ein Ungleichgewicht der O<sub>2</sub>-Versorgung und des -bedarfs entstanden ist. Das wird durch die erhöhten mRNA-Gehalte der Gene HO1 und GPx-3 bestätigt, die als antioxidative Gene **oxidativen Stress** auf zellulärer Ebene indizieren (Abb. 36). Auch nach Ende der Belastungsinubation waren weiterhin leichte Unterschiede des mRNA-Gehalts innerhalb der Gruppen am D16, D18 und D20 zu erkennen (Abb. 38 und Abb. 39). Diese nehmen bei steigender physiologischer Hypoxie mit einem Maximum am D18 vor dem IP zu.

Die erhöhten mRNA-Gehalte in der Hyperthermiegruppe aber auch fast immer in der kombinierten Gruppe an den Tagen D16, D18 und D20 im Vergleich zur Kontrollgruppe lassen die Schlussfolgerung zu, dass sich die Hühnerembryonen in der **sensiblen Phase von D6-12** an einen erhöhten O<sub>2</sub>-Verbrauch anpassen. Das ist aufgrund der Ergebnisse **nicht nur für hypoxischen** (Decker, 2002; Dzialowski *et al.*, 2002) sondern **auch für hyperthermischen Stress anzunehmen**.

#### 5.4. Einfluss des Sauerstoffmangels

Um dem physiologischen O<sub>2</sub>-Mangel in der Embryonalentwicklung gerecht zu werden, verfügt der embryonale Organismus über eine Vielzahl von Mechanismen.

Dazu zählen die **verschiedenen Formen der Erythrozyten** und des **Hämoglobins**, der **Bohreffekt**, eine **erhöhte Vaskularisierung** des betroffenen Gewebes und eine hohe Kapazität zur Energiegewinnung durch die **anaerobe Glykolyse**. Durch die Umverteilung des Blutes führt Hypoxie zu **verringerten Embryonenmassen** und **erhöhten Herzmassen** (Mehta und Mehta, 2008). Die zahlreichen sich gegenseitig beeinflussenden Adaptationsmechanismen auf molekulargenetischer Ebene werden durch Faktoren wie dem **Hypoxia Inducible Factor (HIF) reguliert**.

Von D6-12 unter chronischer Hypoxie bebrütete Hühnerembryonen hatten einen **erhöhten Hämatokrit und Hämoglobingehalt** am D12 (Dzialowski *et al.*, 2002). Außerdem waren der O<sub>2</sub>-Verbrauch und der kritische PO<sub>2</sub> niedriger als in der Kontrollgruppe. Der niedrigere kritische PO<sub>2</sub> verleiht dem Embryo die Fähigkeit, seinen O<sub>2</sub>-Verbrauch dem –angebot anzupassen. Er bildet damit eine Resistenz gegen erneute hypoxische Zustände aus, solange sie den kritischen PO<sub>2</sub> nicht unterschreiten. Der niedrige O<sub>2</sub>-Verbrauch blieb den von Dzialowski *et al.* (2002) von D6-12 hypoxisch bebrüteten Embryonen auch nach Ende der Hypoxie erhalten (=Oxyregulatoren). Es kann angenommen werden, dass in den eigenen Versuchen der gleiche Effekt eintrat (Abb. 21). Bei tauchenden Vogelarten ist die Hämoglobinkonzentration im Blut gleich hoch wie bei nichttauchenden. Der **Myoglobingehalt** der Brustmuskulatur ist aber wesentlich höher, wahrscheinlich um den begrenzt verfügbaren O<sub>2</sub> effizient zu den Mitochondrien zu transportieren (Stevens, 1996). Der Myoglobingehalt im Brust- und Herzmuskel von Küken steigt signifikant mit dem Beginn der Tauchaktivität (Haggblom *et al.*, 1988). Es kann daher sein, dass auch in den eigenen Versuchen als Adaptation an O<sub>2</sub>-Mangel der Myoglobingehalt entsprechend dem sinkenden O<sub>2</sub>-Gehalt stieg. Die von Hühnke und Tönhardt (2004), Tönhardt (2005) und Decker *et al.* (2002) gemessenen veränderten Noradrenalinwerte führen nachgewiesenermaßen durch die Verschiebung der O<sub>2</sub>-Bindungskurve nach rechts zusätzlich zu einer verbesserten O<sub>2</sub>-Ausnutzung.

Hypoxie führt nur in den definitiven roten Blutkörperchen zur Induktion von HSP70 über cAMP ab D11, nicht aber in den primitiven. Die Funktion des HSP70s als Chaperon ist für

den Umbau und die Zerstörung von Zellorganellen der Enddifferenzierung wichtig, da diese Phase eine extensive Hilfe beim Falten und Entfalten von Proteinen erfordert (Dragon und Baumann, 2001). Auch HSP90 könnte eher in definitiven Erythrozyten gebildet werden. Dorn *et al.* (2003) bezeichnet eine Genexpression maladaptiv, wenn auf das fetale Transkriptionsprofil zurückgegriffen wird und als adaptiv, wenn das Transkriptionsprofil das adulte Genexpressionsmuster aufweist. Sharma *et al.* (2004) konnten sowohl hypertrophische als auch atrophische Veränderungen des Herzens auf die fetale Induktion der Genexpression zurückführen. In den eigenen Versuchen kann nicht ausgeschlossen werden, dass es zu einer maladaptiven Genregulation kam. Die eigenen Versuchsbedingungen könnten dazu geführt haben, dass es **länger dauerte, bis sich die primitiven Erythrozyten in definitive umwandelten**. Wenn HSP90 eher in definitiven Erythrozyten gebildet werden, wäre das eine Erklärung für die niedrigen mRNA-Konzentrationen von HSP90 am D10-24h, D10 und D12. Dagegen sprechen die Messungen von Baumann *et al.* (1983) an hypoxisch inkubierten Hühnerembryonen, wonach die **embryonale Form des Hbs sich unter Hypoxie früher zur adulten Form wandelte**.

Die **Bradykardie** und **Hypotension** als Antwort auf Hypoxie im Hühnerembryo ist als direkter Effekt der Hypoxie auf das Herz zu sehen, da die neuronale Kontrolle erst in der letzten Inkubationswoche einsetzt (Crossley und Altimiras, 2000). Die Erhöhung der Herzmasse (Abb. 19) ist damit teilweise auf die strukturelle und funktionelle Entwicklung zurückzuführen, wie bei der **kardialen Hypertrophie** (Burton und Smith, 1969; Jonker *et al.*, 2010). Teilweise sind die Änderungen von Organmassen durch die erhöhte Durchblutung mancher Organe auf Kosten von anderen begründet (Mortola, 2009). Damit reicht die generelle Wachstumsverzögerung aus, um unterschiedliche Organmassen bei hypoxisch und normoxisch bebrüteten Embryos des gleichen Alters zu verursachen (Azzam und Mortola, 2007).

Eine weitere Anpassung des embryonalen Organismus ist die **erhöhte Gefäßdichte der CAM** unter Hypoxie (Dusseau und Hutchins, 1988). Die Entwicklung der CAM als Atmungsorgan entwickelt sich entscheidend in der Phase von D6-12. Die Aussprossung der Gefäße ist der primäre Prozess während der frühen Bildung der CAM, während die Angiogenese an D10 und D11 am aktivsten ist (Djonov *et al.*, 2000; Djonov *et al.*, 2002). Die unter Hypoxie erhöhte Dichte der Kapillaren (Dusseau und Hutchins, 1988) führt zu einer Störung der CAM-Entwicklung (Dzialowski *et al.*, 2002). Die Verteilung der Mortalität auf die Inkubationstage in den eigenen Versuchen lassen vermuten, dass das **kritische Fenster für den O<sub>2</sub>-Verbrauch**, das von Dzialowski *et al.* (2002) von D6-12 beschrieben wurde, **auf D8-11 eingeengt** werden kann. Vergleichbar mit der Ausbildung des Dottersackkreislaufs beim Säuger, der einen kritischen Prozess während der embryonalen Entwicklung darstellt (Akazawa *et al.*, 1994), ist beim Vogelembryo die Ausbildung der CAM zu sehen.

Wahrscheinlich ist der in dieser Phase (D8-11) verfügbare O<sub>2</sub> entscheidend für eine vollständige und akkurate Ausbildung der CAM und damit für das Überleben des Embryos.

Die **erhöhten Laktatwerte** aller Versuchsgruppen und die niedrigeren pH-Werte gegenüber der Kontrollgruppe am D12 (Feske, 2009) sind Zeichen einer entstandenen O<sub>2</sub>-Schuld. Das Absinken nach Ende der Belastungsinubation ist als Ausgleich der O<sub>2</sub>-Schuld anzusehen. In der Hypoxiegruppe konnten unter gleichem Versuchsaufbau die höchsten Laktat- und Glukosewerte im Blut der Hühnerembryonen am D12 gemessen werden, bei nur leicht tieferem pH. In der Hyperthermiegruppe waren die Glukosewerte und Laktatwerte nur leicht erhöht, der pH aber tiefer als in allen anderen Gruppen (Tab. 4 Feske, 2009). Die Glukosebereitstellung und anaerobe Energiegewinnung ist damit unter alleiniger Hypoxie effektiver als unter Hyperthermie.

Die aktive Senkung des Energieverbrauchs, der **Hypoxie-induzierte Hypometabolismus** (S. 23), führt zur Wachstumsverzögerung mit folgendem posthypoxischen hypermetabolischen Kompensationswachstum (Abb. 18).

**Katecholamine** sind an der Adaptation an Hypoxie während der frühen Embryogenese beteiligt. Sie spielen in der **Umverteilung des Blutflusses** zugunsten der vitalen Organe eine wichtige Rolle. Sowohl Hypoxie (Cohen *et al.*, 1984) als auch Hyperthermie sind Stimuli für eine katecholamingesteuerte Stressantwort (McNabb und Olson, 1996). In Zelllinien ist die Synthese der Tyrosinhydroxylase, dem Schlüsselenzym der Katecholaminsynthese, durch Hypoxie induzierbar. Ein ähnlicher Mechanismus könnte auch im Nebennierenmark der Hühnerembryonen existieren (Dragon *et al.*, 1996). Norepinephrin (NE) und Epinephrin (E) sind am D9 im Herzen und spätestens am D10 im Blut und der Allantoisflüssigkeit nachweisbar (Epple *et al.*, 1992). Die Versuche von Epple *et al.* (1992) lassen wenig Zweifel, dass ein Embryo schon ab D10 mit einer katecholamingesteuerten Stressantwort reagiert. Schon in der frühen embryonalen Phase sind beim Hühnerembryo hohe PlasmanoradrenalinKonzentrationen festgestellt worden. Sie stellen einen Schutz gegen generellen Stress dar, da Vogelembryonen im Gegensatz zu Säugern nicht über Schutzmechanismen der Mutter verfügen. Die Fähigkeit, Katecholamine auch nicht neuronal freizusetzen (Mulder *et al.*, 2002), ist ein wichtiger Mechanismus, der vermutlich in den eigenen Versuchen zum Überleben des Embryos beitrug. Die unterschiedliche Erhöhung einzelner Katecholamine, wie z. B. die Erhöhung der Plasmanorepinephrinkonzentration als Reaktion auf O<sub>2</sub>-Mangel (Epple *et al.*, 1992), könnte ein Grund für die erfolgte stressspezifische Antwort des kardiovaskulären Systems sein. In eigenen Versuchen von hypoxisch bebrüteten Hühnerembryonen von D6-12 waren die mRNAs der Tyrosinhydroxylase und Dopaminrezeptoren DRD1a und DRD2 an den Tagen D10, D12 und D14 im Herz, in Gefäßen und im Amnion nachweisbar. Es konnten aber keine Genregulationen festgestellt werden (Dittmann *et al.*, 2009). Die Existenz der Rezeptoren

und der Tyrosinhydroxylase haben einen modulierenden Einfluss auf die Enddifferenzierung der primitiven Erythrozyten (Mulder *et al.*, 2000).

In Herzen von hypoxisch inkubierten Hühnerembryonen kommt es zu einer erhöhten Anzahl apoptotischer Kardiomyozyten. Auf ultrastruktureller Ebene wurden Degenerationen, Umstrukturierung der Myofibrillen mit Zerstörung der Sarkomerstruktur und undichte Blutgefäße nachgewiesen. Versuche mit 16%iger Hypoxie an Wachtelembryonen an D2-9 (entspricht beim Hühnerembryo D2,5-11) führten zu einem dünneren kompakten Myokard und einer **gestörten Koronargefäßbildung**. Eine fehlerhafte Entwicklung der Koronargefäße verhindert die Verdichtung der Kammerwände und erhöht die embryonale Mortalität (Sedmera *et al.*, 2000). Diese Veränderungen gehen mit einer **Erhöhung von VEGF** einher. Sie sind im Ungleichgewicht zwischen der Proliferation des Myokards und des Endokards/Endothels begründet und koinzidieren mit der beschleunigten Reifung des Erregungsleitungssystems (Nanka *et al.*, 2008). Die erhöhte Mortalität konnte in den eigenen Versuchen bestätigt werden. Es konnten allerdings kaum Hochregulationen von VEGF festgestellt werden.

Die eigenen Versuchsbedingungen führten zu einem zellulären O<sub>2</sub>- bzw. Energiemangel. Die Hypoxie- und/oder Hyperthermie-induzierten Genregulationen sind im Vergleich zur Literatur geringer. Das hat verschiedenste Gründe. Die Komplexität der molekularen Antwort auf O<sub>2</sub>-Mangel sowie auf Hyperthermie und der additive Effekt weiterer Komponenten (Horowitz, 2002; Horowitz, 2003), können dazu führen, dass Änderungen **unterhalb der statistischen Signifikanzgrenze in der genomischen Antwort eine biologische Bedeutung** haben. In den eigenen Versuchen wurde am ganzen Organismus gearbeitet. Die Ergebnisse spiegeln nicht nur die zellulären Effekte als Antwort auf die Stressoren wider, sondern sind als ganzheitliche Wirkung der gegensätzlichen neurohumoralen Regulationen zu sehen (Horowitz *et al.*, 2004). Resultate aus Zellkulturen, die die Expression von Enzymen erzwingen, sind nur mit Vorbehalt zu bewerten (Berra *et al.*, 2003) und überschätzen oft den wahren PO<sub>2</sub> (Ward, 2008). Unterschiede zu früheren Studien können zudem durch unterschiedliche **Hypoxiegrade und Dauer** der Hypoxie zustande kommen, sowie durch Unterschiede zwischen verschiedenen Hühnerrassen (Chan und Burggren, 2005). Auch die hohen eigenen Qualitätskontrollen bei der RNA-Gewinnung und bei der Auswertung können ein Grund für die geringen Änderungen der Genexpressionen sein. Es ist auch zu bedenken, dass es sich bei den Versuchen um Einzelproben handelt, die nicht den Verlauf kennzeichnen und damit keine Informationen über den Höhepunkt der Antworten geben können.

Ein nicht ausreichender O<sub>2</sub>-Mangel auf Zellebene als Ursache für die in dieser Studie fehlende Hochregulation der untersuchten Gene kann ausgeschlossen werden (s. o.).

Die **Kontrolle der Genregulation wird auf vielen Wegen reguliert**. Dazu gehören die Hauptregulation des Transkriptionsapparats, die Aktion der Transkriptionsfaktoren und der Kofaktoren durch das Regulieren bestimmter Gengruppen als Antwort auf extra- und intrazellulärer Signale, die Chromatinverfügbarkeit und multiple epigenetische Modifizierungen von Genen und der mit ihnen assoziierten Chromatinproteinen (z. B. Histone). Dazu kommen die Regulation der mRNA-Transkripte (z. B. durch Splicing) und des ribosomalen Translationsapparats (Morin und Storey, 2009). Die eigenen Versuche lassen vermuten, dass die chronisch inkubierten Hühnerembryonen in einen hypometabolischen Zustand kamen, der mit einer Hochregulation von HIF1 $\alpha$  einhergehen müsste. Die FC-Werte der Genexpressionsprofile aller Gene wichen aber kaum von der Kontrollgruppe ab. Zwischen den Gruppen kam es zu Unterschieden der Genexpressionen. Die chronische Hypoxie löste im Vergleich zu den anderen Versuchsgruppen die geringsten Veränderungen auf der transkriptionellen Ebene aus. Es ist davon auszugehen, dass die alleinige milde chronische Hypoxie vom Stoffwechsel am besten verkraftet wird. Diese These wird durch die niedrigere Mortalitätsrate in der Hypoxiegruppe im Vergleich zu den anderen Gruppen gestützt.

Die bemerkenswerte **zelltypspezifische** Regulation der Genexpression macht deutlich, dass HIF1 für den Zellkern generell als Signal für Hypoxie fungiert. Die Antwort auf das Signal hängt von der vorherigen Programmierung der Zelle, d.h. von der An- oder Abwesenheit anderer transkriptioneller Regulatoren potentieller HIF1-Zielgene, ab (Kelly *et al.*, 2003). Wikenheiser *et al.* (2006) fanden anhand der Verwendung eines Hypoxiemarkers heraus, dass bestimmte Regionen des embryonalen Herzens von Hühnern besonders hypoxisch werden. Dazu gehören das OFT-Myokard, die Regionen der atrioventrikulären Verbindung, das Zentrum der dickeren Regionen der atrialen Wand und Teile des interventrikulären Septums. Dabei waren HIF1 $\alpha$  und der Hypoxiemarker kolokalisiert. Der Nachweis von HIF1 $\alpha$  in den Zellkernen lässt vermuten, dass die HIF1 $\alpha$ -Transkriptionsaktivität erhöht war (Wikenheiser *et al.*, 2006). Im Herzen existieren also **organregionsspezifische Unterschiede in der Genexpression**. Diese Unterschiede und die **metabolische Zonierung des Herzens**, resultierend in einem PO<sub>2</sub>-Gradienten von Arterien zu Venen, wie sie Kietzmann *et al.* (2000) in der Leber fand, sind Gründe, warum es kaum zu Genregulationen bei den eigenen Ergebnissen kam. Romano *et al.* (2001) bestätigen diese Aussage durch den Nachweis, dass regionale Unterschiede der glykolytischen Kapazität in verschiedenen Teilen des Hühnerherzens unter Hypoxie festgestellt wurden. In der hier vorgelegten Arbeit wurden die anatomischen Strukturen des Herzens nicht getrennt voneinander auf den mRNA-Gehalt der Zielgene untersucht. Da es im Gesamtherzen zu Unterschieden auf mRNA-Ebene kommt, ist teilweise von massiven Hochregulationen der

entsprechenden Gene je nach Region auszugehen. Untersuchungen an Gesamtorganen sind folglich für die Erstellung von Genexpressionsprofilen nicht zu empfehlen.

## 5.5. Einfluss der Temperaturerhöhung

Bei hyperthermisch bebrüteten Embryos müssen drei **kritische Parameter** beachtet werden: die kritische Phase für Thermomanipulationen bei Hühnerembryonen, die Höhe der Temperatur und die Dauer der Exposition (Yahav, 2009).

Während der Inkubation führt eine Temperaturerhöhung in der ektothermen Phase zu einer erhöhten Temperatur der Eischale, einer **erhöhten Herzfrequenz** und einem **erhöhten O<sub>2</sub>-Verbrauch**. Eine Belastungsinubation bei 39,5°C für 24h von D7-16 erzeugte **niedrigere Schlupfraten, niedrigere Qualität der Küken** und signifikant niedrigere Körpermassen nach dem Schlupf (Piestun *et al.*, 2008). Die erhöhten Massenverluste in den eigenen Versuchen im Vergleich zu denen der Hypoxiegruppe (Abb. 21) sind vermutlich unter den gewählten Temperaturen auf einen **erhöhten Wasserverlust durch Verdampfung sowie durch den erhöhten Metabolismus** zurückzuführen. Damit ist die hohe Sterblichkeit in der Hyperthermiegruppe und der Hypoxie+Hyperthermiegruppe teilweise erklärbar. Die physiologische Spanne der vom Embryo tolerierten Temperatur und Luftfeuchte ist begrenzt (Mortola, 2009). Die Pufferkapazitäten der CAM und des Dottersackes (Tullett und Deeming, 1987) verhinderten wahrscheinlich, dass alle Embryonen starben.

Für **D7 und D11** wurden eine Änderung der Wärmeproduktion und des O<sub>2</sub>-Verbrauchs beschrieben (Romanoff, 1967). Am D7 scheint der Embryo sehr sensibel gegenüber Hyperthermie zu sein. Ande und Wilson (1981) vermuten, dass es mit der Fusion von Chorion und Allantois zur CAM zusammenhängt, die in diesem Stadium schnell wächst. Diese Vermutung stimmt mit den Mortalitätsraten der Hyperthermiegruppe überein, die die größte Sterblichkeit am D11 aufwies (Abb. 25). Nach Ende der Ausbildung der CAM (ab D12) ist die Empfindlichkeit gegenüber Wärme wahrscheinlich geringer.

Die **niedrigen pH-Werte**, und die nur leicht erhöhte Blutglukosekonzentration am D12 (Tab. 4, Feske, 2009) sprechen für eine **anaerobe Energiegewinnung**. Die Mobilisierung der Glukose scheint aber nicht so gut zu funktionieren wie unter alleiniger Hypoxie. Zu niedrige pH-Werte wirken sich negativ auf die O<sub>2</sub>-Aufnahme des Hbs aus (Dragon und Baumann, 2001). Die von Teeter *et al.* (1985) beschriebene Alkalose nach chronischer Hyperthermie in der postnatalen Phase konnte anhand der Blutparameterbestimmungen am D16 und D18 in der Hyperthermiegruppe bestätigt werden (Tab. 4, Feske, 2009).

Die geringe Veränderung auf der mRNA-Ebene könnte durch die lang andauernde Hyperthermie zustande gekommen sein. Versuche bei akutem und chronischem oxidativen Stress und Hyperthermie ergaben, dass nur akuter Stress HO1- und VEGFA-mRNA induziert. Dagegen sprechen, dass die HIF1 $\alpha$  Proteinkonzentration und die VEGF- und HO1-mRNA Level durch oxidativen Stress und Hyperthermie erhöht werden (Maloyan *et al.*,

2005). Die Reaktion auf der molekularen Ebene ist bei Hyperthermie langsamer als die physiologische Antwort des Gesamtorganismus (Moran *et al.*, 2006). Das ist eine mögliche Erklärung für die nur geringen Änderungen der mRNA-Gehalte am D10-24h in der Hyperthermiegruppe (Abb. 34). Es ist anzunehmen, dass die Expression von HIF1 $\alpha$  und der HIF1-Ziele gene auch bei Hyperthermie durch **organregionsspezifische und zelltypspezifische Unterschiede sowie der metabolischen Zonierung** der Grund für die geringen Regulationen waren (Kap. 5.4).

Die Hormonbildung durch die **Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Kontrollachse** zur Thermoregulation beginnt früh in der Embryonalentwicklung. Erst in der Mitte der Inkubationszeit zwischen D10,5-13 werden die Komponenten zu einem funktionierenden Kontrollsystem vereint (Kühn *et al.*, 1993; Thommes und Woods, 1993; Thommes *et al.*, 1988). Piestun *et al.* (2009) vermuten, dass die Temperaturerhöhung während der Ausbildung der Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Kontrollachse (Thermoregulation) und der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Kontrollachse (Stressantwort) deren funktionellen Sollwert heruntersetzt. Eine überlebenswichtige geringere Wärmebildung ist die Folge. Die Beeinflussung der Regelsysteme mit einer Absenkung des Stoffwechsels erklärt die niedrigen Embryonenmassen und den geringen Massenverlust am D16 und D18 in der Hyperthermiegruppe während der physiologisch steigenden Hypoxie (Abb. 17 und Abb. 21). Die veränderten mRNA-Gehalte vor allem in der Hyperthermiegruppe auch nach Beendigung der Belastungsin Kubation sind ein Indiz für langandauernde Veränderungen nach erfolgter Hyperthermie von D8-12 (Abb. 37, Abb. 38 und Abb. 39). Nach Yahav *et al.* (2009) gibt es **epigenetische Temperaturadaptationen** beim Huhn. Erfolgt eine Temperaturerhöhung während einer kritischen Phase, gibt es einen langandauernden Effekt auf die Thermotoleranz im postnatalen Leben von Hühnern. Die erhöhte Mortalität der Embryonen während der Restinkubation gegenüber allen anderen Gruppen legt die Vermutung nahe, dass es zwar zu Veränderungen kommt, diese aber für den Organismus nur kurzfristig das Überleben sichern. Zu hohe Umgebungstemperaturen im mittleren Drittel der Embryonalentwicklung wirken sich auf den Organismus **maladaptiv** aus. Ande und Wilson (1981) wiesen nach, dass Hühnerembryonen, die Hyperthermie ausgesetzt waren, nicht schlüpfen konnten, missgebildet waren oder geschlüpfte Küken weniger aktiv waren.

## 5.6. Einfluss des Sauerstoffmangels kombiniert mit erhöhter Temperatur

Die eigenen Versuche deuten darauf hin, dass die alleinige chronische Hyperthermie für die Embryonen lebensbedrohlicher war als die Hyperthermie kombiniert mit chronischer Hypoxie. Die Mortalität der Hypoxie+Hyperthermiegruppe lag unter der Hyperthermiegruppe (Abb. 23). Daraus ist zu schließen, dass sich die durch die **Hypoxie-induzierten Adaptationsmechanismen positiv auf die Vitalität** der Hühnerembryonen auswirken und die embryonale Sterblichkeit senken. Die Kombination der Hypoxie mit der Hyperthermie hat

weniger Einfluss auf die Genexpression als reine Hyperthermie. Damit bestätigen die eigenen Versuche, die von Horowitz *et al.* (2004) postulierte **Kreuztoleranz** eines Stressors gegenüber anderen Stressoren. Die Kreuzregulation der Signalwege für eine Stressantwort, erhöht die Lebensfähigkeit von Zellen gegen unbekannte Stressoren (Baird *et al.*, 2006). Die Zahl der Stress-assoziierten Gene, die beide Stressoren aktivieren, ist begrenzt, nur 11-22% der im Microarray getesteten Gene sind durch beide Stressoren induzierbar. Die transkriptionelle Antwort auf die unterschiedlichen Stressoren ist **stressspezifisch** (Horowitz *et al.*, 2004). Das erklärt die Unterschiede der FC-Werte zwischen der alleinigen chronischen Hypoxie und der alleinigen chronischen Hyperthermie. Die meist zwischen diesen Gruppen liegenden FC-Werte der Hypoxie+Hyperthermiegruppe bestätigen die These von Maloyan *et al.* (2005), dass der Signalweg der Adaptation an O<sub>2</sub>-Mangel ein Bestandteil der Adaptation an erhöhte Temperaturen ist. Während alleinige Hypoxie den HIF1-Signalweg in Gang setzt, führt alleinige Hyperthermie nicht zur Aktivierung der HIF1-Zielgene und bindet nicht an DNA. Bei Hyperthermie und gleichzeitiger Hypoxie, kommt es nicht zur Hemmung der DNA-Bindung und die HIF1-Zielgene werden aktiviert (Kap. 5.3.6). Das kann die Erklärung dafür sein, dass die alleinige Hyperthermie ein anderes Muster sowohl in der Genregulation als auch z. B. in der Mortalität der Hühnerembryonen im Gegensatz zur Hypoxiegruppe und zur Hypoxie+Hyperthermiegruppe aufwies (Abb. 25). Die Kombination der chronischen Hypoxie mit der chronischen Hyperthermie führte zu einem der alleinigen Hypoxie ähnlichen Muster der Genexpression und der Mortalität. Maloyan *et al.* (2005) konnten durch die Bestimmung von HIF1 $\alpha$  und HIF1-induzierten Genen nachweisen, dass die HIF1-vermittelte Antwort auf Hypoxie nach erfolgter Wärmeakklimatisation verbessert wurde. Damit ist HIF1 an der Ausbildung der Kreuztoleranz beteiligt. Die HIF1-vermittelte Wärmeakklimatisation und Adaptation an O<sub>2</sub>-Mangel entwickelte sich schon in der frühen Evolution der Metazoa und ist hoch konserviert. Es kann also davon ausgegangen werden, dass die Kreuztoleranz auch bei Vögeln auftritt. Damit lassen sich die deutlich höheren Embryonenmassen an den Tagen D18 und D20 gegenüber der Kontrollgruppe erklären. Die Embryonen, die den kombinierten Stress überlebt haben, konnten wahrscheinlich durch die Kreuztoleranz besser an erneute Hypoxie adaptieren als alle anderen Gruppen inklusive der Kontrollgruppe. Nur weiterführende Versuche und der Schlupf solcher bebrüteter Embryonen werden Aufschlüsse über die genauen Effekte geben.

Es ist davon auszugehen, dass die erhöhten Temperaturen die Entstehung eines Hypometabolismus bei gleichzeitiger chronischer Hyperthermie verhindern. So sanken z. B. die Embryonenmassen während der Belastungsinubation nicht wie in der Hypoxiegruppe unter das Niveau der Kontrollgruppe ab. Es könnte trotzdem zu einer Absenkung der Körpertemperatur und niedrigeren Stoffwechselraten kommen (Mortola, 2004), die sich trotz Hyperthermie positiv auf die Vitalität der Hühnerembryonen auswirken. Die niedrigeren

relativen Embryonenmassen der Hypoxie+Hyperthermiegruppe gegenüber der Hyperthermiegruppe während der Belastungsinubation (Abb. 17) sprechen dafür, dass die negativen Effekte alleiniger chronischer Hyperthermie im Zusammenwirken mit chronischer Hypoxie reduziert wurden. Nach Ende der Belastungsinubation hinderte die zunehmende physiologische Hypoxie die Embryonen der Hypoxie+Hyperthermiegruppe gegenüber allen anderen Gruppen am wenigsten am Wachstum. Das ist ein Indiz dafür, dass der Organismus nach chronischer Hypoxie kombiniert mit Hyperthermie die erneute Hypoxie besser verkräftete als alle anderen Gruppen. Kontrovers muss berücksichtigt werden, dass die Embryonen durch die erhöhten Umgebungstemperaturen während D8-12 wahrscheinlich schon weiter in der Entwicklung fortgeschritten waren, wie von Burggren (1998) beschrieben. Die entstandene Wachstumsverzögerung bei alleiniger Hyperthermie nach der Belastungsinubation spricht allerdings gegen diese Vermutung.

Wahrscheinlich ist wie in Kap. 5.4 aufgeführt, die Expression von HIF1 $\alpha$  und der HIF1-Zielgene auch bei Hyperthermie kombiniert mit Hypoxie durch **organregionsspezifische und zelltypspezifische Unterschiede sowie der metabolischen Zonierung** der Grund für die geringen Genregulationen.

## 5.7. Zusammenfassung der Diskussion

In dieser Arbeit wird zur Reaktion auf oxidativen Stress erzeugt durch Hypoxie und/oder Hyperthermie auf das Herz von Hühnerembryonen Stellung genommen. Der **Versuchsaufbau** ist für die Ergebnisse offensichtlich von großer Bedeutung. Die Messungen an einem Gesamtorganismus sind durch die übergeordneten Regulationsmechanismen unverfälscht aber weniger erfolgversprechend als bei Zellkulturen.

Die Entwicklungen der Körper- und Herzmassen, sowie die hohe Mortalitätsrate in allen Versuchsgruppen und die erhöhte Anzahl an Missbildungen sind der Beweis für ein Ungleichgewicht zwischen O<sub>2</sub>-Bedarf und reeller O<sub>2</sub>-Verfügbarkeit. Es kam unter den gewählten Versuchsbedingungen in allen Gruppen zu einer **O<sub>2</sub>-Schuld auf zellulärer Ebene (= Hypoxie)**. Das wurde durch die niedrigeren pH-Werte und die erhöhten Laktatwerte gegenüber der Kontrollgruppe am D12 gemessen im Blut in der gleichen Arbeitsgruppe bestätigt (Tab. 4, Feske, 2009).

Aus den morphologischen Befunden der eigenen Studie ist zu folgern, dass es während der Belastungsinubation nur bei alleiniger Hypoxie zu einem **Hypoxie-induzierten Hypometabolismus mit posthypoxischem Hypermetabolismus** kam. Die erhöhten Temperaturen der Hyperthermiegruppe und der Hypoxie+Hyperthermiegruppe führten zu einem erhöhten Wachstum während der Belastungsinubation. In der Hyperthermiegruppe trat danach eine **Wachstumsverzögerung** auf, die durch die gleichzeitige Hypoxie in der Hypoxie+Hyperthermiegruppe ausgeglichen wurde. Die niedrigere Mortalitätsrate bei chronischer Hypoxie (15%) kombiniert mit Hyperthermie (39,5°C) gegenüber alleiniger

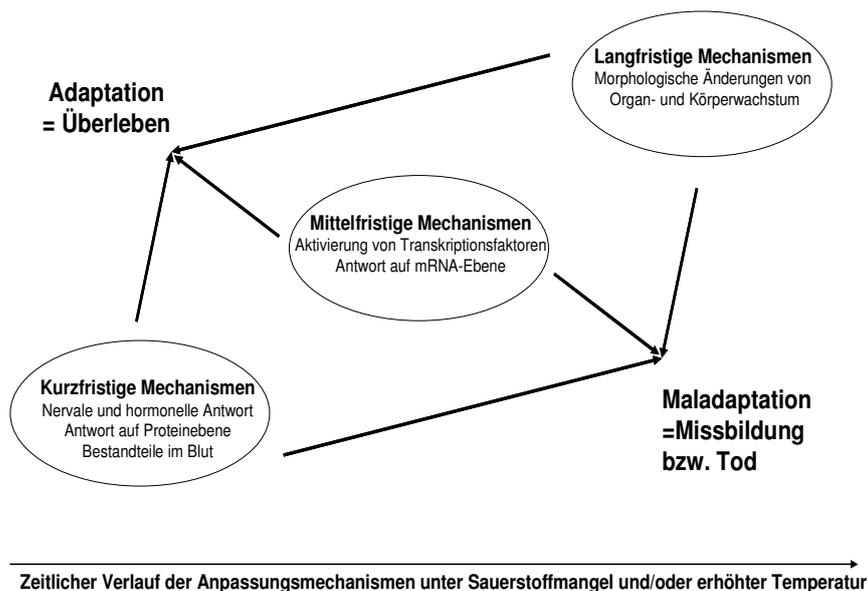
chronischer Hyperthermie sprechen für einen **positiven Einfluss der Hypoxie während gleichzeitiger Hyperthermie auf die Entwicklung des embryonalen Organismus**. Dies ist wahrscheinlich auf die **Kreuztoleranz** zwischen den verschiedenen Stressoren zurückzuführen (Horowitz *et al.*, 2004). Maloyan *et al.* (2005) vertreten die Hypothese, dass der Signalweg der Adaptation an O<sub>2</sub>-Mangel ein Bestandteil der Adaptation an erhöhte Temperaturen ist. Für beide Stressoren ist HIF wichtig, die Induktion des HIF-Signalwegs erfolgt **stressspezifisch**.

Die relativ geringen Regulationen auf mRNA-Ebene von HIF1 $\alpha$  und der HIF1-Zielgene beruhen in den vorliegenden Versuchsbedingungen auf **organregionsspezifischen, gewebs- und zelltypspezifischen Unterschieden sowie der metabolischen Zonierung**. Die erzielten Ergebnisse sind damit als Durchschnitt der mRNA-Gehalte der verschiedenen Organregionen, Gewebe und Zellen zu sehen. Das erklärt zum einen die Streuung zwischen den FC-Werten sowie die oft von der Kontrollgruppe nicht abweichenden FC-Werte. Trotzdem kommt es zu Unterschieden gegenüber der Kontrollgruppe auf mRNA-Ebene, die sogar Unterschiede zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen erkennen lassen. Es ist also von einer teilweise deutlichen Regulation auszugehen, abhängig von den verschiedenen Regionen im Herzen bzw. dem Gradienten innerhalb eines Gewebes.

Es ist zu vermuten, dass ein **Langzeiteffekt mit veränderter Genexpression** von bleibendem Charakter auf den Stoffwechsel des Hühnerembryos nach chronischer Hypoxie bzw. Hyperthermie in einer sensiblen Phase eintritt. Die erhöhten mRNA-Gehalte einiger Gene auch nach dem Ende der Belastungsinakubation vor allem in der Hyperthermiegruppe sind ein Zeichen für eine Veränderung der Expression mit bleibendem Charakter.

Genauso wie die Ausbildung des Dottersackkreislaufs beim Säuger ein kritischer Prozess während der embryonalen Entwicklung des Säugers darstellt (Akazawa *et al.*, 1994), ist die **Ausbildung der CAM als kritischer Prozess beim Vogelembryo** zu sehen. Wahrscheinlich ist der in Phase (D8-11) verfügbare O<sub>2</sub> entscheidend für die akkurate Ausbildung der CAM und damit für das Überleben des Embryos. Das stimmt mit den erhöhten Mortalitätsraten in der Kontrollgruppe überein, die in diese Phase der CAM-Ausbildung fallen. Für den O<sub>2</sub>-Verbrauch wurde von Dzialowski *et al.* (2002) eine kritische Phase als Antwort auf Hypoxie im mittleren Drittel der Inkubation definiert. Die Verteilung der Mortalität auf die Inkubationstage in der Hypoxiegruppe in den eigenen Versuchen lassen vermuten, dass das **kritische Fenster für den O<sub>2</sub>-Verbrauch bei D8-11 liegt**. Die Entwicklung der Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Kontrollachse zwischen D10-13 stimmt in der Hyperthermiegruppe mit den Inkubationstagen der höchsten Mortalitätsraten überein. Neben der Ausbildung der CAM ist wahrscheinlich die Ausbildung der Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Kontrollachse bei hohen Umgebungstemperaturen entscheidend.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse über die Kreuztoleranz der embryonalen Anpassungsmechanismen an O<sub>2</sub>-Mangel und Hyperthermie tragen zum weiteren Verständnis der Stressadaptation eines Organismus bei. Dabei ist anzunehmen, dass es eine zeitliche Abfolge der Auswirkungen eines oder mehrerer Stressoren gibt (Abb. 42). Die kurzfristige Antwort basiert auf nervalen und hormonellen Mechanismen. Schon vorhandene Proteine und andere Bestandteile in Blut und Geweben puffern die ersten Reaktionen ab. Bei einer andauernden Einwirkung der Stressoren kommt es zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie HIF1. Diese lösen eine Antwort auf mRNA-Ebene aus. Chronisch einwirkende Stressoren führen so zu morphologischen Änderungen von Organen und verändertem Körperwachstum. Dabei kann es zu adaptiven Veränderungen kommen, die das Überleben sichern. Maladaptive Veränderungen führen von Missbildungen bis zum Absterben des Embryos. Die Auswirkungen der Stressoren während der embryonalen Entwicklung auf das Wachstum des Herzens und des Gesamtembryos beeinflussen die Disposition für Herzkreislauferkrankungen im späteren Leben. Um die spezifischen Auswirkungen der Stressoren auf den postnatalen Organismus zu überprüfen, sind weiterführende Experimente notwendig.



**Abb. 42: Die zeitliche Abfolge der Anpassungsmechanismen des embryonalen Organismus bei Exposition mit einem oder mehreren Stressoren**

## 6. Zusammenfassung

### **Expression von Hypoxia Inducible Factor 1 (HIF1) und HIF1-regulierten Genen unter Sauerstoffmangel und/oder erhöhter Temperatur im Herzen von Hühnerembryonen**

Die O<sub>2</sub>-Versorgung von Hühnerembryonen wird durch die Eischale begrenzt. Die physiologisch steigende Hypoxie ist ein wichtiger Stimulus für die embryonale Entwicklung. Es war anzunehmen, dass eine künstliche Reduzierung des O<sub>2</sub>-Gehaltes und/oder erhöhte Temperaturen zu morphologischen und metabolischen Anpassungen führen.

Die Hühnerembryonen der Kontrollgruppe wurden bei 21% O<sub>2</sub> und 37,5°C bebrütet. Die drei Versuchsgruppen wurden den Stressoren O<sub>2</sub>-Mangel (15%) und/oder erhöhten Temperaturen (39,5°C) ausgesetzt: die Hypoxiegruppe von Inkubationstag (D) 6-12, die Hyperthermiegruppe von D8-12 und die Hypoxie+Hyperthermiegruppe von D8-12. Die Massen der Embryonen und ihrer Herzen sowie der Massenverlust des Hühnereis, die Missbildungsrate und die Mortalitätsrate wurden an verschiedenen Inkubationstagen in allen Gruppen bestimmt. Die mRNA-Gehalte von Hypoxia Inducible Factor 1 $\alpha$  (HIF1 $\alpha$ ) und der HIF1-regulierten Gene Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGFA), Enolase 1 (ENO1), Hämoxxygenase 1 (HO1), Glutathionperoxidase (GPx-3) und Hitzeschockprotein 90 (HSP90) wurden mittels quantitativer qPCR im Herzgewebe bestimmt. Die Expressionsraten der untersuchten Gene wurden anhand der Porphobilinogendesaminase (PBGD) normalisiert.

Es kam in der Hypoxiegruppe zu einer Wachstumsverzögerung der Embryonen durch den Hypoxie-induzierten Hypometabolismus mit posthypoxischem Hypermetabolismus. Dem erhöhten Wachstum der Embryonen in der Hyperthermiegruppe folgte eine Wachstumsverzögerung nach Ende der Belastungsinubation. Ein erhöhtes Wachstum ohne folgende Wachstumsverzögerung trat in der Hypoxie+Hyperthermiegruppe auf. Die relativen Herzmassen der Hypoxiegruppe waren an den Tagen D12, 18 und 20 erhöht, also an den Tagen an denen die Belastungsinubation am längsten dauerte bzw. an denen die physiologisch steigende Hypoxie den Organismus am meisten belastete. Das Herz scheint die größten kompensatorischen Anpassungsmechanismen unter alleiniger Hypoxie zu haben. Die chronische Hyperthermie war am lebensbedrohlichsten von allen untersuchten Stressoren. Der durch die Hyperthermie aktivierte Stoffwechsel wurde durch gleichzeitige Hypoxie gebremst und hatte einen positiven Effekt auf das Überleben der Embryonen. Das ist auf die Kreuztoleranz zwischen verschiedenen Stressoren zurückzuführen.

Die Hypoxiegruppe wies die geringsten und die Hyperthermiegruppe die größten Änderungen auf der mRNA-Ebene auf. Diese Arbeit zeigt, dass die Untersuchung des Gesamtherzens die organregionsspezifische, gewebs- und zelltypspezifische Regulation von HIF1 und der HIF1-regulierten Gene nicht berücksichtigt. Es ist davon auszugehen, dass

auch im Herzen eine metabolische Zonierung existiert. Dass es trotzdem zu vereinzelt Genregulationen kam, lässt teilweise massive Veränderungen auf der mRNA-Ebene vermuten. Bei einer speziellen Untersuchung von Organregionen, Geweben- und Zelltypen und unter Berücksichtigung der metabolischen Zonierung sind deutliche Genregulationen anzunehmen.

Die Ausbildung der Chorioallantoismembran (CAM) ist als kritischer Prozess beim Vogelembryo zu sehen. Der verfügbare  $O_2$  ist in Phase (D8-11) entscheidend für die akkurate Ausbildung der CAM und damit für das Überleben des Embryos. Aufgrund der Verteilung der Mortalität der Embryonen auf die Inkubationstage in der Hypoxiegruppe ist anzunehmen, dass das kritische Fenster für den  $O_2$ -Verbrauch auf D8-11 eingengt werden kann.

Die Ergebnisse dieser Arbeit tragen zur erweiterten Kenntnis der Anpassungsmechanismen des Embryos an verschiedene Stressoren und der Kreuztoleranz bei. Die Auswirkungen verschiedener Stressoren während der embryonalen Entwicklung auf das Wachstum des Herzens und des gesamten Embryos sind bedeutend für das Verständnis später auftretender Krankheiten. Die ausgelösten Mechanismen aufgrund eines oder mehrerer Stressoren folgen dabei einem zeitlichen Verlauf. Kurzfristige Einflüsse erfolgen neuronal und humoral bzw. auf der Proteinebene. Mittelfristige Einflüsse lösen über Transkriptionsaktivatoren wie HIF Genregulationen aus. Längerfristig einwirkende Stressoren führen zu morphologischen Veränderungen, die entweder zum Überleben, Missbildungen oder zum Tod des Embryos führen.

## 7. Summary

### **Expression of Hypoxia Inducible Factor (HIF1) and HIF1 regulated genes under hypoxia and/or high temperature in hearts of chicken embryos**

The oxygen supply of chicken embryos is limited by the egg shell. The increasing physiological hypoxia is an important stimulus of embryonic development. The purpose of this study is to show that the artificial reduction of oxygen content and/or high ambient temperatures leads to morphological and metabolic adaptation by the organism.

Chicken embryos of the control group were incubated under 21% O<sub>2</sub> and 37.5°C. The experimental groups were incubated under hypoxia (15% O<sub>2</sub>) and/or high temperatures (39.5°C). The hypoxic group was incubated under modified conditions from incubation days (D) 6-12, the hyperthermic group from D8-12 and the combined hypoxic+hyperthermic group from D8-12. Body mass, heart mass, loss of mass of the egg, rate of malformation and mortality were all measured at different incubation days in all groups. The mRNA-levels of Hypoxia inducible factor 1 $\alpha$  (HIF1 $\alpha$ ) and the HIF1 $\alpha$  regulated genes: Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGFA), Enolase 1 (ENO1), Heme Oxygenase (HO1), Glutathione Peroxidase (GPx-3) and Heat Shock Protein 90 (HSP90) in the heart of the embryos were determined via quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR). The expression rate of the genes of interest was normalized to Porphobilinogen Deaminase (PBGD).

There was a retardation of growth due to the hypoxia-induced hypometabolism followed by a posthypoxic hypermetabolism. The increased body growth in the hyperthermic group was followed by growth retardation after the end of the stress incubation. In the hypoxic+hyperthermic group the body growth was increased without following growth restriction. The relative heart mass of the hypoxic group was elevated at D12, D18 and D20. On these days the embryos were incubated for the longest period of time. Under such conditions respectively the physiologically increasing hypoxia was stressing the heart, in which the hypoxic group seems to have the biggest compensatory mechanisms. The chronic hyperthermia was most life-threatening of all examined stress factors. The hyperthermia-activated metabolism was limited by simultaneous hypoxia and had a positive impact on the survival of the embryos. This can be attributed to the cross tolerance between various stress factors.

The mRNA levels of the genes of interest had the smallest changes in the hypoxic group and the biggest changes in the hyperthermic group. This study shows that the examination of the heart as a whole underestimates the specificity of HIF1 $\alpha$  related gene expression regarding different organ regions, tissues and cell types. It is to be assumed that the metabolic zonation exists also in the heart. The occasional up-regulations imply considerable changes

in gene expression, if taken into consideration the specific investigation of organ regions, tissues, cell types and the metabolic zonation.

The formation of the chorioallantoic membrane (CAM) is to be considered a critical process of avian embryonic development. From D8-11 the available oxygen is crucial for the accurate formation of the CAM and therefore for survival. The distribution of the embryonic mortality on the incubation days in the hypoxic group suggests strongly that the critical window of oxygen consumption can be restricted on D8-11.

These results contribute to the knowledge of the adaptation mechanisms of the embryonic stress response and the cross tolerance between stress factors. The influence of these various factors on the growth of the heart and the body as a whole during embryonic development are significant for the understanding of the incidence of later illnesses such as cardiovascular diseases. The mechanisms of a stress response follow a time-dependent course. A short-term response is based on neuronal and humoral reactions on the protein level. A medium-term response triggers off gene regulation e.g. via HIF1 (-induced) transcriptional activation. Long-lasting stressors induce morphological changes causing survival, malformations, or death of the embryos.

## 8. Zitierte Literatur

- ABDEL-ALEEM, S., ST LOUIS, J. D., HUGHES, G. C., LOWE, J. E. (1999)  
Metabolic changes in the normal and hypoxic neonatal myocardium.  
Ann N Y Acad Sci 874: 254-61
- ACKERMAN, R. A., RAHN, H. (1981)  
In vivo O<sub>2</sub> and water vapor permeability of the hen's eggshell during early development.  
Respir Physiol 45(1): 1-8
- AKAZAWA, S., UNTERMAN, T., METZGER, B. E. (1994)  
Glucose metabolism in separated embryos and investing membranes during organogenesis in the rat.  
Metabolism 43(7): 830-5
- ALLEN, R. G. (1991)  
Oxygen-reactive species and antioxidant responses during development: the metabolic paradox of cellular differentiation.  
Proc Soc Exp Biol Med 196(2): 117-29
- ANDE, T. B., WILSON, H. R. (1981)  
Hatchability of chicken embryos exposed to acute high temperature stress at various ages.  
Poult Sci 60: 1561-1566
- AR, A., RAHN, H. (1985)  
Pores in avian eggshells: gas conductance, gas exchange and embryonic growth rate.  
Respir Physiol 61(1): 1-20
- AR, A., GIRARD, H., RODEAU, J. L. (1991)  
Oxygen uptake and chorioallantoic blood flow changes during acute hypoxia and hyperoxia in the 16 day chicken embryo.  
Respir Physiol 83(3): 295-312
- ARAI, A. E., PANTELY, G. A., ANSELONE, C. G., BRISTOW, J., BRISTOW, J. D. (1991)  
Active downregulation of myocardial energy requirements during prolonged moderate ischemia in swine.  
Circ Res 69(6): 1458-69
- AZZAM, M. A., MORTOLA, J. P. (2007)  
Organ growth in chicken embryos during hypoxia: implications on organ "sparing" and "catch-up growth".  
Respir Physiol Neurobiol 159(2): 155-62
- BAIRD, N. A., TURNBULL, D. W., JOHNSON, E. A. (2006)  
Induction of the Heat Shock Pathway during Hypoxia Requires Regulation of Heat Shock Factor by Hypoxia-inducible Factor-1.  
J Biol Chem 281(50): 38675-38681
- BAR, T., STAHLBERG, A., MUSZTA, A., KUBISTA, M. (2003)  
Kinetic Outlier Detection (KOD) in real-time PCR.  
Nucleic Acids Res 31(17): 105

- BARRY, W. H., POBER, J., MARSH, J. D., FRANKEL, S. R., SMITH, T. W. (1980)  
Effects of graded hypoxia on contraction of cultured chick embryo ventricular cells.  
Am J Physiol 239(5): H651-7
- BARTELS, H., BAUMANN, F. (1972)  
Metabolic rate of early embryos (4-22 somites) at varying oxygen pressures.  
Respir Physiol 16(1): 1-15
- BAUMANN, R., PADEKEN, S., HALLER, E. A. (1982)  
Functional properties of embryonic chicken hemoglobins.  
J Appl Physiol 53(6): 1439-48
- BAUMANN, R., PADEKEN, S., HALLER, E. A., BRILMAYER, T. (1983)  
Effects of hypoxia on oxygen affinity, hemoglobin pattern, and blood volume of early chicken embryos.  
Am J Physiol 244(5): R733-41
- BAUMANN, R., MEUER, H. J. (1992)  
Blood oxygen transport in the early avian embryo.  
Physiol Rev 72(4): 941-65
- BAUMEL, J. J., KING, A. S., BREAZILE, J. E., EVANS, H. E., BERGE, J. M. V. (1993)  
Handbook of Avian Anatomy: Nomina Anatomica Avium.  
Cambridge, Massachusetts, Nutall Ornithological Club
- BERRA, E., BENIZRI, E., GINOUVES, A., VOLMAT, V., ROUX, D., POUYSSEGUR, J. (2003)  
HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1 $\alpha$  in normoxia.  
Embo J 22(16): 4082-90
- BEZZEL, E., PRINZINGER, R. (1990)  
Ornithologie.  
Stuttgart, Ulmer Verlag
- BOEHM, C., JOHNSON, T. R., CASTON, J. D. PRZYBYLSKI, R. J. (1987)  
Cardiac hypertrophy in chick embryos induced by hypothermia.  
Am J Physiol 252(1 Pt 1): C97-104
- BOUTILIER, R. G. (2001)  
Mechanisms of cell survival in hypoxia and hypothermia.  
J Exp Biol 204(18): 3171-3181
- BRAUCH, N. (2003)  
Der Einfluss von unterschiedlichen Inkubationstemperaturen und Sauerstoffmangel auf die Konzentration von zyklischem Adenosinmonophosphat in embryonalen Herzzellen von Hühnern (*Gallus gallus f. domestica*). Veterinär-Physiologie,  
Dissertation, Berlin, Freie Universität Berlin
- BROWN, J. L., INGRAM, V. M. (1974)  
Structural studies on chick embryonic hemoglobins.  
J Biol Chem 249(12): 3960-72

- BUDINGER, G. R., CHANDEL, N., SHAO, Z. H., LI, C. Q., MELMED, A., BECKER, L. B., SCHUMACKER, P. T. (1996)  
Cellular energy utilization and supply during hypoxia in embryonic cardiac myocytes.  
*Am J Physiol* 270(1 Pt 1): L44-53
- BUNN, H. F., POYTON, R. O. (1996)  
Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia.  
*Physiol Rev* 76(3): 839-85
- BUNN, H. F., GU, J., HUANG, L. E., PARK, J. W., ZHU, H. (1998)  
Erythropoietin: a model system for studying oxygen-dependent gene regulation.  
*J Exp Biol* 201(Pt 8): 1197-201
- BURGGREN, W. (1998)  
Studying physiological development: past, present, and future.  
*Biol Bull NTNU* 33: 71 -84
- BURTON, R. R., SMITH, A. H. (1969)  
Induction of cardiac hypertrophy and polycythemia in the developing chick at high altitude.  
*Fed Proc* 28(3): 1170-7
- BUSTIN, S. A. (2000)  
Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays.  
*J Mol Endocrinol* 25(2): 169 - 193
- BUSTIN, S. A. (2002)  
Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems.  
*J Mol Endocrinol* 29(1): 23-39
- CARMELIET, P., FERREIRA, V., BREIER, G., POLLEFEYT, S., KIECKENS, L., GERTSENSTEIN, M., FAHRIG, M., VANDENHOECK, A., HARPAL, K., EBERHARDT, C., DECLERCQ, C., PAWLING, J., MOONS, L., COLLEN, D., RISAU, W., NAGY, A. (1996)  
Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele.  
*Nature* 380(6573): 435-9
- CATRON, T., MENDIOLA, M. A., SMITH, S. M., BORN, J., WALKER, M. K. (2001)  
Hypoxia Regulates Avian Cardiac Arnt and HIF-1[alpha] mRNA Expression.  
*Biochem Biophys Res Commun* 282(2): 602-607
- CHAN, T., BURGGREN, W. (2005)  
Hypoxic incubation creates differential morphological effects during specific developmental critical windows in the embryo of the chicken (*Gallus gallus*).  
*Respir Physiol Neurobiol* 145(2-3): 251-63
- CHANDEL, N. S., MALTEPE, E., GOLDWASSER, E., MATHIEU, C. E., SIMON, M. C., SCHUMACKER, P. T. (1998)  
Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription.  
*Proc Natl Acad Sci U S A* 95(20): 11715-20

- CHEN, E. Y., FUJINAGA, M., GIACCIA, A. J. (1999)  
Hypoxic microenvironment within an embryo induces apoptosis and is essential for proper morphological development.  
Teratology 60(4): 215-225
- CHRISTENSEN, V. L., WINELAND, M. J., FASENKO, G. M., DONALDSON, W. E. (2001)  
Egg storage effects on plasma glucose and supply and demand tissue glycogen concentrations of broiler embryos.  
Poult Sci 80(12): 1729-35
- CIROTTO, C., SCOTTO DI TELLA, A., GERACI, G. (1975)  
The hemoglobins of the developing chicken embryos. Fractionation and globin composition of the individual component of total erythrocytes and of a single erythrocyte type.  
Cell Differ 4(2): 87-99
- CIROTTO, C., ARANGI, I. (1989)  
How do avian embryos breathe? Oxygen transport in the blood of early chick embryos.  
Comp Biochem Physiol A 94(4): 607-13
- CLARK, C. M., JR. (1973)  
Characterization of glucose metabolism in the isolated rat heart during fetal and early neonatal development.  
Diabetes 22(1): 41-9
- COHEN, W. R., PIASECKI, G. J., COHN, H. E., YOUNG, J. B., JACKSON, B. T. (1984)  
Adrenal secretion of catecholamines during hypoxemia in fetal lambs.  
Endocrinology 114(2): 383-90
- CROSSLEY, D. 2<sup>ND</sup>, ALTIMIRAS, J. (2000)  
Ontogeny of cholinergic and adrenergic cardiovascular regulation in the domestic chicken (*Gallus gallus*).  
Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 279(3): R1091-8
- CROSSLEY, D. A. 2<sup>ND</sup>, BURGGREN, W. W., ALTIMIRAS, J. (2003)  
Cardiovascular regulation during hypoxia in embryos of the domestic chicken *Gallus gallus*.  
Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 284(1): R219-26
- CULLEN, P., LORKOWSKI, S., KRATZ, M., WERNER, M., MARSCHALL, C., KLEIN, H.-G., GOODLETT, D., AEBERSOLD, R., WENNER, C. (2004)  
Basic Concepts of Gene Expression.  
In *Analysing Gene Expression : A Handbook of Methods Possibilities and Pitfalls*, Lorkowski, S., Cullen, P., eds., Wiley-VCH Verlag, Weinheim: 1-95
- D'ANGELO, G., DUPLAN, E., BOYER, N., VIGNE, P., FRELIN, C. (2003)  
Hypoxia up-regulates prolyl hydroxylase activity: a feedback mechanism that limits HIF-1 responses during reoxygenation.  
J Biol Chem 278(40): 38183-7
- DECKER, S. (2002)  
Der langfristige Einfluss eines verminderten O<sub>2</sub>-Angebotes während der Inkubation auf Catecholamine, Stoffwechselmetabolite sowie Hämatokrit und Hämoglobin im Blut von Hühner- und Entenembryonen.  
Dissertation, Berlin, Freie Universität Berlin

- DECKER, S., TÖNHARDT, H., DZIALOWSKI, E. (2002)  
Catecholamine und 2,3-Diphosphoglycerat(2,3-DPG) im Blut von Hühnerembryonen (Gallus gallus domesticus) und ihre Antwort auf chronische, milde Hypoxie.  
15. Jahrestagung der DVG-Fachgruppe Physiologie und Biochemie, Wien, Tagung / Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft / Fachgruppe Physiologie und Biochemie
- DITTMANN, I., TÖNHARDT, H. (2008)  
Adaptation der Genexpression unter chronischer Hypoxie und/oder erhöhter Temperatur im Myokard von Hühnerembryonen.  
18. Tagung der DVG-Fachgruppe Physiologie und Biochemie., Universität Leipzig, Leipziger Blaue Hefte LBH
- DITTMANN, I., NECHAEVA, M., TÖNHARDT, H. (2009)  
Analysis of the messenger RNA Levels of Inducible Nitric Oxide Synthase, Tyrosine Hydroxylase, Dopamine D1a and D2 Receptor in Various Embryonic Tissues of Chicken under Chronic Hypoxia. Unpublished data.  
Berlin, Institute of Veterinary-Physiology
- DJONOV, V. G., GALLI, A. B., BURRI, P. H. (2000)  
Intussusceptive arborization contributes to vascular tree formation in the chick chorio-allantoic membrane.  
Anat Embryol (Berl) 202(5): 347-57
- DJONOV, V. G., KURZ, H., BURRI, P. H. (2002)  
Optimality in the developing vascular system: branching remodeling by means of intussusception as an efficient adaptation mechanism.  
Dev Dyn 224(4): 391-402
- DONKOH, A. (1989)  
Ambient temperature: a factor affecting performance and physiological response of broiler chickens.  
Int J Biometeorol 33(4): 259-65
- DORN, G. W., 2<sup>ND</sup>, ROBBINS, J., SUGDEN, P. H. (2003)  
Phenotyping hypertrophy: eschew obfuscation.  
Circ Res 92(11): 1171-5
- DÖRNER, K. (1976)  
Hormones and brain differentiation.  
Amsterdam, Oxford, N.Y., Elsevier
- DRAGON, S., GLOMBITZA, S., GOTZ, R., BAUMANN, R. (1996)  
Norepinephrine-mediated hypoxic stimulation of embryonic red cell carbonic anhydrase and 2,3-DPG synthesis.  
Am J Physiol 271(4 Pt 2): R982-9
- DRAGON, S., BAUMANN, R. (2001)  
Erythroid carbonic anhydrase and hsp70 expression in chick embryonic development: role of cAMP and hypoxia.  
Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 280(3): R870-878
- DRIEDZIC, W. R., GESSER, H. (1994)  
Energy metabolism and contractility in ectothermic vertebrate hearts: hypoxia, acidosis, and low temperature.  
Physiol Rev 74(1): 221-58

- DRUYAN, S., CAHANER, A., ASHWELL, C. M. (2007)  
The Expression Patterns of Hypoxia-Inducing Factor Subunit {alpha}-1, Heme Oxygenase, Hypoxia Upregulated Protein 1, and Cardiac Troponin T During Development of the Chicken Heart.  
Poult Sci 86(11): 2384-2389
- DURANTEAU, J., CHANDEL, N. S., KULISZ, A., SHAO, Z., SCHUMACKER, P. T. (1998)  
Intracellular signaling by reactive oxygen species during hypoxia in cardiomyocytes.  
J Biol Chem 273(19): 11619-24
- DUSSEAU, J. W., HUTCHINS, P. M. (1988)  
Hypoxia-induced angiogenesis in chick chorioallantoic membranes: a role for adenosine.  
Respir Physiol 71(1): 33-44
- DZIALOWSKI, E. M., VON PLETTENBERG, D., ELMONOUFY, N. A., BURGGREN, W. W. (2002)  
Chronic hypoxia alters the physiological and morphological trajectories of developing chicken embryos.  
Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol 131(4): 713-24
- ECKERT, R. (1986)  
Tierphysiologie.  
Stuttgart; New York, Thieme Verlag
- ELVERT, G., KAPPEL, A., HEIDENREICH, R., ENGLMEIER, U., LANZ, S., ACKER, T., RAUTER, M., PLATE, K., SIEWEKE, M., BREIER, G., FLAMME, I. (2003)  
Cooperative interaction of hypoxia-inducible factor-2alpha (HIF-2alpha ) and Ets-1 in the transcriptional activation of Vascular Endothelial Growth Factor receptor-2 (Flk-1).  
J Biol Chem 278(9): 7520-30
- EPPLE, A., GILL, T. S., NIBBIO, B. (1992)  
The avian allantois: a depot for stress-released catecholamines.  
Gen Comp Endocrinol 85(3): 462-76
- EPSTEIN, A. C., GLEADLE, J. M., MCNEILL, L. A., HEWITSON, K. S., O'ROURKE, J., MOLE, D. R., MUKHERJI, M., METZEN, E., WILSON, M. I., DHANDA, A., TIAN, Y. M., MASSON, N., HAMILTON, D. L., JAAKKOLA, P., BARSTEAD, R., HODGKIN, J., MAXWELL, P. H., PUGH, C. W., SCHOFIELD, C. J., RATCLIFFE, P. J. (2001)  
C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation.  
Cell 107(1): 43-54
- EYNAN, M., KNUBUVETZ, T., MEIRI, U., NAVON, G., GERSTENBLITH, G., BROMBERG, Z., HASIN, Y. HOROWITZ, M. (2002)  
Heat acclimation-induced elevated glycogen, glycolysis, and low thyroxine improve heart ischemic tolerance.  
J Appl Physiol 93(6): 2095-2104
- FERRARA, N., DAVIS-SMYTH, T. (1997)  
The biology of Vascular Endothelial Growth Factor.  
Endocr Rev 18(1): 4-25

- FESKE, D. (2009)  
Einfluss von Sauerstoff und Temperatur auf die Zusammensetzung embryonaler Flüssigkeiten bei Gallus gallus domesticus. Veterinär-Physiologie,  
Dissertation, Berlin, Freie Universität Berlin
- FONG, G. H. (2008)  
Mechanisms of adaptive angiogenesis to tissue hypoxia.  
Angiogenesis 11(2): 121-40
- FONG, G. H. (2009)  
Regulation of angiogenesis by oxygen sensing mechanisms.  
J Mol Med 87(6): 549-60
- FORSYTHE, J. A., JIANG, B. H., IYER, N. V., AGANI, F., LEUNG, S. W., KOOS, R. D., SEMENZA, G. L. (1996)  
Activation of Vascular Endothelial Growth Factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1.  
Mol Cell Biol 16(9): 4604-13
- FOSS, R., GUHA-THAKURTA, N., CONRAN, R., GUTMAN, P. (1994)  
Effects of fixative and fixation time on the extraction and polymerase chain reaction amplification of RNA from paraffin-embedded tissue. Comparison of two housekeeping gene mRNA controls.  
Diagn Mol Pathol. 3(3): 148-55
- FREEMAN, B. M., VINCE, M. A (1974)  
Development of the Avian Embryo.  
London, Chapman and Hall Ltd.
- FREEMAN, W. M., WALKER, S. J., VRANA, K. E. (1999)  
Quantitative RT-PCR: Pitfalls and Potential.  
BioTechniques 26: 112-125
- FRENCH, N. A. (1998)  
Overheating turkey eggs: Critical periods during incubation.  
Proc 10th Eur Poult Conf: 790-794
- FUKUDA, R., HIROTA, K., FAN, F., JUNG, Y. D., ELLIS, L. M., SEMENZA, G. L. (2002)  
Insulin-like growth factor 1 induces hypoxia-inducible factor 1-mediated Vascular Endothelial Growth Factor expression, which is dependent on MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling in colon cancer cells.  
J Biol Chem 277(41): 38205-11
- FUKUDA, R., ZHANG, H., KIM, J. W., SHIMODA, L., DANG, C. V., SEMENZA, G. L. (2007)  
HIF-1 regulates cytochrome oxidase subunits to optimize efficiency of respiration in hypoxic cells.  
Cell 129(1): 111-22
- GEVA, E., GINZINGER, D. G., ZALOUDEK, C. J., MOORE, D. H., BYRNE, A., JAFFE, R. B. (2002)  
Human placental vascular development: vasculogenic and angiogenic (branching and nonbranching) transformation is regulated by Vascular Endothelial Growth Factor-A, angiopoietin-1, and angiopoietin-2.  
J Clin Endocrinol Metab 87(9): 4213-24

- GUZY, R. D., HOYOS, B., ROBIN, E., CHEN, H., LIU, L., MANSFIELD, K. D., SIMON, M. C., HAMMERLING, U. SCHUMACKER, P. T. (2005)  
Mitochondrial complex III is required for hypoxia-induced ROS production and cellular oxygen sensing.  
Cell Metab 1(6): 401-8
- GUZY, R. D., SCHUMACKER, P. T. (2006)  
Oxygen sensing by mitochondria at complex III: the paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia.  
Exp Physiol 91(5): 807-19
- HADDAD, J. J. (2002)  
Oxygen-sensing mechanisms and the regulation of redox-responsive transcription factors in development and pathophysiology.  
Respir Res 3(1): 26
- HAGGBLOM, L., TERWILLIGER, R. C., TERWILLIGER, N. B. (1988)  
Changes in myoglobin and lactate dehydrogenase in muscle tissues of a diving bird, the Pigeon Guillemot, during maturation.  
Comp Biochem Physiol B 91(2): 273-7
- HASHIMOTO, E., OGITA, T., NAKAOKA, T., MATSUOKA, R., TAKAO, A., KIRA, Y. (1994)  
Rapid induction of Vascular Endothelial Growth Factor expression by transient ischemia in rat heart.  
Am J Physiol 267(5 Pt 2): H1948-54
- HEUCH, G. (1998)  
Hibernating myocardium.  
Physiol Rev 78: 1055-1085
- HIGUCHI, R., DOLLINGER, G., WALSH, P. S., GRIFFITH, R. (1992)  
Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences.  
Biotechnology (N Y) 10(4): 413-7
- HIGUCHI, R., FOCKLER, C., DOLLINGER, G., WATSON, R. (1993)  
Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions.  
Biotechnology (N Y) 11(9): 1026-30
- HOCHACHKA, P. W. (1986)  
Defense strategies against hypoxia and hypothermia.  
Science 231(4735): 234-41
- HOCHACHKA, P. W., BUCK, L. T., DOLL, C. J., LAND, S. C. (1996)  
Unifying theory of hypoxia tolerance: molecular/metabolic defense and rescue mechanisms for surviving oxygen lack.  
Proc Natl Acad Sci U S A 93(18): 9493-8
- HOROWITZ, M. (2002)  
From molecular and cellular to integrative heat defense during exposure to chronic heat.  
Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology 131(3): 475-483
- HOROWITZ, M. (2003)  
Matching the Heart to Heat-Induced Circulatory Load: Heat-Acclimatory Responses.  
News Physiol Sci 18(6): 215-221

- HOROWITZ, M., ELI-BERCHOER, L., WAPINSKI, I., FRIEDMAN, N., KODESH, E. (2004)  
 Stress-related genomic responses during the course of heat acclimation and its association with ischemic-reperfusion cross-tolerance.  
*J Appl Physiol* 97(4): 1496-1507
- HU, C. J., WANG, L. Y., CHODOSH, L. A., KEITH, B., SIMON, M. C. (2003)  
 Differential roles of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and HIF-2alpha in hypoxic gene regulation.  
*Mol Cell Biol* 23(24): 9361-74
- HU, C. J., IYER, S., SATAUR, A., COVELLO, K. L., CHODOSH, L. A., SIMON, M. C. (2006)  
 Differential regulation of the transcriptional activities of hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1alpha) and HIF-2alpha in stem cells.  
*Mol Cell Biol* 26(9): 3514-26
- HU, N., CLARK, E. B. (1989)  
 Hemodynamics of the stage 12 to stage 29 chick embryo.  
*Circ Res* 65(6): 1665-70
- HUANG, L. E., GU, J., SCHAU, M., BUNN, H. F. (1998)  
 Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O<sub>2</sub>-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway.  
*Proc Natl Acad Sci U S A* 95(14): 7987-92
- HÜHNKE, A., TÖNHARDT, H. (2004)  
 Oxygen deficiency and blood-gas-state in the chorio-allantoic vein in the chicken embryo.  
*Avian Poult Biol Rev*: 132-136
- ISAACS, J. S., JUNG, Y.-J., MIMNAUGH, E. G., MARTINEZ, A., CUTTITTA, F., NECKERS, L. M. (2002)  
 Hsp90 Regulates a von Hippel Lindau-independent Hypoxia-inducible Factor-1alpha - degradative Pathway.  
*J Biol Chem* 277(33): 29936-29944
- IVNITSKI-STEEL, I. D., SANCHEZ, A., WALKER, M. K. (2004)  
 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin reduces myocardial hypoxia and Vascular Endothelial Growth Factor expression during chick embryo development.  
*Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 70(2): 51-8
- IYER, N. V., KOTCH, L. E., AGANI, F., LEUNG, S. W., LAUGHNER, E., WENGER, R. H., GASSMANN, M., GEARHART, J. D., LAWLER, A. M., YU, A. Y., SEMENZA, G. L. (1998)  
 Cellular and developmental control of O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha.  
*Genes Dev* 12(2): 149-62
- JACKSON, D. C. (2004)  
 Acid-base balance during hypoxic hypometabolism: selected vertebrate strategies.  
*Respir Physiol Neurobiol* 141(3): 273-83
- JENSEN, A., GARNIER, Y., BERGER, R. (1999)  
 Dynamics of fetal circulatory responses to hypoxia and asphyxia.  
*Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 84(2): 155-72

- JIANG, B. H., RUE, E., WANG, G. L., ROE, R., SEMENZA, G. L. (1996)  
Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1.  
J Biol Chem 271(30): 17771-8
- JIANG, B. H., SEMENZA, G. L., BAUER, C., MARTI, H. H. (1996)  
Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O<sub>2</sub> tension.  
Am J Physiol 271(4 Pt 1): C1172-80
- JONES, A. R., DU TOIT, J. I. (1985)  
The anti-glycolytic action of (S)-alpha-chlorohydrin on epididymal bovine spermatozoa in vitro.  
Int J Androl 8(2): 119-27
- JONKER, S. S., GIRAUD, M. K., GIRAUD, G. D., CHATTERGOON, N. N., LOUEY, S., DAVIS, L. E., FABER, J. J., THORNBURG, K. L. (2010)  
Cardiomyocyte enlargement, proliferation and maturation during chronic fetal anaemia in sheep.  
Exp Physiol 95(1): 131-9
- KATSCHINSKI, D. M., LE, L., HEINRICH, D., WAGNER, K. F., HOFER, T., SCHINDLER, S. G., WENGER, R. H. (2002)  
Heat induction of the unphosphorylated form of hypoxia-inducible factor-1alpha is dependent on heat shock protein-90 activity.  
J Biol Chem 277(11): 9262-7
- KELLY, B. D., HACKETT, S. F., HIROTA, K., OSHIMA, Y., CAI, Z., BERG-DIXON, S., ROWAN, A., YAN, Z., CAMPOCHIARO, P. A., SEMENZA, G. L. (2003)  
Cell type-specific regulation of angiogenic growth factor gene expression and induction of angiogenesis in nonischemic tissue by a constitutively active form of hypoxia-inducible factor 1.  
Circ Res 93(11): 1074-81
- KHANDOKER, A. H., FUKAZAWA, K., DZIALOWSKI, E. M., BURGGREN, W. W., TAZAWA, H. (2004)  
Maturation of the homeothermic response of heart rate to altered ambient temperature in developing chick hatchlings (*Gallus gallus domesticus*).  
Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 286(1): R129-37
- KIETZMANN, T., PORWOL, T., ZIEROLD, K., JUNGERMANN, K., ACKER, H. (1998)  
Involvement of a local fenton reaction in the reciprocal modulation by O<sub>2</sub> of the glucagon-dependent activation of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene and the insulin-dependent activation of the glucokinase gene in rat hepatocytes.  
Biochem J 335 ( Pt 2): 425-32
- KIETZMANN, T., FANDREY, J., ACKER, H. (2000)  
Oxygen Radicals as Messengers in Oxygen-Dependent Gene Expression.  
News Physiol Sci 15: 202-208
- KIM, J. W., TCHERNYSHYOV, I., SEMENZA, G. L., DANG, C. V. (2006)  
HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia.  
Cell Metab 3(3): 177-85

- KIRBY, M. L., STEWART, D. E. (1986)  
Development of the ANS innervation to the avian heart.  
Clifton, New Jersey, In: Gootman P (ed) Developmental Neurobiology of the  
Autonomic Nervous System. Humana Press
- KLEMM, C. (2002)  
Bestimmung von Catecholaminen, Cortisol, 2,3-Diphosphoglycerat und Glucose im  
Blut von Entenembryonen (*Cairina moschata*) unter dem Einfluss verschiedener  
Inkubationstemperaturen sowie unter Berücksichtigung der Lage und des internal  
pipping der Embryonen. Veterinär-Physiologie,  
Dissertation, Berlin, Freie Universität Berlin
- KNOWLES, H. J., RAVAL, R. R., HARRIS, A. L., RATCLIFFE, P. J. (2003)  
Effect of ascorbate on the activity of hypoxia-inducible factor in cancer cells.  
Cancer Res 63(8): 1764-8
- KOLAR, F., OSTADAL, B. (2004)  
Molecular mechanisms of cardiac protection by adaptation to chronic hypoxia.  
Physiol Res 53 Suppl 1: S3-13
- KRISHNAN, J., AHUJA, P., BODENMANN, S., KNAPIK, D., PERRIARD, E., KREK, W.,  
PERRIARD, J. C. (2008)  
Essential role of developmentally activated hypoxia-inducible factor 1alpha for cardiac  
morphogenesis and function.  
Circ Res 103(10): 1139-46
- KÜHN, E., BERGHMAN, L., MOONS, L., VANDESANDE, F., DECUYPERE, E., DARRAS, V.  
(1993)  
Hypothalamic and peripheral control of thyroid function during the life cycle of the  
chicken.  
Avian Endocrinology S. P. (Eds.), Bristol, UK, Journal of Endocrinology: 29-46
- KUTCHAI, H., STEEN, J. B. (1971)  
Permeability of the shell and shell membranes of hens' eggs during development.  
Respir Physiol 11(3): 265-78
- LATCHMAN, D. S. (2001)  
Heat shock proteins and cardiac protection.  
Cardiovasc Res 51(4): 637-46
- LAUGHNER, E., TAGHAVI, P., CHILES, K., MAHON, P. C., SEMENZA, G. L. (2001)  
HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-  
1alpha) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated Vascular Endothelial Growth  
Factor expression.  
Mol Cell Biol 21(12): 3995-4004
- LEE, P. J., JIANG, B. H., CHIN, B. Y., IYER, N. V., ALAM, J., SEMENZA, G. L. CHOI, A. M.  
(1997)  
Hypoxia-inducible factor-1 mediates transcriptional activation of the heme oxygenase-  
1 gene in response to hypoxia.  
J Biol Chem 272(9): 5375-81
- LEE, S. C., DOWNEY, H. F. (1993)  
Downregulation of oxygen demand in isoprenaline stimulated canine myocardium.  
Cardiovasc Res 27(8): 1542-50

- LEGER, J. P., SMITH, F. M., CURRIE, R. W. (2000)  
Confocal microscopic localization of constitutive and heat shock-induced proteins HSP70 and HSP27 in the rat heart.  
Circulation 102(14): 1703-9
- LEVY, A. P., LEVY, N. S., LOSCALZO, J., CALDERONE, A., TAKAHASHI, N., YEO, K. T., KOREN, G., COLUCCI, W. S., GOLDBERG, M. A. (1995)  
Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor in cardiac myocytes.  
Circ Res 76(5): 758-66
- LEVY, A. P., LEVY, N. S., WEGNER, S., GOLDBERG, M. A. (1995)  
Transcriptional regulation of the rat Vascular Endothelial Growth Factor gene by hypoxia.  
J Biol Chem 270(22): 13333-40
- LEVY, A. P., LEVY, N. S., GOLDBERG, M. A. (1996)  
Post-transcriptional regulation of Vascular Endothelial Growth Factor by hypoxia.  
J Biol Chem 271(5): 2746-53
- LEVY, E., HASIN, Y., NAVON, G., HOROWITZ, M. (1997)  
Chronic heat improves mechanical and metabolic response of trained rat heart on ischemia and reperfusion.  
Am J Physiol 272(5 Pt 2): H2085-94
- LIU, Y., COX, S. R., MORITA, T., KOUREMBANAS, S. (1995)  
Hypoxia regulates Vascular Endothelial Growth Factor gene expression in endothelial cells. Identification of a 5' enhancer.  
Circ Res 77(3): 638-43
- LIU, Y. V., BAEK, J. H., ZHANG, H., DIEZ, R., COLE, R. N., SEMENZA, G. L. (2007)  
RACK1 competes with HSP90 for binding to HIF-1alpha and is required for O(2)-independent and HSP90 inhibitor-induced degradation of HIF-1alpha.  
Mol Cell 25(2): 207-17
- LIVAK, K. J., SCHMITTGEN, T. D. (2001)  
Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.  
Methods 25(4): 402-8
- LOPASCHUK, G. D., SPAFFORD, M. A., MARSH, D. R. (1991)  
Glycolysis is predominant source of myocardial ATP production immediately after birth.  
Am J Physiol 261(6 Pt 2): H1698-705
- MAHON, P. C., HIROTA, K., SEMENZA, G. L. (2001)  
FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1alpha and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity.  
Genes Dev 15(20): 2675-86

- MAINI, S., RASTOGI, S. K., KORDE, J. P., MADAN, A. K., SHUKLA, S. K. (2007)  
 Evaluation of Oxidative Stress and its Amelioration through Certain Antioxidants in Broilers during Summer.  
 J Poult Sci 44: 339-347
- MAKINO, Y., UENISHI, R., OKAMOTO, K., ISOE, T., HOSONO, O., TANAKA, H., KANOPKA, A., POELLINGER, L., HANEDA, M., MORIMOTO, C. (2007)  
 Transcriptional Up-regulation of Inhibitory PAS Domain Protein Gene Expression by Hypoxia-inducible Factor 1 (HIF-1): a negative feedback regulatory circuit in HIF-1-mediated signaling in hypoxic cells.  
 J Biol Chem 282(19): 14073-14082
- MALLET, F. (1999)  
 Comparison of Competitive PCR and Positive Control-Based PCR.  
 Quantitative PCR Protocols. B. Kochanowski and U. Reischl. Totowa, Humana Press. 26: 103-116
- MALOYAN, A., PALMON, A., HOROWITZ, M. (1999)  
 Heat acclimation increases the basal HSP72 level and alters its production dynamics during heat stress.  
 Am J Physiol 276(5 Pt 2): R1506-15
- MALOYAN, A., ELI-BERCHOER, L., SEMENZA, G. L., GERSTENBLITH, G., STERN, M. D., HOROWITZ, M. (2005)  
 HIF-1{alpha}-targeted pathways are activated by heat acclimation and contribute to acclimation-ischemic cross-tolerance in the heart.  
 Physiol Genomics 23(1): 79-88
- MANALO, D. J., ROWAN, A., LAVOIE, T., NATARAJAN, L., KELLY, B. D., YE, S. Q., GARCIA, J. G., SEMENZA, G. L. (2005)  
 Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1.  
 Blood 105(2): 659-69
- MANCINI, L., BERTOSSI, M., RIBATTI, D., BARTOLI, F., NICO, B., LOZUPONE, E., RONCALI, L. (1991)  
 The effects of long-term hypoxia on epicardium and myocardium in developing chick embryo hearts.  
 Int J Microcirc Clin Exp 10(4): 359-71
- MARCINEK, D. J., CIESIELSKI, W. A., CONLEY, K. E., SCHENKMAN, K. A. (2003)  
 Oxygen regulation and limitation to cellular respiration in mouse skeletal muscle in vivo.  
 Am J Physiol Heart Circ Physiol 285(5): H1900-8
- MARSHALL, W. J., BANGERT, S. K. (2008)  
 Clinical Biochemistry: Metabolic and Clinical. Aspects.  
 Marshall Bangert (Eds.), London, UK: Churchill Livingstone, Elsevier
- MARX, V. (2004)  
 RNA Quality: Defining the Good, the Bad, & the Ugly.(Agilent Technologies Inc.'s new software )(Editorial).  
 Genomics and Proteomics

- MASCIO, C. E., OLISON, A. K., RALPHE, J. C., TOMANEK, R. J., SCHOLZ, T. D., SEGAR, J. L. (2005)  
Myocardial vascular and metabolic adaptations in chronically anemic fetal sheep.  
*Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 289(6): R1736-1745?
- MATEO, J., GARCIA-LECEA, M., CADENAS, S., HERNANDEZ, C., MONCADA, S. (2003)  
Regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha by nitric oxide through mitochondria-dependent and -independent pathways.  
*Biochem J* 376(Pt 2): 537-44
- MCCUTCHEON, I. E., METCALFE, J., METZENBERG, A. B. ETTINGER, T. (1982)  
Organ growth in hyperoxic and hypoxic chick embryos.  
*Respir Physiol* 50(2): 153-63
- MCNABB, F. M. A., OLSON, J. M. (1996)  
Development of thermoregulation and its hormonal control in precocial and altricial birds.  
*Avian Poult Biol Rev* 7(2/3): 111-125
- MEHTA, A. R., MEHTA, P. R. (2008)  
The hypoxia of high altitude causes restricted fetal growth in chick embryos with the extent of this effect depending on maternal altitudinal status.  
*J Physiol* 586(6): 1469-71
- MICHIELS, C. (2004)  
Physiological and pathological responses to hypoxia.  
*Am J Pathol* 164(6): 1875-82
- MIQUEROL, L., LANGILLE, B. L., NAGY, A. (2000)  
Embryonic development is disrupted by modest increases in Vascular Endothelial Growth Factor gene expression.  
*Development* 127(18): 3941-6
- MOELLER, B. J., CAO, Y., LI, C. Y., DEWHIRST, M. W. (2004)  
Radiation activates HIF-1 to regulate vascular radiosensitivity in tumors: role of reoxygenation, free radicals, and stress granules.  
*Cancer cell* 5(5): 429-41
- MORAN, D. S., ELI-BERCHOER, L., HELED, Y., MENDEL, L., SCHOCINA, M., HOROWITZ, M. (2006)  
Heat intolerance: does gene transcription contribute?  
*J Appl Physiol* 100(4): 1370-1376
- MORIMOTO, R. I. (1998)  
Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators.  
*Genes Dev* 12(24): 3788-96
- MORIN, P., JR., STOREY, K. B. (2009)  
Mammalian hibernation: differential gene expression and novel application of epigenetic controls.  
*Int J Dev Biol* 53(2-3): 433-42

- MORRISON, T. B., WEIS, J. J., WITTEWER, C. T. (1998)  
Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification.  
*Biotechniques* 24(6): 954-8, 960, 962
- MORTOLA, J. P., GAUTIER, H. (1995)  
Interaction between metabolism and ventilation: effects of respiratory gases and temperature.  
Dempsey, J.A., Pack, A.I. (Eds.), *Regulation of Breathing*, New York, NY: 1011–1064
- MORTOLA, J. P. (2004)  
Implications of hypoxic hypometabolism during mammalian ontogenesis.  
*Respir Physiol Neurobiol* 141(3): 345-56
- MORTOLA, J. P., LABBE, K. (2005)  
Oxygen consumption of the chicken embryo: interaction between temperature and oxygenation.  
*Respir Physiol Neurobiol* 146(1): 97-106
- MORTOLA, J. P., COONEY, E. (2008)  
Cost of growth and maintenance in chicken embryos during normoxic or hypoxic conditions.  
*Respir Physiol Neurobiol* 162(3): 223-9
- MORTOLA, J. P. (2009)  
Gas exchange in avian embryos and hatchlings.  
*Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 153(4): 359-77
- MULDER, A. L., GOLDE, J. M., GOOR, A. A., GIUSSANI, D. A., BLANCO, C. E. (2000)  
Developmental changes in plasma catecholamine concentrations during normoxia and acute hypoxia in the chick embryo.  
*J Physiol* 527 Pt 3: 593-9
- MULDER, A. L., VAN GOLDE, J. C., PRINZEN, F. W., BLANCO, C. E. (1998)  
Cardiac output distribution in response to hypoxia in the chick embryo in the second half of the incubation time.  
*J Physiol* 508 ( Pt 1): 281-7
- MULDER, A. L. M., MIEDEMA, A., DE MEY, J. G. R., GIUSSANI, D. A., BLANCO, C. E. (2002)  
Sympathetic control of the cardiovascular response to acute hypoxemia in the chick embryo.  
*Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 282(4): R1156-1163
- MÜLLER, W. A., HASSEL, M. (2002)  
*Entwicklungsbiologie der Tiere und des Menschen.*  
Berlin;Heidelberg;New York, Springer Verlag
- NANKA, O., KRIZOVA, P., FIKRLE, M., TUMA, M., BLAHA, M., GRIM, M., SEDMERA, D. (2008)  
Abnormal myocardial and coronary vasculature development in experimental hypoxia.  
*Anat Rec (Hoboken)* 291(10): 1187-99

- NAU, P. N., VAN NATTA, T., RALPHE, J. C., TENEYCK, C. J., BEDELL, K. A., CALDARONE, C. A., SEGAR, J. L., SCHOLZ, T. D. (2002)  
Metabolic adaptation of the fetal and postnatal ovine heart: regulatory role of hypoxia-inducible factors and nuclear respiratory factor-1.  
*Pediatr Res* 52(2): 269-78
- NICHELMANN, M., HOCHER, J., TZSCHENTKE, B. (1999)  
Biological rhythms in birds--development, insights and perspectives.  
*Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 124(4): 429-37
- NICHELMANN, M., TZSCHENTKE, B. (2002)  
Ontogeny of thermoregulation in precocial birds.  
*Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 131(4): 751-63
- NICHELMANN, M., TZSCHENTKE, B., TÖNHARDT, H. (2002)  
Perinatal development of control systems in birds.  
*Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 131(4): 697-9
- OKUDA, A., TAZAWA, H. (1988)  
Gas exchange and development of chicken embryos with widely altered shell conductance from the beginning of incubation.  
*Respir Physiol* 74(2): 187-97
- OKUYAMA, H., KRISHNAMACHARY, B., ZHOU, Y. F., NAGASAWA, H., BOSCH-MARCE, M., SEMENZA, G. L. (2006)  
Expression of Vascular Endothelial Growth Factor receptor 1 in bone marrow-derived mesenchymal cells is dependent on hypoxia-inducible factor 1.  
*J Biol Chem* 281(22): 15554-63
- OLSZOWKA, A. J., TAZAWA, H., RAHN, H. (1988)  
A blood-gas nomogram of the chick fetus: blood flow distribution between the chorioallantois and fetus.  
*Respir Physiol* 71(3): 315-30
- ONO, H., HOU, P. C. L., TAZAWA, H. (1994)  
Responses of developing chicken embryos to acute changes in ambient temperature: Noninvasive study of heart rate.  
*Isr J Zool* 40: 467-480
- OSTADAL, B., OSTADALOVA, I., DHALLA, N. S. (1999)  
Development of Cardiac Sensitivity to Oxygen Deficiency: Comparative and Ontogenetic Aspects.  
*Physiol Rev* 79(3): 635-659
- PANNETIER, C., DELASSUS, S., DARCHE, S., SAUCIER, C., KOURILSKY, P. (1993)  
Quantitative titration of nucleic acids by enzymatic amplification reactions run to saturation.  
*Nucleic Acids Res* 21(3): 577-583
- PAPANDREOU, I., CAIRNS, R. A., FONTANA, L., LIM, A. L., DENKO, N. C. (2006)  
HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption.  
*Cell Metab* 3(3): 187-97

- PAPPANO, A. J., LOFFELHOLZ, K. (1974)  
Ontogenesis of adrenergic and cholinergic neuroeffector transmission in chick embryo heart.  
J Pharmacol Exp Ther 191(3): 468-78
- PARK, S. K., DADAK, A. M., HAASE, V. H., FONTANA, L., GIACCIA, A. J., JOHNSON, R. S. (2003)  
Hypoxia-induced gene expression occurs solely through the action of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha): role of cytoplasmic trapping of HIF-2alpha.  
Mol Cell Biol 23(14): 4959-71
- PFAFFL, M. W. (2001)  
A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.  
Nucleic Acids Res 29(9): e45
- PFAFFL, M. W. (2004)  
Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung.  
BIOspektrum (Heidelb.) 1: 92-95
- PIESTUN, Y., SHINDER, D., RUZAL, M., HALEVY, O., BRAKE, J., YAHAV, S. (2008)  
Thermal manipulations during broiler embryogenesis: effect on the acquisition of thermotolerance.  
Poult Sci 87(8): 1516-25
- PIESTUN, Y., HALEVY, O., YAHAV, S. (2009)  
Thermal manipulations of broiler embryos--The effect on thermoregulation and development during embryogenesis.  
Poult Sci 88(12): 2677-88
- PIIPER, J., TAZAWA, H., AR, A., RAHN, H. (1980)  
Analysis of chorioallantoic gas exchange in the chick embryo.  
Respir Physiol 39(3): 273-84
- PILKIS, S. J., GRANNER, D. K. (1992)  
Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis.  
Annu Rev Physiol 54: 885-909
- POELLINGER, L., JOHNSON, R. S. (2004)  
HIF-1 and hypoxic response: the plot thickens.  
Curr Opin Genet Dev 14(1): 81-5
- PUGH, C. W., RATCLIFFE, P. J. (2003)  
Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system.  
Nat Med 9(6): 677-84
- PUGH, E., SIDBURY, J. B., JR. (1971)  
Fatty acid oxidation in embryonic chick tissues.  
Biochim Biophys Acta 239(3): 376-83
- RADDATZ, E., SERVIN, M., KUCERA, P. (1992)  
Oxygen uptake during early cardiogenesis of the chick.  
Am J Physiol 262(4 Pt 2): H1224-30

- RADDATZ, E., GARDIER, S., SARRE, A. (2006)  
Physiopathology of the embryonic heart (with special emphasis on hypoxia and reoxygenation).  
Ann Cardiol Angeiol (Paris) Cardiologie fondamentale: protection cardiaque 55(2): 79-89
- RAMAKERS, C., RUIJTER, J. M., DEPREZ, R. H. L., MOORMAN, A. F. M. (2003)  
Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data.  
Neurosci Lett 339(1): 62-66
- RAWER, D. (2005)  
Real-Time PCR : Optimierung und Evaluation, Etablierung von Housekeeping-Genen und die Expressionsanalyse bei Fallotscher Tetralogie. Medizin,  
Dissertation, Giessen, Justus-Liebig-Universität
- REISCHL, U., KOCHANOWSKI, B. (1999)  
Quantitative PCR: A Survey of the Present Technology.  
Quantitative PCR Protocols. Kochanowski Reischl (Eds.), Totowa, Humana Press. 26: 3-30
- RIGGS, A. D., RUSSO, V. E. A., MARTIENSSEN, R. A. (1996)  
Epigenetic mechanisms of gene regulation.  
Martienssen Riggs (Eds.) New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press
- RIGGS, A. F. (1998)  
Self-association, cooperativity and supercooperativity of oxygen binding by hemoglobins.  
J Exp Biol 201(Pt 8): 1073-84
- ROLFE, D. F., BRAND, M. D. (1996)  
Contribution of mitochondrial proton leak to skeletal muscle respiration and to standard metabolic rate.  
Am J Physiol 271(4 Pt 1): C1380-9
- ROLFE, D. F., BROWN, G. C. (1997)  
Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals.  
Physiol Rev 77(3): 731-58
- ROMANO, R., ROCHAT, A. C., KUCERA, P., DE RIBAUPIERRE, Y., RADDATZ, E. (2001)  
Oxidative and glycogenolytic capacities within the developing chick heart.  
Pediatr Res 49(3): 363-72
- ROMANOFF, A. L. (1960)  
The Avian Embryo.  
New York, The MacMullan Company
- ROMANOFF, A. L. (1967)  
Biochemistry Of The Avian Embryo: A Quantitive Analysis of Prenatal Development.  
New York, Wiley-Interscience
- ROMANOFF, A. L. (1972)  
Pathogenesis of the avian embryo: An analysis of Causes of Malformations and Prenatal Death.  
New York, Wiley-Interscience

- RUIJTENBEEK, K., LE NOBLE, F. A., JANSSEN, G. M., KESSELS, C. G., FAZZI, G. E., BLANCO, C. E., DE MEY, J. G. (2000)  
Chronic hypoxia stimulates periarterial sympathetic nerve development in chicken embryo.  
*Circulation* 102(23): 2892-7
- RUIJTER, J. M., RAMAKERS, C. (2003)  
LinRegPCR analysis of real-time quantitative PCR data. Online Manual
- RYAN, H. E., LO, J., JOHNSON, R. S. (1998)  
HIF-1 alpha is required for solid tumor formation and embryonic vascularization.  
*Embo J* 17(11): 3005-15
- SAIKI, R., SCHARF, S., FALOONA, F., MULLIS, K., HORN, G., ERLICH, H., ARNHEIM, N. (1985)  
Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia.  
*Science* 230(4732): 1350-1354
- SALOMON, F. J. (1993)  
Lehrbuch der Geflügelanatomie.  
Jena, Fischer Verlag
- SCHEFE, J. H., LEHMANN, K. E., BUSCHMANN, I. R., UNGER, T., FUNKE-KAISER, H. (2006)  
Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel "gene expression's CT difference" formula.  
*J Mol Med* 84(11): 901-10
- SCHOFIELD, C. J., RATCLIFFE, P. J. (2004)  
Oxygen sensing by HIF hydroxylases.  
*Nat Rev Mol Cell Biol* 5(5): 343-54
- SCHUMACKER, P. T., CHANDEL, N., AGUSTI, A. G. (1993)  
Oxygen conformance of cellular respiration in hepatocytes.  
*Am J Physiol* 265(4 Pt 1): L395-402
- SEDMERA, D., PEXIEDER, T., VUILLEMIN, M., THOMPSON, R. P., ANDERSON, R. H. (2000)  
Developmental patterning of the myocardium.  
*Anat Rec* 258(4): 319-37
- SEMENZA, G. L., ROTH, P. H., FANG, H. M., WANG, G. L. (1994)  
Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1.  
*J Biol Chem* 269(38): 23757-63
- SEMENZA, G. L., JIANG, B. H., LEUNG, S. W., PASSANTINO, R., CONCORDET, J. P., MAIRE, P., GIALLONGO, A. (1996)  
Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1.  
*J Biol Chem* 271(51): 32529-37
- SEMENZA, G. L. (1999)  
Regulation of mammalian O<sub>2</sub> Homeostasis by hypoxia-inducible factor 1.  
*Annu Rev Cell Dev Biol* 15(1): 551-578

- SEMENZA, G. L. (2001)  
HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing.  
Curr Opin Cell Biol 13(2): 167-171
- SEMENZA, G. L. (2001)  
Hypoxia-inducible factor 1: control of oxygen homeostasis in health and disease.  
Pediatr Res 49(5): 614-7
- SEMENZA, G. L. (2004)  
Hydroxylation of HIF-1: oxygen sensing at the molecular level.  
J Appl Physiol 19: 176-82
- SEMENZA, G. L. (2007)  
Hypoxia-Inducible Factor 1 (HIF-1) Pathway.  
Sci STKE 2007(407): cm8
- SEMENZA, G. L. (2007)  
Life with Oxygen.  
Science 318(5847): 62-64
- SEMENZA, G. L. (2009)  
Regulation of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor 1.  
J Appl Physiol 24: 97-106
- SHARMA, S., TAEGTMEYER, H., ADROGUE, J., RAZEGHI, P., SEN, S., NGUMBELA, K.,  
ESSOP, M. F. (2004)  
Dynamic changes of gene expression in hypoxia-induced right ventricular  
hypertrophy.  
Am J Physiol Heart Circ Physiol 286(3): H1185-92
- SHARMA, S. K., LUCITTI, J. L., NORDMAN, C., TINNEY, J. P., TOBITA, K., KELLER, B. B.  
(2006)  
Impact of hypoxia on early chick embryo growth and cardiovascular function.  
Pediatr Res 59(1): 116-20
- SNYDER, G. K., BYERS, R. L., KAYAR, S. R. (1984)  
Effects of hypoxia on tissue capillarity in geese.  
Respir Physiol 58(2): 151-60
- SOWTER, H. M., RAVAL, R. R., MOORE, J. W., RATCLIFFE, P. J., HARRIS, A. L. (2003)  
Predominant role of hypoxia-inducible transcription factor (Hif)-1alpha versus Hif-  
2alpha in regulation of the transcriptional response to hypoxia.  
Cancer Res 63(19): 6130-4
- STARCK, J. M., RICKLEFS, R. E. (1998)  
Avian Growth and Development: Evolution within the Altricial-Precocial Spectrum.  
Oxford, Oxford University Press, USA
- STEVENS, L. (1996)  
Avian Biochemistry and Molecular Biology.  
Cambridge University Press
- STOCK, M. K., ASSON-BATRES, M. A., METCALFE, J. (1985)  
Stimulatory and persistent effect of acute hyperoxia on respiratory gas exchange of  
the chick embryo.  
Respir Physiol 62(2): 217-30

- STROKA, D. M., BURKHARDT, T., DESBAILLETS, I., WENGER, R. H., NEIL, D. A., BAUER, C., GASSMANN, M., CANDINAS, D. (2001)  
HIF-1 is expressed in normoxic tissue and displays an organ-specific regulation under systemic hypoxia.  
Faseb J 15(13): 2445-53
- STUHRBERG, V. U., TÖNHARDT, H., ETSCHMANN, B. (2003)  
Adaptation of the myocard to oxygen deficiency during incubation of the chicken embryo: determination of the mRNA content of pyruvate kinase and cytochrom-c-oxidase.  
Workshop on Fundamental Physiology and Perinatal Development in Poultry: Adaptation in Poultry - the Impact of Environment, Berlin
- STUHRBERG, V.-U. (2006)  
Metabolische Antworten von Vogelembryonen auf vermindertes Sauerstoffangebot während der Inkubation. Veterinär-Physiologie.  
Dissertation, Berlin, Freie Universität Berlin
- SUGISHITA, Y., TAKAHASHI, T., SHIMIZU, T., YAO, A., KINUGAWA, K., SUGISHITA, K., HARADA, K., MATSUI, H., NAGAI, R. (2000)  
Expression of genes encoding Vascular Endothelial Growth Factor and its Flk-1 receptor in the chick embryonic heart.  
J Mol Cell Cardiol 32(6): 1039-51
- SUGISHITA, Y., WATANABE, M., FISHER, S. A. (2004)  
Role of myocardial hypoxia in the remodeling of the embryonic avian cardiac outflow tract.  
Dev Biol 267(2): 294-308
- TAEGTMEYER, H. (2000)  
Genetics of energetics: transcriptional responses in cardiac metabolism.  
Ann Biomed Eng 28(8): 871-6
- TAKAHASHI, T., SUGISHITA, Y., NOJIRI, T., SHIMIZU, T., YAO, A., KINUGAWA, K., HARADA, K., NAGAI, R. (2001)  
Cloning of hypoxia-inducible factor 1alpha cDNA from chick embryonic ventricular myocytes.  
Biochem Biophys Res Commun 281(4): 1057-62
- TALKS, K. L., TURLEY, H., GATTER, K. C., MAXWELL, P. H., PUGH, C. W., RATCLIFFE, P. J., HARRIS, A. L. (2000)  
The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages.  
Am J Pathol 157(2): 411-21
- TAZAWA, H., MIKAMI, T., YOSHIMOTO, C. (1971)  
Respiratory properties of chicken embryonic blood during development.  
Respir Physiol 13(2): 160-70
- TAZAWA, H., HASHIMOTO, Y., NAKAZAWA, S., WHITTOW, G. C. (1992)  
Metabolic responses of chicken embryos and hatchlings to altered O<sub>2</sub> environments.  
Respir Physiol 88(1-2): 37-50

- TEETER, R. G., SMITH, M. O., OWENS, F. N., ARP, S. C., SANGIAH, S., BREAZILE, J. E. (1985)  
Chronic heat stress and respiratory alkalosis: Occurrence and treatment in broiler chicks.  
Poult Sci 64: 1060-1064
- THOMMES, R. C., HYLKA, V. W., TONETTA, S. A., GRIESBACH, D. A., ROPKA, S. L., WOODS, J. E. (1988)  
Ontogenesis of regulation of the thyroid gland in the developing chick embryo.  
Amer Zool 28: 417-426
- THOMMES, R. C., WOODS, J. (1993)  
Endocrine regulation of growth/development of warm-blooded vertebrate embryo/fetuses.  
The endocrinology of growth, development, and metabolism in vertebrate. Schreibmann Pang (Eds.), NY, Academic Press: 495-518
- THORBURN, G. D., HARDING, R. (1994)  
Textbook of Fetal Physiology.  
Oxford, University Press
- THRASH-BINGHAM, C. A., TARTOF, K. D. (1999)  
aHIF: a natural antisense transcript overexpressed in human renal cancer and during hypoxia.  
J Natl Cancer Inst 91(2): 143-51
- TICHOPAD, A., DILGER, M., SCHWARZ, G., PFAFFL, M. W. (2003)  
Standardized determination of real-time PCR efficiency from a single reaction set-up.  
Nucleic Acids Res 31(20): e122-
- TOMANEK, L., SOMERO, G. N. (2002)  
Interspecific- and acclimation-induced variation in levels of heat-shock proteins 70 (hsp70) and 90 (hsp90) and heat-shock transcription factor-1 (HSF1) in congeneric marine snails (genus Tegula): implications for regulation of hsp gene expression.  
J Exp Biol 205(5): 677-685
- TOMANEK, R. J., RATAJSKA, A., KITTEN, G. T., YUE, X., SANDRA, A. (1999)  
Vascular Endothelial Growth Factor expression coincides with coronary vasculogenesis and angiogenesis.  
Dev Dyn 215(1): 54-61
- TOMITA, M., SEMENZA, G. L., MICHIELS, C., MATSUDA, T., UCHIHARA, J. N., OKUDAIRA, T., TANAKA, Y., TAIRA, N., OHSHIRO, K., MORI, N. (2007)  
Activation of hypoxia-inducible factor 1 in human T-cell leukaemia virus type 1-infected cell lines and primary adult T-cell leukaemia cells.  
Biochem J 406(2): 317-23
- TÖNHARDT, H. (2004)  
Influence of incubation temperature on the Noradrenaline concentration in blood plasma and cAMP content in heart muscles cells of chicken embryo.  
Avian Poult Biol Rev

- TÖNHARDT, H. (2005)  
Angeboren und nicht vererbt : kurz vor dem Schlupf von Küken mit Temperaturerfahrung schützt die unterschiedliche sympathische Ansprechbarkeit das Herz bei Wärme und aktiviert es bei Kälte - eine epigenetische Anpassung.  
26. Kongress der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e.V.:  
Schwerpunktthema: "Tierschutz, Leistung und Gesundheit" Berlin
- TRAN, L., KUCERA, P., DE RIBAUPIERRE, Y., ROCHAT, A. C., RADDATZ, E. (1996)  
Glucose is arrhythmogenic in the anoxic-reoxygenated embryonic chick heart.  
*Pediatr Res* 39(5): 766-73
- TREININ, M., SHLIAR, J., JIANG, H., POWELL-COFFMAN, J. A., BROMBERG, Z., HOROWITZ, M. (2003)  
HIF-1 is required for heat acclimation in the nematode *Caenorhabditis elegans*.  
*Physiol Genomics* 14(1): 17-24
- TULLETT, S. G., BURTON, F. G. (1985)  
The effects of eggshell porosity on blood-gas and acid-base status of domestic fowl embryos within eggs of the same weight.  
*Comp Biochem Physiol A* 81(1): 137-42
- TULLETT, S. G., DEEMING, D. C. (1987)  
Failure to turn eggs during incubation: effects on embryo weight, development of the chorioallantois and absorption of albumen.  
*Br Poult Sci* 28(2): 239-49
- TZSCHENTKE, B. (2002)  
Stimulate body functions of embryos and get them used to the post-hatch environment.  
*World Poultry* 18(10): 22-25
- VANDESOMPELE, J., DE PRETER, K., PATTYN, F., POPPE, B., VAN ROY, N., DE PAEPE, A., SPELEMAN, F. (2002)  
Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes.  
*Genome Biol* 3(7): 1 - 11
- VILLAMOR, E., KESSELS, C. G., RUIJTENBEEK, K., VAN SUYLEN, R. J., BELIK, J., DE MEY, J. G., BLANCO, C. E. (2004)  
Chronic in ovo hypoxia decreases pulmonary arterial contractile reactivity and induces biventricular cardiac enlargement in the chicken embryo.  
*Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287(3): R642-51
- VON BLUMRODER, D., TÖNHARDT, H. (2002)  
Influence of long-term changes in incubation temperature on catecholamine levels in plasma of chicken embryos (*Gallus gallus f. domestica*).  
*Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 131(4): 701-711
- WALTENBERGER, J., MAYR, U., PENTZ, S., HOMBACH, V. (1996)  
Functional upregulation of the Vascular Endothelial Growth Factor receptor KDR by hypoxia.  
*Circulation* 94(7): 1647-54

- WANG, G. L., JIANG, B. H., RUE, E. A., SEMENZA, G. L. (1995)  
Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension.  
Proc Natl Acad Sci U S A 92(12): 5510-4
- WANG, G. L., SEMENZA, G. L. (1995)  
Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1.  
J Biol Chem 270(3): 1230-7
- WANGENSTEEN, O. D., RAHN, H. (1970)  
Respiratory gas exchange by the avian embryo.  
Respir Physiol 11(1): 31-45
- WARD, J. P. T. (2008)  
Oxygen sensors in context.  
Biochim Biophys Acta - Bioenergetics 1777(1): 1-14
- WATANABE, M., CHOUDHRY, A., BERLAN, M., SINGAL, A., SIWIK, E., MOHR, S., FISHER, S. A. (1998)  
Developmental remodeling and shortening of the cardiac outflow tract involves myocyte programmed cell death.  
Development 125(19): 3809-20
- WEBSTER, K. A. (1987)  
Regulation of glycolytic enzyme RNA transcriptional rates by oxygen availability in skeletal muscle cells.  
Mol Cell Biochem 77(1): 19-28
- WENGER, R. H., ROLFS, A., SPIELMANN, P., ZIMMERMANN, D. R., GASSMANN, M. (1998)  
Mouse hypoxia-inducible factor-1alpha is encoded by two different mRNA isoforms: expression from a tissue-specific and a housekeeping-type promoter.  
Blood 91(9): 3471-80
- WIENER, C. M., BOOTH, G., SEMENZA, G. L. (1996)  
In vivo expression of mRNAs encoding hypoxia-inducible factor 1.  
Biochem Biophys Res Commun 225(2): 485-8
- WIKENHEISER, J., DOUGHMAN, Y. Q., FISHER, S. A., WATANABE, M. (2006)  
Differential levels of tissue hypoxia in the developing chicken heart.  
Dev Dyn 235(1): 115-23
- WIKENHEISER, J., WOLFRAM, J. A., GARGESHA, M., YANG, K., KARUNAMUNI, G., WILSON, D. L., SEMENZA, G. L., AGANI, F., FISHER, S. A., WARD, N., WATANABE, M. (2009)  
Altered hypoxia-inducible factor-1 alpha expression levels correlate with coronary vessel anomalies.  
Dev Dyn 238(10): 2688-700
- WILHELM, J., PINGOUD, A. (2003)  
Real-Time Polymerase Chain Reaction.  
Chembiochem 4: 1120 ± 1128
- WITTMANN, J., PRECHTL, J. (1991)  
Respiratory function of catecholamines during the late period of avian development.  
Respir Physiol 83(3): 375-86

- WOOD, S. C. (1995)  
Oxygen as a modulator of body temperature.  
*Braz J Med Biol Res* 28(11-12): 1249-56
- WU, C. (1995)  
Heat shock transcription factors: structure and regulation.  
*Annu Rev Cell Dev Biol* 11: 441-69
- YAHAV, S. (2009)  
Alleviating heat stress in domestic fowl: different strategies.  
*Worlds Poult Sci J* 65(4): 719-732
- YU, A. Y., FRID, M. G., SHIMODA, L. A., WIENER, C. M., STENMARK, K., SEMENZA, G. L. (1998)  
Temporal, spatial, and oxygen-regulated expression of hypoxia-inducible factor-1 in the lung.  
*Am J Physiol* 275(4 Pt 1): L818-26
- ZHANG, H., GAO, P., FUKUDA, R., KUMAR, G., KRISHNAMACHARY, B., ZELLER, K. I., DANG, C. V., SEMENZA, G. L. (2007)  
HIF-1 inhibits mitochondrial biogenesis and cellular respiration in VHL-deficient renal cell carcinoma by repression of C-MYC activity.  
*Cancer cell* 11(5): 407-20
- ZHANG, H., BOSCH-MARCE, M., SHIMODA, L. A., TAN, Y. S., BAEK, J. H., WESLEY, J. B., GONZALEZ, F. J., SEMENZA, G. L. (2008)  
Mitochondrial autophagy is an HIF-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia.  
*J Biol Chem* 283(16): 10892-903
- ZHANG, X., DING, L., SANDFORD, A. J. (2005)  
Selection of reference genes for gene expression studies in human neutrophils by real-time PCR.  
*BMC Mol Biol* 6(1): 4
- ZHONG, H., SIMONS, J. W. (1999)  
Direct comparison of GAPDH, beta-actin, cyclophilin, and 28S rRNA as internal standards for quantifying RNA levels under hypoxia.  
*Biochem Biophys Res Commun* 259(3): 523-6

## 9. Anhang

### 9.1. Inkubation der Hühnerembryonen

Spezifisch pathogenfreie **Hühnereier** der Rasse „White Leghorn“: Fa. Lohmann Tierzucht GmbH, Am Seedeich 9-11, Postfach 460, D-27454 Cuxhaven, [www.ltz.de](http://www.ltz.de) Tel.: 04721-505299, Fax.: 04721-38852

**Brutschrank** mit Ventilationssystem und automatischer Wendevorrichtung, sowie computergesteuertem Temperatur- und Feuchteregelsystem SKR 168 und Hemel Thermalplastik-Flächenbrüter: Fa. J. Hemel Brutgeräte, Tel. 05246-4686

**Druck-Mess-Regelgerät**: Flow Bus Bronkhorst HiTec, Fa. MÄTTIG Mess- und Regeltechnik GmbH

**Stickstoff und O<sub>2</sub>** in 50l Flaschen zur Herstellung eines reduzierten O<sub>2</sub>-Gehaltes: Fa. AIR Liquide GmbH, Kunden-Service-Center Berlin, Ludwig-Boltzmann-Straße 3, 12489 Berlin, Tel.: 030-67009-3

**PO<sub>2</sub>-Messgerät** M80, Fa. VEB Metra Mess- und Frequenztechnik Radebeul; zur Eichung des PO<sub>2</sub>-Messgerätes wurde eine O<sub>2</sub>-freie 3%ige Natriumdithionitlösung angesetzt.

### 9.2. Messung morphologischer Parameter

**Digitale Feinwaage**: Satorius Basics, Type BA 210

### 9.3. Gewinnung und Aufarbeitung der Proben

#### 9.3.1. Gewinnung der Herzen

Alkohol (70%); RNA Stabilisationsmedium: RNA-Later aus dem „RNeasy Mini Protect Kit“, Fa. Qiagen

**RNase-Zap**: Fa. Ambion, Art.No. AM9780

#### 9.3.2. Aufarbeitung der stabilisierten Gewebeproben

**RNA-Präparationskit**: Nucleospin RNAII 250preps, Fa. Macherey-Nagel, Cat. No. 704955.250 (Puffer RA1, RA2, RA3, MDB, DNase Reaktionspuffer, DNase I, RNase-freies Wasser, Nucleospin Filter, NucleoSPin RNA II Säulen, Nucleospin Sammelgefäße)

Ethanol, Roth, Art.No. 5054.3

β-Mercaptoethanol: 2-Mercaptoethanol (ME), Fa. Roth, Art.No. 4227.1

1,5 ml-Röhrchen: Multi-Reaktionsgefäße, Fa. Roth, Art.No. 7080.1

**Protokoll der RNA-Präparation (NukleoSpin RNA II) des Herstellers** : <http://www.mn-net.com/Products/NucleicAcidPurification/RNA/NucleoSpinRNAII/tabid/1324/language/en-US/Default.aspx> (Stand: 31.03.2010)

## 9.4. Photometrische Bestimmung des RNA-Gehaltes

**Photometer:** Biophotometer, Fa. Eppendorf

Uvetten, 220-1600 nm, Fa. Eppendorf, Order no. 0030106.300

## 9.5. cDNA-Synthese

### 9.5.1. Verwendete Arbeitsmaterialien

**cDNA-Synthese-Kit:** „iScript-cDNA-Synthese-Kit“, Fa. Bio-Rad: “5x iScript Reaction Mix”, “iScript reverse Transkriptase”, Nuclease freies Wasser

**Thermocycler:** Techne Cyclone 25, Fa. PeQLab Biotechnologie GmbH

Mini-Tube: PCR Softtubes, 0,2 ml, Art.No. 711000, Art.No. 711080, Fa. Biozym

**Vortex:** REAX top, Fa. Heidolph

**Zentrifugen:** centrifuge 5415D, Fa. Eppendorf; e5804R, Fa. Eppendorf

### 9.5.2. Zusammensetzung des cDNA-Reaktionsansatzes

Substanz	Menge (µl)
5x iScript Reaction Mix	4
iScript reverse Transkriptase	1
Nuclease freies Wasser	14
RNA Probe (100ng/µl)	1

**Tab. 5: Reaktionsansatz für die cDNA-Synthese**

### 9.5.3. Reaktionsprotokoll der cDNA-Synthese

Zyklus	Zeit (Minuten)	Temperatur (°C)
1	5	25
2	30	42
3	5	85
4	∞	4

**Tab. 6: Reaktionsprotokoll für die cDNA-Synthese**

## 9.6. Recherche und Herstellung synthetischer Oligonukleotide (Primer)

### 9.6.1. Verwendete Internetseiten

NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (Stand: 31.03.2010)

Ensembl: <http://www.ensembl.org/> (Stand: 31.03.2010)

Oligoanalyzer 3.1: <http://eu.idtdna.com/ANALYZER/Applications/OligoAnalyzer/Default.aspx> (Stand: 31.03.2010)

Primer3: [http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3\\_www.cgi](http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi) (Stand: 31.03.2010)

### 9.6.2. Primerhersteller

Fa. MWG Biotech; Ebersberg: <http://www.eurofindna.com/de/home.html> (Stand: 31.03.2010)

### 9.6.3. DNA-Gelelektrophorese

**Agarose:** Seakem LE-Agarose, Fa. Biozym

**TAE-Puffer:** 40mM Tris-HCl (Fa. Roth), 2mM EDTA (Fa. Roth) in Wasser

**DNA-Ladder:** Fa. Roth

**Ethidiumbromid:** Fa. Roth, Art.No. 2218.1

Zur Herstellung eines 2%-igen Agarosegels werden 0,6 g (bzw. 1,6 g für ein großes Gel) LE-Agarose und 30 ml (bzw. 80 ml für ein großes Gel) TAE-Puffer in der Mikrowelle erhitzt. Nach dem Abkühlen wird unter Rühren 1,5-2 µl Ethidiumbromid zum Gel dazugegeben.

**Elektrophoresekammer:** Model No. HU6, Serial No. 3277, Model No. HU10, Serial No. 3516, Fa. Roth; Power Supply: BIO-RAD, POWER PAC 200, Power PAC Basic

UV-Illuminator: Alpha Innotech, ChemilmagerTM 5500

## 9.7. kPCR

### 9.7.1. Zusammensetzung des Reaktionsansatzes der kPCR

Substanz	Menge (µl)
Master Mix 1.1 (Fa. ABgene)	45
Primer sense (20 pmol/µl)	1
Primer antisense (20 pmol/µl)	1
Template	3

Tab. 7: Reaktionsansatz für die kPCR

### 9.7.2. Reaktionsprotokoll der kPCR

Zyklus	Zyklusphase	Wiederholungen	Zeit (Minuten)	Temperatur (°C)
1	Initiale Denaturierung	1	2	94
2	Denaturierung	40	2	94
	Annealing	40	0,5-2	55
	Elongation	40	1	72
3	Finale Elongation	1	5	72
4	Kühlen	1		4

Tab. 8: Reaktionsprotokoll für die kPCR

### 9.7.3. Verwendete Arbeitsmaterialien

**Thermocycler:** Techne Cyclone 25, Fa. PeqLab Biotechnologie GmbH

Mini-Tube: PCR Softtubes, 0,2 ml, Art.No. 711000, Art.No. 711080, Fa. Biozym

## 9.8. qPCR

### 9.8.1. Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für eine qPCR

Substanz	25 µl-Ansatz (µl)	15 µl-Ansatz (µl)
Primer sense	0,5	0,3
Primer antisense	0,5	0,3
Aqua purificata	7,5	2,5
Biorad SybrGreen Master Mix	13	7,8
Template cDNA	5	5

**Tab. 9: Reaktionsansatz für die qPCR. Der 25 µl-Ansatz konnte aufgrund der guten Erfahrung und aus Kostengründen auf einen 15 µl-Ansatz reduziert werden.**

### 9.8.2. Reaktionsprotokoll der qPCR

Zyklus		Zeit (Minuten)	Temperatur (°C)
1		0:30	95
2		3:00	95
3 (35x)	3.1	0:30	95
	3.2	2:00	58
4		0:30	95
5		∞	4

**Tab. 10: Reaktionsprotokoll für die qPCR**

### 9.8.3. Verwendete Arbeitsmaterialien

**qPCR KIT:** „iQ SYBR Green Supermix“, Fa: Biorad, Cat.No. 170-8884

Aqua purificata, Fa. Roth, Art.No. T143.3

qPCR-Platten, 96-well, FrameStar, Fa. 4titude, code 4ti-0710

**Thermocycler:** iCycler iQ®, Fa. Biorad, Cat.No. 170-8740

## 9.8.4. Sequenzen verwendeter Primer

GOI	Accession number	Produktlänge (bp)	5' (sense) Primer	3' (antisense) Primer
18s	5': X03205 3': AF_173612	213	5'-CGAATGTCTG CCCTATCAAC-3'	5'-CAATTACAGG GCCTCGAAAG-3'
28s	5': M11167 3': NR_003287	201	5'-GTGGAGCAGA AGGGCAAA-3'	5'-TAGGAAGAGC CGACATCGAA-3'
PBGD= HMBS	XM_417846	230	5'-GACTGACAGC GTGGTTGAGA-3'	5'-CAATGGTAAA GCCAGGAGGA-3'
ENO1	NM_205120	225	5'-GGCTGGCTAC TCTGACAAGG-3'	5'-GTGAACTTCT TCCAGGCAGC-3'
GPx-3	XR_027034	178	5'-CCAACCTCCA GCTCTTCCAG-3'	5'-CCCACCAGGA ACTTCTCAA-3'
HIF1a	NM_204297	173	5'-AAAGAATTAC AGAGTTGATGG-3'	5'-GTAGCCACC TTGTTTAGC-3'
HO1	NM_205344	137	5'-GGTCCC GAAT GAATGCCCTTG-3'	5'-ACCGTTCTCC TGGCTCTTGG-3'
HSP90	NM_206959	110	5'-CACTGAGTTG GCAGAGGACA-3'	5'-CTGAAAGACG CTTTCGGTTC-3'
VEGFA	NM_205042	116	5'-ACAAACCACC CAGCTTTCAC-3'	5'-TCGACTTGCA ACGTGAGTCT-3'

Tab. 11: qPCR-Primer. Selbstdesignte Primer in Fettschrift. 18s und 28s sense Primer und VEGFA Primer von Stuhrberg (2006) übernommen, HIF1a und HO1 Primer von Druyan *et al.* (2007) übernommen; GOI = Gene of Interest, bp = Basenpaar; 18s = 18s ribosomal RNA; 28s = 28s ribosomal RNA; PBGD = Porphobilinogen deaminase; HMBS = Hydroxymethylbilane Synthase; ENO1 = Enolase; HIF1 $\alpha$  = Hypoxia Inducible Factor 1; GPx-3 = alpha 1 Glutathionperoxidase-3; HO1 = Hämoxygenase 1; HSP90 = Hitzeschockprotein 90; VEGFA = Vascular Endothelial Growth Factor A

## 9.8.5. FC-Werte

GOI	Tag/Gruppe	Min.	Max.	Median	Mittelwert	SD
HIF1a	D10-24h G1	-0,41	0,94	-0,11	0,06	0,52
HIF1a	D10-24h G2	-0,75	2,23	0,16	0,34	1,13
HIF1a	D10-24h G3	-0,17	1,21	0,22	0,44	0,54
HIF1a	D10 G1	-0,45	0,04	-0,13	-0,16	0,20
HIF1a	D10 G2	0,22	0,97	0,38	0,50	0,30
HIF1a	D10 G3	-0,27	2,21	0,48	0,77	0,97
HIF1a	D12 G1	-0,23	0,29	-0,02	0,03	0,20
HIF1a	D12 G2	0,02	1,79	0,28	0,54	0,73
HIF1a	D12 G3	0,13	0,88	0,44	0,51	0,28
HIF1a	D16 G1	-0,18	0,55	-0,02	0,09	0,29
HIF1a	D16 G2	-0,06	0,99	0,54	0,52	0,49
HIF1a	D16 G3	-0,02	0,99	0,75	0,58	0,46

<b>GOI</b>	<b>Tag/Gruppe</b>	<b>Min.</b>	<b>Max.</b>	<b>Median</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>SD</b>
HIF1a	D18 G1	-0,59	0,23	-0,16	-0,18	0,30
HIF1a	D18 G2	-0,03	1,04	0,17	0,38	0,46
HIF1a	D18 G3	-0,55	0,06	-0,12	-0,16	0,23
HIF1a	D20 G1	-0,77	2,43	0,75	0,71	1,28
HIF1a	D20 G2	-0,59	2,78	1,36	1,19	1,49
HIF1a	D20 G3	-0,60	0,52	-0,52	-0,20	0,51
VEGFA	D10-24h G1	0,02	1,10	0,14	0,36	0,44
VEGFA	D10-24h G2	-0,05	0,67	0,23	0,29	0,26
VEGFA	D10-24h G3	0,11	1,80	0,41	0,82	0,84
VEGFA	D10 G1	-0,33	0,55	0,00	0,05	0,32
VEGFA	D10 G2	0,48	1,42	0,78	0,82	0,38
VEGFA	D10 G3	0,21	1,71	0,54	0,82	0,60
VEGFA	D12 G1	-0,87	0,90	0,26	0,14	0,64
VEGFA	D12 G2	-0,76	0,57	0,38	0,20	0,55
VEGFA	D12 G3	-0,62	1,00	0,59	0,45	0,66
VEGFA	D16 G1	-0,26	0,69	-0,13	0,09	0,41
VEGFA	D16 G2	-0,11	3,39	0,65	1,15	1,41
VEGFA	D16 G3	0,15	1,36	0,71	0,63	0,48
VEGFA	D18 G1	-0,53	0,28	-0,26	-0,17	0,32
VEGFA	D18 G2	0,33	1,42	0,69	0,80	0,40
VEGFA	D18 G3	-0,43	-0,05	-0,06	-0,16	0,17
VEGFA	D20 G1	-0,34	2,46	-0,12	0,41	1,18
VEGFA	D20 G2	0,00	2,05	1,09	0,88	0,87
VEGFA	D20 G3	-0,69	3,12	0,54	1,01	1,52
ENO1	D10-24h G1	-0,34	0,17	-0,09	-0,10	0,18
ENO1	D10-24h G2	-0,19	0,96	0,55	0,36	0,49
ENO1	D10-24h G3	-0,47	0,22	0,09	0,01	0,28
ENO1	D10 G1	-0,24	0,50	-0,06	0,04	0,29
ENO1	D10 G2	0,19	1,57	0,73	0,72	0,54
ENO1	D10 G3	0,11	1,38	0,24	0,50	0,51
ENO1	D12 G1	-0,14	0,67	0,26	0,21	0,33
ENO1	D12 G2	0,44	1,42	0,76	0,88	0,46
ENO1	D12 G3	-0,06	0,74	0,35	0,34	0,29
ENO1	D16 G1	-0,36	0,67	-0,01	0,07	0,39
ENO1	D16 G2	-0,28	1,14	0,56	0,54	0,52

## Anhang

<b>GOI</b>	<b>Tag/Gruppe</b>	<b>Min.</b>	<b>Max.</b>	<b>Median</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>SD</b>
ENO1	D16 G3	-0,06	1,44	0,54	0,67	0,58
ENO1	D18 G1	-0,47	0,06	-0,25	-0,20	0,21
ENO1	D18 G2	0,10	0,57	0,25	0,27	0,17
ENO1	D18 G3	-0,12	0,64	0,16	0,21	0,27
ENO1	D20 G1	-0,46	0,41	-0,20	-0,16	0,35
ENO1	D20 G2	-0,08	1,36	0,76	0,64	0,57
ENO1	D20 G3	-0,28	0,54	0,18	0,18	0,36
HO1	D10-24h G1	-0,28	0,62	0,10	0,15	0,40
HO1	D10-24h G2	0,01	1,67	0,54	0,59	0,64
HO1	D10-24h G3	-0,32	0,92	0,30	0,31	0,54
HO1	D10 G1	-0,34	0,31	0,03	-0,03	0,25
HO1	D10 G2	0,56	1,36	1,06	0,96	0,32
HO1	D10 G3	-0,36	1,18	0,18	0,34	0,60
HO1	D12 G1	0,14	1,23	0,88	0,75	0,41
HO1	D12 G2	0,75	3,58	1,61	1,86	1,05
HO1	D12 G3	-0,40	0,66	0,12	0,16	0,39
HO1	D16 G1	0,09	2,82	0,71	0,98	1,07
HO1	D16 G2	-0,04	2,04	0,94	0,91	0,80
HO1	D16 G3	0,36	4,52	0,66	1,36	1,77
HO1	D18 G1	0,09	1,20	0,41	0,62	0,53
HO1	D18 G2	0,45	1,09	0,78	0,82	0,27
HO1	D18 G3	0,20	1,01	0,47	0,52	0,30
HO1	D20 G1	-0,60	0,05	-0,03	-0,18	0,29
HO1	D20 G2	-0,60	3,01	0,79	0,92	1,32
HO1	D20 G3	-0,51	0,93	0,12	0,25	0,65
GPx-3	D10-24h G1	-0,29	1,31	0,07	0,21	0,65
GPx-3	D10-24h G2	-0,54	3,42	0,55	0,99	1,47
GPx-3	D10-24h G3	-0,37	0,80	0,07	0,13	0,43
GPx-3	D10 G1	-0,19	0,27	-0,04	0,02	0,18
GPx-3	D10 G2	0,04	1,55	0,49	0,62	0,56
GPx-3	D10 G3	-0,02	1,06	0,20	0,34	0,43
GPx-3	D12 G1	0,34	1,29	0,76	0,82	0,45
GPx-3	D12 G2	0,66	1,68	0,93	1,12	0,48
GPx-3	D12 G3	0,49	2,86	1,16	1,42	0,89
GPx-3	D16 G1	-0,12	0,65	0,25	0,28	0,34

GOI	Tag/Gruppe	Min.	Max.	Median	Mittelwert	SD
GPx-3	D16 G2	0,19	1,06	0,69	0,64	0,38
GPx-3	D16 G3	0,14	0,68	0,41	0,44	0,24
GPx-3	D18 G1	-0,33	0,48	-0,10	0,00	0,32
GPx-3	D18 G2	-0,06	0,80	0,00	0,27	0,42
GPx-3	D18 G3	-0,23	0,48	0,05	0,07	0,30
GPx-3	D20 G1	-0,53	-0,12	-0,30	-0,31	0,15
GPx-3	D20 G2	0,06	0,77	0,37	0,39	0,30
GPx-3	D20 G3	0,16	1,42	0,50	0,60	0,50
HSP90	D10-24h G1	-0,47	0,81	-0,24	-0,04	0,51
HSP90	D10-24h G2	-0,60	0,24	-0,26	-0,24	0,32
HSP90	D10-24h G3	-0,37	0,28	-0,07	-0,11	0,26
HSP90	D10 G1	-0,40	0,25	-0,18	-0,17	0,26
HSP90	D10 G2	-0,70	0,14	-0,50	-0,44	0,34
HSP90	D10 G3	-0,67	0,61	-0,21	-0,19	0,52
HSP90	D12 G1	-0,69	-0,21	-0,38	-0,46	0,21
HSP90	D12 G2	-0,72	0,20	-0,33	-0,32	0,34
HSP90	D12 G3	-0,72	-0,06	-0,14	-0,33	0,31
HSP90	D16 G1	0,36	1,06	0,67	0,71	0,30
HSP90	D16 G2	0,51	1,56	1,17	1,04	0,44
HSP90	D16 G3	0,53	2,92	1,33	1,47	0,88
HSP90	D18 G1	-0,39	0,12	-0,27	-0,19	0,20
HSP90	D18 G2	0,11	1,00	0,48	0,51	0,34
HSP90	D18 G3	-0,30	0,54	0,17	0,20	0,33
HSP90	D20 G1	-0,54	1,01	0,06	0,10	0,65
HSP90	D20 G2	-0,57	1,08	0,19	0,29	0,75
HSP90	D20 G3	-0,48	1,55	-0,12	0,15	0,83

**Tab. 12: FC-Werte der Gene sortiert nach Genen, Tagen und Gruppen. Der Median wurde zur Beurteilung der Ergebnisse herangezogen. Das arithmetische Mittel wurde zur Vollständigkeit bestimmt und mit der Standardabweichung (SD) angegeben.**

## 10. Wissenschaftliche Publikationen

### Vorträge:

Dittmann, I., Nechaeva, M., Tönhardt, H. (2007)  
Analysis of the messenger RNA Levels of Inducible Nitric Oxide Synthase, Tyrosine Hydroxylase, Dopamine D1a and D2 Receptor in Various Embryonic Tissues of Chicken Under Chronic Hypoxia.  
3<sup>rd</sup> Combined Workshop on Fundamental Physiology and Perinatal Development in Poultry  
Germany, Berlin

Dittmann, I., Tönhardt, H. (2008)  
Adaptation of Gene Expression in Chicken Embryos at Different Developmental Stages under Chronic Hypoxia.  
23<sup>rd</sup> World's Poultry Congress  
Australia, Brisbane

### Poster:

Dittmann, I., Tönhardt, H. (2008)  
Adaptation der Genexpression unter chronischer Hypoxie und/oder erhöhter Temperatur im Myokard von Hühnerembryonen.  
18. Tagung der DVG-Fachgruppe Physiologie und Biochemie., Universität Leipzig, Leipziger Blaue Hefte LBH  
Germany, Leipzig

## 11. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt:

**Frau Prof. Dr. Heike Tönhardt** für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes sowie für ihren Optimismus und ihre unermüdliche Bereitschaft zur Diskussion.

**Frau Dr. Gisela Arndt** und **Frau Anja Lüdeke** für die jederzeit gewährte freundliche und großartige Hilfe bei statistischen Fragen.

**Frau Dr. Ulrike Lodemann** für das unglaubliche schnelle und hilfreiche Korrekturlesen sowie der kompetenten Unterstützung bei methodischen Fragen.

**Frau Katharina Wolf** für die vergleichslose aufopfernde Hilfe bei methodischen Fragen und bei der Auswertung.

**Frau Friederike Rolle** und **Herrn Zoran Nikolic** für die sehr angenehme Zusammenarbeit und die konstruktiven Diskussionen im Labor.

Der **IT-Abteilung** unter **Herrn Dr. Manfred Sommerer** und **Herrn Daniel Lübke**, sowie **Herrn Bernd Anders** und **Herrn John Wiesel** für die schnelle und freundliche Hilfe bei allGemeinen Computerproblemen.

**Frau Elke Nadolny** für die freundliche Unterstützung im Labor.

**Frau Julia Strahlendorf**, **Herrn Dr. Peter Wenning**, **Herrn Driton Caushi**, **Frau Maria Georgi**, **Frau Ines Schwarz** und **Frau Maaly Nassar** für Eure Freundschaft und Hilfe in guten und in schlechten Zeiten.

**Katharina Liebsch**, **Philipp Gronau**, **Andreas Tell** und **Julia Gebrande** für die für mich geschaffenen Arbeitsrefugien.

Den weltbesten Eltern **PD Dr. Martin Dittmann** und **Verena Dittmann** und meiner weltbesten Schwester **Elena Dittmann** für die außerordentliche fachkundige Hilfe und das fleißige Korrekturlesen und fürs Dasein.

Allen anderen die mich während dieser Lebensphase begleitet und unterstützt haben.

## **12. Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und nur mit den aufgeführten Hilfsmitteln erstellt habe.

Berlin, den 31.03.2010

Isabel Dittmann