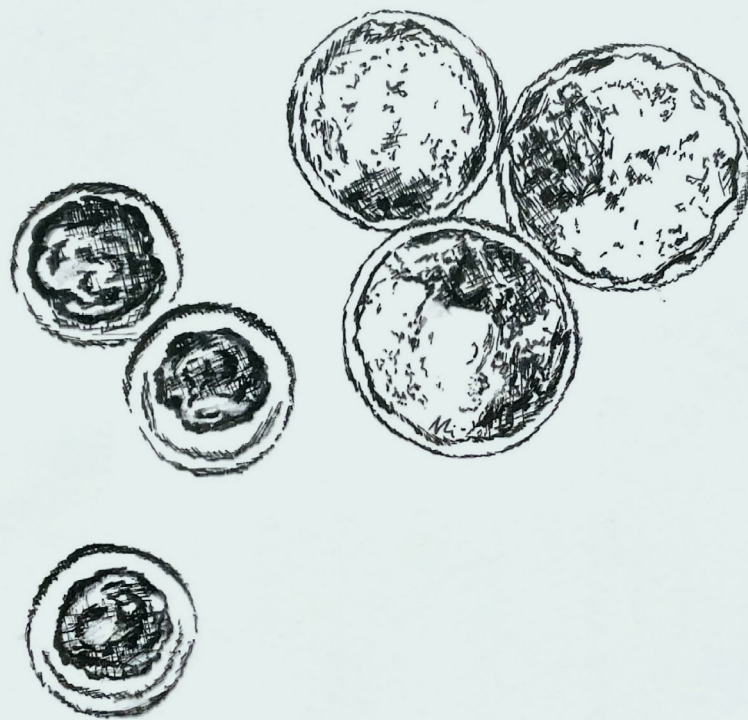


**Einflüsse einer pansengeschützten Methionin-
und Lysin-Supplementation der Futterration auf die
Entwicklungskompetenz
boviner Kumulus-Oozyten-Komplexe**



INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
im Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Markus Ritz

Bibliografische Informationen der Deutschen Bibliothek

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

© 2025 by Verlag:
Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH, Gießen
Printed in Germany

ISBN 978-3-86345-755-6

1. Auflage 2025

Verlag:

DVG Service GmbH
An der Alten Post 2
35390 Gießen
Tel.: 0641 984446-0
info@dvg.de
www.dvg.de

Aus der Tierklinik für Reproduktionsmedizin und Neugeborenenkunde, Professur für
Molekulare Reproduktionsmedizin, Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuerin: Prof. Dr. Christine Wrenzycki

Einflüsse einer pansengeschützten Methionin- und Lysin-
Supplementation der Futtermischung auf die Entwicklungskompetenz
boviner Kumulus-Oozyten-Komplexe

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
im Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

Markus Ritz

Tierarzt aus Bietigheim-Bissingen

Gießen 2025

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. Stefan Arnhold

Erste Gutachterin: Prof. Dr. Christine Wrenzycki

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Ewald Usleber

Prüferin: PD Dr. Kerstin von Pückler

Tag der Disputation: 12. März 2025

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
2	LITERATUR	2
2.1	Aminosäurebedarf von Milchkühen	2
2.1.1	Mikrobielles Protein des Pansens	3
2.1.2	Überversorgung an Rohprotein (XP).....	3
2.1.3	Supplementierung von Aminosäuren bei Milchkühen	5
2.2	Pansengeschützte Nährstoffe und Aminosäuren	5
2.2.1	Ummantelte Aminosäuren (coated AA)	6
2.2.2	Pansenschutz durch chemische Modifizierung.....	7
2.2.2.1	<i>Hydroxymethylthiobuttersäure (HMB)</i>	7
2.2.2.2	<i>Isopropylester von Hydroxymethylbuttersäure (HMBi)</i>	7
2.3	Limitierende Aminosäuren der Milchkuh: Methionin und Lysin	8
2.3.1	Methionin	9
2.3.1.1	<i>Einfluss von Methionin auf den Lipidstoffwechsel</i>	9
2.3.1.2	<i>Pansengeschütztes Methionin (RPMet)</i>	11
2.3.2	Lysin	12
2.3.2.1	<i>Epigenetische Regulationsmechanismen von Lysin</i>	12
2.3.2.2	<i>Pansengeschütztes Lysin (RPLys)</i>	13
2.3.3	Pansengeschütztes Methionin und Lysin.....	15
2.4	In-vitro-Produktion (IVP) boviner Embryonen.....	16
2.4.1	Ovum Pick-Up (OPU).....	17
2.4.1.1	<i>Mögliche Auswirkungen des OPU auf Spendertiere</i>	19
2.5	Einflüsse von Aminosäuren auf die Oozyten- und Embryonenqualität	20
2.5.1	Einflüsse von pansengeschütztem Methionin (RPMet) auf die Embryonalentwicklung in vivo.....	20
2.5.2	Einflüsse von Methionin auf die Embryonalentwicklung in vitro	22
2.6	Massenspektrometrische Untersuchungen chemischer Verbindungen aus Oozyten und Embryonen	23
2.6.1	Lipidanalysen von Oozyten und Embryonen	23
2.6.2	Metabolomanalysen von Oozyten und Embryonen	24

2.6.3	Massenspektrometrie in Lipidomik und Metabolomik.....	25
2.6.3.1	<i>Ionenquelle: Elektrospray-Ionisation (ESI)</i>	25
2.6.3.2	<i>Massenanalysator: Triple Quadrupol (QqQ)</i>	26
2.6.3.3	<i>Massendetektor: Multiple reaction monitoring (MRM)</i>	27
2.6.3.4	<i>Datenanalyse Massenspektrometrie</i>	29
2.6.3.5	<i>Multiple testing problem in der Massenspektrometrie</i>	29
2.7	Gentranskripte präimplantatorischer Rinderembryonen.....	30
2.7.1	Methionin Adenosyltransferasen 2A, 2B	30
2.7.2	DNA-Methyltransferasen 1a, 3a	31
2.7.3	Interferon tau (IFNT).....	32
2.7.4	Heat shock protein 1 (HSPA1A)	33
3	MATERIAL UND METHODEN.....	34
3.1	Tiere.....	34
3.2	Rationen	34
3.3	Gewinnung und Analyse der Milchleistungsdaten	35
3.4	Technische Ausrüstung für die ultraschallgeleitete transvaginale Follikelpunktion.....	36
3.5	Gewinnung der KOK mittels OPU	38
3.6	In-vitro-Produktion (IVP)	40
3.6.1	In-vitro-Maturation (IVM).....	40
3.6.2	In-vitro-Fertilisation (IVF).....	41
3.6.3	In-vitro-Kultivierung (IVC).....	42
3.7	IVP boviner Embryonen aus Ovarien geschlachteter Kühe	43
3.7.1	Herkunft der Ovarien.....	43
3.7.2	Gewinnung der Kumulus-Oozyten-Komplexe (KOK).....	43
3.8	Blutuntersuchungen	44
3.8.1	Gewinnung, Aufbereitung und Archivierung der Serum- und Plasmaproben	44
3.8.2	Bestimmung der Aminosäurekonzentration im Plasma	44
3.8.2.1	<i>Aufbereitung</i>	45
3.8.2.2	<i>Aminosäurenanalysator (AAA)</i>	45
3.8.2.3	<i>Statistische Auswertung</i>	46
3.9	Massenspektrometrie.....	46
3.9.1	Aufbereitung für die Massenspektrometrie	46

3.9.2	Multiple Reaction Monitoring (MRM)	47
3.9.3	MetaboAnalyst	48
3.10	RT-qPCR	49
3.10.1	Isolierung der Messenger-RNA (mRNA).....	50
3.10.2	Reverse Transkription (RT).....	51
3.10.3	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)	52
3.10.4	Statistische Analyse	54
3.11	Versuchsaufbau	54
4	ERGEBNISSE	55
4.1	Ergebnisse des OPU	55
4.1.1	Wiederfindungsrate.....	55
4.2	Ergebnisse der In-vitro-Produktion (IVP)	56
4.3	Milchleistungsdaten	56
4.3.1	Milchmenge	56
4.3.2	Milchproteingehalt	57
4.3.3	Milchfettgehalt	58
4.3.4	Milchharnstoffgehalt	59
4.4	Bestimmung der Aminosäurekonzentrationen im Plasma	59
4.5	Ergebnisse der RT-qPCR.....	60
4.5.1	Analyse der expandierten Blastozysten von Tag 7	61
4.5.2	Analyse der expandierten Blastozysten von Tag 8	62
4.6	Ergebnisse des Multiple-Reaction-Monitorings (MRM)	63
4.6.1	Lipidanalyse	63
4.6.1.1	<i>Unreife Oozyten</i>	64
4.6.1.2	<i>Reife Oozyten</i>	65
4.6.1.3	<i>Expandierte Blastozysten</i>	66
4.6.2	Metabolomanalyse	68
4.6.2.1	<i>Unreife Oozyten</i>	68
4.6.2.2	<i>Reife Oozyten</i>	70
4.6.2.3	<i>Expandierte Blastozysten</i>	70
5	DISKUSSION	71
5.1	Ovum Pick-Up (OPU).....	71

5.2	In-vitro-Produktion (IVP)	72
5.3	Milchleistung	73
5.4	Aminosäurekonzentration im Plasma.....	74
5.5	MessengerRNA-Expressionsmuster	75
5.6	Multiple-Reaction Monitorung (MRM).....	77
5.6.1	Lipidom	78
5.6.1.1	<i>Unreife Oozyten</i>	78
5.6.1.2	<i>Reife Oozyten</i>	79
5.6.1.3	<i>Expandierte Blastozysten</i>	80
5.6.2	Metabolom	81
5.7	Ausblick.....	83
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	84
7	SUMMARY	86
8	VERZEICHNISSE	88
8.1	Abkürzungsverzeichnis	88
8.2	Abbildungsverzeichnis	90
8.3	Tabellenverzeichnis	91
9	ANHANG	93
9.1	Medien für das OPU und die IVP	93
9.2	Chemikalien für die Aminosäurenbestimmung im Plasma.....	99
9.3	Medien für die RT-qPCR.....	100
9.4	Labormaterial und verwendete Geräte	101
9.5	Daten der durchgeführten Untersuchungen	104
9.5.1	Daten der RT-qPCR	104
9.6	Untersuchte Komponenten in der Massenspektrometrie.....	105
9.6.1	Komponenten M1.....	105
9.6.2	Komponenten M2.....	107
9.6.3	Komponenten Met1	110
9.6.4	Komponenten Met 2.....	112
9.6.5	Komponenten Met3	114
9.6.6	Komponenten Met4	116

10	LITERATURVERZEICHNIS	120
11	ERKLÄRUNG ZUR DISSERTATION:	136
12	DANKSAGUNG:	137

1 EINLEITUNG

Die maternale Ernährung spielt eine wichtige Rolle für die Qualität von Oozyten und Embryonen (Galli et al. 2014). Hochleistende Kühe haben in der Regel längere Zeiträume mit negativer Energiebilanz. Infolge einer negativeren Energiebilanz besteht bei diesen Kühen ein größeres Risiko für Reproduktions- und Konzeptionsstörungen als bei Kühen mit niedriger Leistung (Leroy et al. 2008). In diesem Zusammenhang scheint die Supplementierung pansengeschützter Aminosäuren wie Methionin perikonzeptionell ein vielversprechendes Mittel zur Verbesserung der Reproduktionsleistung bei laktierenden Milchkühen zu sein (Ardalan et al. 2010).

Es mag den Anschein haben, dass die sich im Ovarialfollikel entwickelnden Oozyten und der resultierende Embryo im Ovidukt oder im Uterus gut von Veränderungen der äußeren Umgebung abgeschirmt sind. Tatsächlich haben viele Studien gezeigt, dass die Zeit der Reifung der Oozyten im Ovarialfollikel und die ersten Wochen der Embryonalentwicklung besonders empfindlich auf Veränderungen in der maternalen Umgebung reagieren (Ashworth et al. 2009).

Die maternale Ernährung kann in verschiedenen Phasen der Trächtigkeit dauerhafte Veränderungen der Physiologie und des Stoffwechsels der Nachkommen hervorrufen (Peñagaricano et al. 2013). Obwohl der Nährstoffbedarf von Oozyten und Embryonen relativ gering ist, können Veränderungen in der Zusammensetzung oder Menge der von der Mutter aufgenommenen Nahrung tiefgreifende und langanhaltende Auswirkungen auf die embryonale, fetale und postnatale Entwicklung haben (Ashworth et al. 2009). Ursache dafür können u.a. epigenetische Veränderungen sein, die durch die perikonzeptionelle maternale Ernährung induziert werden (Burdge et al. 2007).

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Effekte einer Supplementierung pansengeschützter Aminosäuren über das Futter auf Oozyten und Embryonen möglichst umfangreich darzustellen. Untersucht wurden bislang nur in vivo generierte Embryonen (Peñagaricano et al. 2013; Acosta et al. 2016). Die Einflüsse auf die Oozyten konnten somit noch nicht dargestellt werden. Zudem existierten keine Untersuchungen hinsichtlich der Auswirkungen der Supplementation pansengeschützten Methionins und Lysins in Kombination auf Embryonen. Durch die Analyse der Oozyten und Embryonen mittels Massenspektrometrie können außerdem neue Erkenntnisse über das Lipidom sowie Metabolom gewonnen werden.

2 LITERATUR

2.1 Aminosäurebedarf von Milchkühen

Es gibt essenzielle (EAA) und nicht-essenzielle Aminosäuren (NEAA). Aminosäuren (AA), die als essenziell bezeichnet werden, können nicht bzw. nicht in ausreichender Menge (Arginin/Histidin) von tierischem Gewebe synthetisiert werden (NRC 2001). Wiederkäuer benötigen dieselben essenziellen Aminosäuren wie Nichtwiederkäuer (Black et al. 1952; Downes 1961; Virtanen 1966). Die Eiweißsynthese kann bereits durch das Fehlen einer essenziellen Aminosäure gehemmt werden und somit den Wert des gesamten Eiweißes in einer Ration begrenzen (Kirchgeßner et al. 2014). Diese Aminosäuren werden als limitierende Aminosäuren bezeichnet.

Neben einem Mangel einer Aminosäure kann es auch zu einem Ungleichgewicht kommen, indem sich ein Überangebot der Aminosäuren ergibt, die nicht limitierend sind (Harper et al. 1970). Ein Mangel und ein Ungleichgewicht können sich negativ auswirken und zeigen sich häufig in einem niedrigen Protein/Fett- Verhältnis in der Milch (Weekes et al. 2006).

Aufgenommene AA werden über das Blut transportiert und in den jeweiligen Geweben zur Proteinsynthese zur Verfügung gestellt. Wird mit einem Protein der Bedarf eines Organismus an allen essenziellen Aminosäuren im Verhältnis optimal gedeckt, wird es als Idealprotein bezeichnet. Dies ist allerdings nur ein Modellprotein, an dem die Wertigkeiten anderer Proteine gemessen werden. Milcheiweiß hat z.B. eine hohe Wertigkeit (Kirchgeßner et al. 2014).

Der Proteingehalt von Futtermitteln wird als Rohproteingehalt (XP) angegeben. Das XP wird indirekt berechnet, indem der Stickstoffgehalt bestimmt wird. Dieser beinhaltet auch Nicht-Protein-Stickstoffverbindungen (NPN), welche in unterschiedlichen Verhältnissen zu den Proteinen vorhanden sein können (NRC 2001).

Ausschlaggebend ist das metabolisierbare Protein (MP), das postruminal verdaut und absorbiert wird. Es setzt sich aus pansenbeständigem Protein (rumen undegradable protein; RUP), mikrobiellem Protein und in geringen Mengen endogenem Protein zusammen (NRC 2001).

2.1.1 Mikrobielles Protein des Pansens

Im Pansen synthetisiertes mikrobielles Protein macht 50 % des verdaulichen Proteins oder mehr aus (Schwab 1995). Bei steigender Futteraufnahme und Milchleistung kann sich der Anteil verändern (Schuba und Südekum 2013). Außerdem hängt die Zusammensetzung des verdaulichen Proteins vor allem von der Grundration ab. Rationen mit geringem Proteingehalt können den Anteil des mikrobiellen Proteins steigern (NRC 2001).

Mikrobielles Protein synthetisiert von Bakterien, Protozoen und Pilzen wird mit dem Panseninhalt in den Labmagen und den Dünndarm weitergeleitet und aufgenommen. Die Mikroorganismen benötigen zur Proteinsynthese vor allem Energie und Stickstoff (NRC 2001). Die Zusammensetzung des mikrobiellen Proteins ist konstant und ähnelt dem AA-Muster von Milchproteinen und Körpergewebe bezüglich des Gehaltes an Methionin und Lysin (Schwab und Broderick 2017). Schwankungen im Aminosäureprofil sind vor allem auf die unterschiedlichen Populationen der Mikroorganismen des Pansens zurückzuführen. Der größte Unterschied ist der deutlich niedrigere Lysin-Gehalt im Rohprotein (XP) von Bakterien (42 %) im Vergleich zu dem XP von Protozoen (Sok et al. 2017). Insgesamt wird mikrobielles Protein aufgrund der hohen Verdaulichkeit von 85 bis 90% (GfE 2001) und der Zusammensetzung der essenziellen Aminosäuren als qualitativ hochwertig angesehen (Schwab 1995; Kirchgeßner et al. 2014).

Die Fütterung pansenbeständiger Proteine (rumen undegradable protein; RUP) erhöht die Menge an Proteinen, die in den Dünndarm gelangt, kann aber die Menge an mikrobiellem Protein, das im Pansen synthetisiert wird, verringern (Clark et al. 1992; Piepenbrink et al. 1996; Ardalan et al. 2010). RUP können von den Pansenmikroben nicht verwertet werden und haben in zu großen Mengen negative Effekte, da sie im Pansen als Füllstoff wirken.

2.1.2 Überversorgung an Rohprotein (XP)

Die Proteinverwertung im Pansen ist einer der ineffizientesten Stoffwechselwege von Wiederkäuern, weshalb eine Diät mit einem erhöhten XP-Anteil nicht zu empfehlen ist (Koenig und Rode 2001). Dadurch entsteht vermehrt Ammoniak, welcher durch die Leber zu Harnstoff umgewandelt wird (Kirchgeßner et al. 2014). Somit kann der überflüssige Stickstoff als Harnstoff ausgeschieden werden. Dies stellt sich in erhöhten Plasmaharnstoff- (plasma urea nitrogen; PUN) und Milchharnstoffgehalten (milk urea nitrogen; MUN) dar, welche stark miteinander korrelieren

Literatur

(Xu et al. 1998). Bei höheren PUN-Konzentrationen kommt es meistens zu schlechteren Fruchtbarkeitsraten (Butler et al. 1996). Ursachen dafür können ein erniedrigter pH-Wert im Uterus (Elrod und Butler 1993; Elrod et al. 1993) und ein toxischer Effekt von Ammoniak und Harnstoff auf die Oozyten und die frühen Embryonen sein (Butler 1998).

Transfers von Embryonen, die von Spenderkühen gewonnen wurden, die erhöhte PUN-Konzentrationen aufweisen, resultieren in verminderten Trächtigkeitsraten. Bei den Empfängern hingegen lässt sich kein Einfluss der PUN-Konzentrationen auf die Trächtigkeitsraten nachweisen. Dies deutet darauf hin, dass die Empfindlichkeit der Embryonen sieben Tage nach Befruchtung nachlässt (Rhoads et al. 2006).

Bei Kühen mit einer PUN-Konzentration über 16 mg/dL kommt es bei Embryonen aus durch Schlachtung gewonnenen Eizellen nach IVP zu verringerten Teilungs- und Entwicklungsraten, bei gleichzeitig verringerter Zellzahl und erhöhter Apoptose-Rate im Vergleich zu denen mit PUN-Konzentrationen unter 13 mg/dL (Santos et al. 2009). Außerdem kann sich ein Zusatz von Harnstoff in das Reifungsmedium negativ auf die Reifung und Fertilisation der Oozyten auswirken (De Wit et al. 2001), zu vermehrten Degenerationen führen und die Entwicklungskompetenz hemmen (Ocon und Hansen 2003; Kowsar et al. 2018). Harnstoff kann spannungsabhängige Ca-Kanäle hemmen, wodurch ein Schrumpfen von Oozyten induziert wird. Außerdem hat Harnstoff negative Einflüsse auf Proteine der Zona pelucida und die Expression von Markergenen, die an der frühen Embryonalentwicklung beteiligt sind (Kowsar et al. 2018).

Erhöhte Konzentrationen an Harnstoff und/oder Ammoniak im Blut führen zudem zu erhöhtem Ammoniakgehalt in der Follikelflüssigkeit (Sinclair et al. 2000). Ammoniak kann in geringen Konzentrationen während der In-vitro-Fertilisation eine leichte Steigerung der Entwicklungsraten bewirken, führt bei hohen Konzentrationen allerdings zu einer gesteigerten Degeneration von Eizellen und verminderten Entwicklungsraten der Embryonen (Hammon et al. 2000). Außerdem ist das Risiko einer Nichtträchtigkeit bei einer MUN-Konzentration über 16 mg/dL im Sommer 18-mal höher als bei einer MUN-Konzentration von unter 16 mg/dL im Winter. Möglicherweise wirken der erhöhte Harnstoffgehalt und der Hitzestress synergistisch (Melendez et al. 2000).

Zu diesen negativen Effekten auf die Leistungsfähigkeit kommt zudem eine erhöhte Umweltbelastung durch vermehrte Stickstoffausscheidung. Wichtig dabei ist die Effizienz der Stickstoffnutzung, die darüber definiert ist, wieviel von dem über die Nahrung aufgenommenen Stickstoff in Milch und Fleisch gebunden wird. Bei Milchkühen wird die N-Effizienz allerdings nur auf 23-33 % geschätzt. Der überschüssige Stickstoff wird größtenteils über den Harn und in geringen Mengen über den Kot ausgeschieden (Robinson 2010).

In einem Versuch konnte pansengeschütztes Lysin und Methionin jeweils zu einer Erhöhung der MUN-Konzentrationen führen. Dabei deckte die Ration 86 % des Lysinbedarfs und 90 % des Bedarfs an Methionin. Der Effekt war allerdings nicht so groß wie bei einer Ration ohne pansengeschützte Aminosäuren, welche den Bedarf beider AA leicht übersteigt. Nur in der mittleren Laktation konnten diese Werte durch große Mengen an pansengeschützten Methionin und Lysin übertroffen werden (Xu et al. 1998). Třináctý et al. (2009) bestätigten auch eine Erhöhung von PUN-Konzentrationen durch pansengeschütztes Methionin und Lysin, wobei Schwab et al. (1992) und Arriola Apelo et al. (2014) keine Unterschiede feststellen konnten.

2.1.3 Supplementierung von Aminosäuren bei Milchkühen

Um die biologische Wertigkeit des Futtereiweißes einer Ration zu erhöhen, können limitierende Aminosäuren einzeln supplementiert werden. Ziel ist es dabei, die Qualität des Eiweißes zu steigern und auf bestimmte Leistungsrichtungen anzupassen (Kirchgeßner et al. 2014). Herangezogen werden hierfür häufig pansengeschützte Aminosäuren, die sich besonders dafür eignen, unausgewogene AA-Profile auszugleichen. Vor allem in der Früh- und Hochlaktation ist eine Anpassung des Aminosäuremusters durch Supplementation sinnvoll, da die Trockenmasse-Aufnahme und damit auch die mikrobielle Biosynthese noch nicht ihr höchstes Niveau erreicht haben (Schuba und Südekum 2013).

Über Casein-Infusionen in den Labmagen konnte gezeigt werden, dass durch adäquate Proteinversorgung die Milchmenge sowie der Milchproteingehalt gesteigert werden können (Broderick et al. 1970; Vik-mo et al. 1974). Bei intravenöser Applikation von Methionin in verschiedenen Dosierungen (11,2 und 24,8 g/Tag) führt die Gabe der niedrigeren Dosis zu einer erhöhten Futteraufnahme (12,5 vs. 10,8 kg/Tag) und einem erhöhter Gehalt an Milchprotein; wohingegen diese Effekte bei der höheren Dosis nicht auftraten (Fisher 1972).

2.2 Pansengeschützte Nährstoffe und Aminosäuren

Pansengeschützte Nährstoffe werden in einer Form gefüttert, die es ermöglicht, dass der Nährstoff in unveränderter Form in den Labmagen gelangt und somit für das Tier im Darm verfügbar ist (NRC 2001).

Pansengeschützte Aminosäuren (RPAA) eignen sich z.B. besonders, um Kühe gezielt mit einzelnen Aminosäuren zu versorgen. Normalerweise werden kristalline Aminosäuren direkt im Pansen abgebaut (Chalupa 1975; Overton et al. 1996; Robinson 2010). Einen Schutz dieser Aminosäuren kann durch unterschiedliche Methoden erreicht werden; beispielsweise durch die Verwendung modifizierter Formen der Aminosäuren (Analoge) oder Ummantelung der Aminosäuren mit pansenstabilen Stoffen, wie Lipiden oder pH-sensitiven Polymeren (Graulet et al. 2005; Reiners et al. 2017). Als Nachweis für eine erhöhte Aufnahme wird meist die Aminosäurekonzentration im Blutplasma herangezogen (Koenig und Rode 2001). Es kommt allerdings nur zu erhöhten Plasmaspiegeln, wenn das Angebot den Bedarf übersteigt (Clark 1975).

2.2.1 Ummantelte Aminosäuren (coated AA)

Es gibt mehrere Möglichkeiten Aminosäuren zu ummanteln, so dass sie den Pansen möglichst unverstoffwechselt passieren und anschließend im Labmagen und Dünndarm resorbiert werden können. Die Ummantelungen können z.B. aus Fettsäuren und pH-sensitiven Polymeren oder aus Fetten/gesättigten Fettsäuren und mineralischen Matrizen (z.B. Calciumhydroxid) bestehen (NRC 2001; Graulet et al. 2005). Als gesättigte Fettsäuren werden häufig Palmitin- (16:0) und Stearinsäure (18:0) verwendet (Robinson 2010).

Die ruminale Beständigkeit bei Ummantelungen mit pH-sensitivem Polymer von Methionin wird auf 80 % und die intestinale Verfügbarkeit wird auf 90 % geschätzt (Schwab 1995). Über Bluttests wurde die Bioverfügbarkeit von 75 % beobachtet (Rulquin und Kowalczyk 2003). Sie variiert je nach Produkt und wird für andere Arten der Ummantelung geringer eingeschätzt (Blum et al. 1999; Südekum et al. 2004). Für mit Lipiden ummanteltes Lysin berechneten Wu et al. (2012), dass weniger als die Hälfte des Lysins der ruminale Verstoffwechslung entgeht und zur Resorption im Dünndarm zur Verfügung steht. Die Passagedauer in den Labmagen wird auf acht Stunden geschätzt (Fleming et al. 2019).

Mechanisches Mischen und die Verlängerung der Kontaktzeit mit Futterpartikeln können zu einer erhöhten Freisetzung der Aminosäuren im Pansen führen, indem es zu einer Schwächung und Beschädigung der Ummantelung kommt (Ji et al. 2016).

2.2.2 Pansenschutz durch chemische Modifizierung

Die Einschränkungen bei der Handhabung ummantelter Aminosäuren veranlasste jedoch dazu, alternative Lösungen wie chemisch modifizierte Formen zu untersuchen. Vor allem bei Methionin konnten Alternativen gefunden werden.

2.2.2.1 Hydroxymethylthiobuttersäure (HMB)

Hydroxymethylthiobuttersäure (HMB) wird z.B. erfolgreich bei Monogastriern als Supplement eingesetzt (Graulet et al. 2005). HMB ist das Hydroxyanalogon von Methionin, dem die Aminogruppe fehlt (Koenig et al. 2002) und welches im Pansen nicht so schnell abgebaut wird wie Methionin (Belasco 1972). Bei Wiederkäuern zeigt es allerdings keine bzw. eine schwache Wirkung und führt nur zu einer geringen Steigerung der Konzentration von Methionin im Plasma (Koenig et al. 2002; St-Pierre und Sylvester 2005). Es wird ihm ein Einfluss auf den Lipidstoffwechsel der Mikroorganismen im Pansen zugeschrieben, welcher zu einem erhöhten Lipidgehalt im Serum und in der Milch führen kann (Patton et al. 1970; Huber et al. 1984). Durch eine Supplementation von Methionin lässt sich allerdings auch eine Erhöhung des Milchfettgehalts erzielen (Lundquist et al. 1985). Eine erhöhte Aufnahme von Methionin und daraus resultierend eine gesteigerte Synthese von Milchprotein scheint durch HMB nicht zu erfolgen (Graulet et al. 2005; Rulquin et al. 2006).

2.2.2.2 Isopropylester von Hydroxymethylbuttersäure (HMBi)

HMBi ist ein Methionin-Analogon, das mit einer Isopropyl-Gruppe verestert ist, welche seine lipophilen Eigenschaften verändert, sodass es biologische Membranen passieren kann. Dadurch kann HMBi über die Pansenwand aufgenommen und vor einem Abbau durch Mikroorganismen im Pansen geschützt werden (Graulet et al. 2005). Nur 2,3 % des aufgenommenen HMBi gelangen in den Blättermagen (Noftsgger et al. 2005). Durch Hydrolyse entstehen HMB und Isopropylalkohol, welche wiederum zu Methionin bzw. Aceton umgewandelt werden können. Die Bioverfügbarkeit liegt bei 45 bis 50 % (Graulet et al. 2005), unabhängig, ob es in flüssiger oder kristalliner Form vorliegt (Schuba und Südekum 2013). HMBi ist eine geeignete „pansengeschützte“ Form von Methionin, die einfacher in der Handhabung ist und selbst in Pellets integriert werden kann (Rulquin et al. 2006). In Abbildung 1 ist die Verstoffwechslung bzw. Aufnahme von HMBi dargestellt.

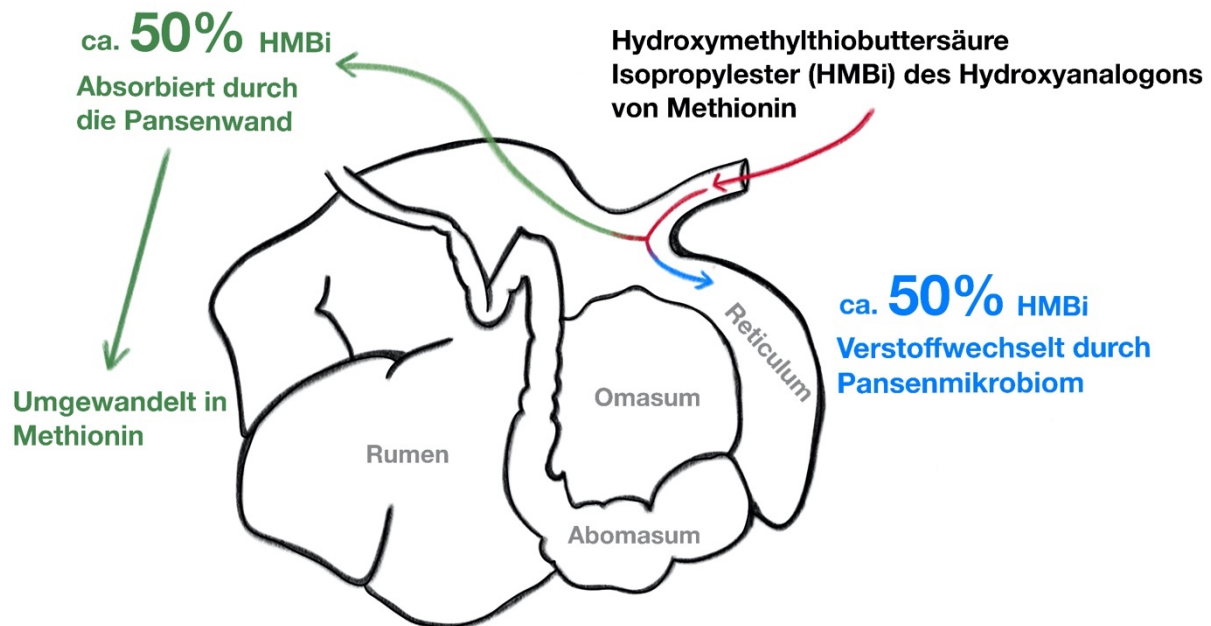


Abbildung 1: Verstoffwechslung von HMBi-Produkt (von Natalie Ritz)

2.3 Limitierende Aminosäuren der Milchkuh: Methionin und Lysin

Lysin gilt als erstlimitierende Aminosäure für laktierende Kühe, wenn Mais den Hauptanteil der pansenbeständigen Proteine (rumen undegradable protein; RUP) in der Ration ausmacht (King et al. 1991; Schwab et al. 1976, 1992). Methionin hingegen gilt als erstlimitierende Aminosäure bei der Verfütterung größeren Mengen an Grünfutter oder wenn der größte Anteil der RUP durch Hülsenfrüchte, tierische Proteine oder beidem bereitgestellt wird (Armentano et al. 1997; NRC 2001). Allgemein wird bei maislastigen Rationen angenommen, dass Methionin und Lysin die zwei am stärksten limitierenden Aminosäuren sind und co-limitierend wirken können (Schwab et al. 1976; NRC 2001).

Dieses zeigt sich in niedrigen Blutplasmagehalten der beiden Aminosäuren, bei gleichzeitig hohem Bedarf in der Milchproteinsynthese (Virtanen 1966; Clark 1975). Neben Methionin und Lysin können auch andere Aminosäuren limitierend sein (Schwab und Broderick 2017). Der Bedarf an EAA kann sich im Laufe der Laktation ändern (Schwab et al. 1992; Robinson et al. 2011).

2.3.1 Methionin

Methionin ist eine aliphatische, Schwefel-enhaltende, essenzielle Aminosäure, die Vorläufer von z.B. Succinyl-CoA, Homocystein, Cystein, Kreatinin, und Carnitin sein kann. Außerdem ist Methionin essenziell für die Synthese von Polyaminen und Phosphatidylcholinen (Martínez et al. 2017). In vielen Stoffwechselwegen spielt Methionin eine Rolle, ob als Methyl-donor z.B. bei der Cholin-Synthese, bei der glucogenen Verwertung in den Mitochondrien oder in der Proteinbiosynthese. Außerdem beeinflusst Methionin die DNA-Methylierung, welche ein Mechanismus zur Transkriptionskontrolle ist. Als Methyl-donor ist meist S-Adenosyl-Methionin (SAM) involviert, welches durch Methionin und Adenosintri-phosphat (ATP) gebildet wird (Lobley 1992; Van den Veyver 2002; McFadden et al. 2020).

Für die Synthese von Glutathion, welches zu den wichtigsten Antioxidantien zählt, kann Methionin als Vorstufe für die Bildung von Cystein dienen. Zudem kann Methionin einen Chelatkomplex mit Blei bilden und dieses aus dem Gewebe entfernen, wodurch auch oxidativer Stress reduziert wird (Martínez et al. 2017). Das Methionin-Derivat Homocystein hingegen ist toxisch und kann oxidativen Stress verursachen (Lobley 1992). Außerdem dient es auch zur Regulation von Redox-Reaktionen, indem Methionin selbst reversibel zu Methioninsulfoxid (MetO) oxidiert oder umgekehrt zu Methionin reduziert werden kann. Weiterhin kann Methionin zur Stabilisierung von Proteinen dienen und gleichzeitig bei der sequenzunabhängigen Proteinerkennung beteiligt sein (Aledo 2019). Bei Ratten konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Zufuhr von Methionin das Redox-Gleichgewicht in der Leber und den Nieren beeinflusste. Des Weiteren führten hohe Plasmakonzentrationen von Met oder MetO zu einer erhöhten glomerulären Filtrationsrate und störten somit die renale Funktion (Soares et al. 2017).

Einer Restriktion von Methionin werden auch einige positive Effekte zugeschrieben. Sie kann z.B. den oxidativen Stress reduzieren und Entzündungsreaktionen lindern. Bei Nagern verminderte es die Akkumulation von Fett und verlängerte die Lebensdauer. Bei Schweinen hingegen führte eine Methioninrestriktion zu einer Erhöhung des Lipidanteils bei geringerer Körpergewichtszunahme (Zhou et al. 2016a).

2.3.1.1 Einfluss von Methionin auf den Lipidstoffwechsel

Als Vorläufer des Methylgruppendonors S-Adenosyl-Methionin wird Methionin eine wichtige Rolle in der Synthese von Cholin und Phosphatidylcholin zugeschrieben (Ardalan et al. 2010), welche Hauptbestandteile in Lipidmembranen sind.

Literatur

Vor allem in der Früh-laktation kommt es zu einer negativen Energiebilanz und einer Mobilisation der Fettreserven, weshalb vermehrt freie, unveresterte Fettsäuren (non esterified fatty acids; NEFA) freigesetzt werden, die sich in der Leber als Triglyceride akkumulieren können. Mittels Phosphatidylcholinen als Membranbestandteile können diese NEFAs in der Leber als very low-density Lipoproteine (VLDL) mobilisiert und ausgeschleust werden. Bei Wiederkäuern läuft die Ausschleusung von VLDLs vergleichsweise langsam ab, was bei einer erhöhten Aufnahme von NEFAs schnell zu einer Fettleber führen kann (Ardalan et al. 2010). Eine Akkumulation von Triglyceriden kann wiederum die Entgiftung von Ammoniak zu Harnstoff in der Leber hemmen (Strang et al. 1998; Zhu et al. 2000).

Die Mobilisierung von Lipiden nach Zulage von pansengeschütztem Methionin kann zudem zu einer Erhöhung des Milchfettgehaltes führen (Overton et al. 1996; Yang 2010). Allerdings tritt auch bei ruminal verfügbarem Methionin oder HMB eine Steigerung der Milchfettsynthese und ein erhöhter Gehalt an Triglyceriden im Blut auf (Huber et al. 1984; Lundquist et al. 1985). Zudem trägt die hepatische Synthese von VLDLs bzw. Umwandlung von freien Fettsäuren in Plasmatriglyceride mit anschließender Sekretion nur einen geringen Teil zur Milchfetterhöhung bei (Pullen et al. 1989). Normalerweise wird durch pansengeschütztes Methionin (RPMet) eher eine Erhöhung des Milchproteins erwartet als die des Milchfettes, solange die ruminale Fermentation nicht wesentlich beeinträchtigt wird (Ardalan et al. 2010).

Die Supplementierung von Smartamine M (mit pH-sensitivem Polymer ummanteltes Methionin) oder HMBi erhöht den Gehalt von 18:0 Fettsäuren und reduziert den Gehalt von 18:2 Fettsäuren in der Milch. Die systematische Beschreibung von Fettsäuren beruht auf der Anzahl der Kohlenstoffatome und der Anzahl der Doppelbindungen. 18:2 bezeichnet also eine Fettsäure mit 18 Kohlenstoffatomen und zwei Doppelbindungen. Diese langkettigen Fettsäuren stammen aus Plasmalipiden, da die Milchdrüse keine Fettsäuren mit mehr als 16 C-Atomen synthetisiert (Rulquin et al. 2006). Die Mikroorganismen im Pansen spielen hierbei wahrscheinlich keine Rolle, da ähnliche Veränderungen auch bei postruminalen Infusionen beobachtet wurden (Pisulewski et al. 1996). Mittels postruminaler Infusion wird eine Verstoffwechslung im Pansen umgangen, indem die infundierten Stoffe direkt im Duodenum absorbiert werden. Somit ermöglichen postruminale Infusionen eine direkte Supplementierung von Proteinen oder einzelnen Aminosäuren.

Eine Ergänzung mit Methionin-Analoga führt außerdem zu einer erhöhten Konzentration ungerader gesättigter Fettsäuren (v.a. 15:0) in der Milch, welche auf eine Stimulation des mikrobiellen Wachstums im Pansen hinweist. Diese Veränderungen führen wiederum dazu, dass weniger geradzahlige, kurz- und mittelkettige Fettsäuren bei einer HMBi-Supplementierung vorkommen. Die

De-novo-Synthese von Fettsäuren ist umgekehrt proportional zur erhöhten Aufnahme von Plasma-NEFAs, sowie ungeradzahligen Fettsäuren mikrobiellen Ursprungs (Rulquin et al. 2006).

2.3.1.2 Pansengeschütztes Methionin (RPMet)

In postruminalen Infusionsversuchen mit unterschiedlichen Mengen an Methionin konnte gezeigt werden, dass sich die Milchproteinmenge und der Milchproteingehalt linear zu der Menge an Methionin erhöhen (Pisulewski et al. 1996). Diese Effekte lassen sich auch mittels RPMet erzielen (Graulet et al. 2005). Es besteht allerdings eine Abhängigkeit von der Grundration und kann auch für andere Aminosäuren gelten (Xu et al. 1998). Der Rohproteingehalt in der Ration spielt dabei keine wesentliche Rolle (Leonardi et al. 2003).

Ummanteltes pansengeschütztes Methionin bewirkt meist keine Unterschiede in der Milchmenge. Es erhöht sich allerdings die Methionin Konzentration und das Methionin/Valin Verhältnis im Plasma. Dies deutet daraufhin, dass es zu einer erhöhten Aufnahme von Methionin kommt (Broderick et al. 1970). Eine Erhöhung der Plasmakonzentration, nach Supplementation von RPAA, ist allerdings nicht immer nachweisbar (Robinson et al. 2010). Der Zeitpunkt der Blutentnahme kann dabei auch wichtig sein. Nach Supplementation von HMBi ist ein Peak in der Konzentration von Methionin im Plasma nach vier Stunden und bei SmartamineM nach 22 bis 23 Stunden zu erwarten. Während es bei HMBi zu einem sofortigen Anstieg kommt, setzt dieser bei SmartamineM erst nach zehn Stunden ein. Danach erreichen die Werte ein Plateau mit erhöhtem Methioninspiegel, welches bei HMBi 4 Stunden und bei SmartamineM 16 Stunden andauert. Das Basalniveau wurde bei HMBi nach 30 Stunden erreicht (Graulet et al. 2005). In einem weiteren Versuch mit SmartamineM zeigte sich ein Peak nach 12 Stunden und eine Rückkehr zum Basalniveau nach 24 Stunden (Toledo et al. 2017).

Yang (2010) beobachtete zudem verringerte Konzentrationen von EAA und nichtessenziellen AA im Plasma, die für einen erhöhten Verbrauch von AA sprechen, wenn die postruminale Zufuhr der am stärksten limitierenden AA erhöht wird.

Osorio et al. (2014) und Zhou et al. (2016b) konnten nach Supplementierung mit RPMet zudem verbesserte Entzündungswerte beobachten, welche auf einen besseren immunometabolischen Status hinweisen. Sie beobachteten beispielsweise eine erhöhte Phagozytosekapazität von neutrophilen Granulozyten, höhere Albumin- und geringere Serum Amyloid A- sowie Interleukin 6-Gehalte im Plasma.

2.3.2 Lysin

Lysin ist eine essenzielle Aminosäure, die sich beim Menschen metabolisch nicht von anderen essenziellen Aminosäuren unterscheidet (Matthews 2020). Bei Milchkühen hingegen kann Lysin die Leistung limitieren, da zur Synthese von Milchprotein viel Lysin benötigt wird und gleichzeitig die intestinale Aufnahme bei getreidehaltigen Rationen eingeschränkt ist (Robinson et al. 2005).

Außerdem wird Lysin mit der Carnitin-Synthese in Verbindung gebracht, da diese von der Verfügbarkeit von Trimethyllysin abhängig ist. Notwendig hierfür sind Lysin als Grundgerüst und Methionin als Methyl donor (Carlson et al. 2007). Carnitin ist essenziell für den Lipidstoffwechsel, indem es langkettige Fettsäuren aus dem Zytosol in die Mitochondrien transportiert und sie für die Beta-Oxydation verfügbar macht (Pekala et al. 2011). Zudem sorgt es für eine Verringerung der Lipidakkumulation in der Leber (Carlson et al. 2007).

2.3.2.1 Epigenetische Regulationsmechanismen von Lysin

Die Methylierung der DNA ist nicht der einzige epigenetische Regulationsmechanismus, über den die Transkription gesteuert wird. Wichtig sind beispielsweise auch die Modifikation von Histonen und RNA-basierte Mechanismen (Jeffries 2018; Zhang et al. 2021).

Histone sind eine hochkonservierte Gruppe von Proteinen, die in erster Linie der Stabilisierung und Organisation der DNA im Zellkern dienen. Durch posttranslationale Modifikationen bestimmter Histonaminosäuren werden diese Reste stärker positiv oder negativ geladen und können so das Phosphatgerüst der DNA anziehen und kondensieren oder abstoßen und öffnen (Jeffries 2018). Diese Modifikationen finden v.a. an N- und C-terminalen Schwänzen der Histonproteine statt. Sie werden beispielsweise acetyliert, phosphoryliert, methyliert, SUMOyliert (small ubiquitin-related modifier) und ubiquitiniert (Lawrence et al. 2016; Zhang et al. 2021). Allgemein treten Modifikationen v.a. an Lysinresten auf, können aber auch bei anderen Aminosäuren wie Arginin, Serin oder Threonin vorkommen (Lawrence et al. 2016; Jeffries 2018). Außerdem enthalten Histonschwänze hauptsächlich Lysin (Shahid et al. 2021). Die wichtigste posttranskriptionelle Modifikation ist die Histon-Methylierung, die in der Regel an den Lysinresten von Histon H3 und H4 durch das Hinzufügen von Methylgruppen erfolgt (siehe Abbildung 2). Die Lysinreste von Histonen können einfach bis dreifach methyliert sein und als aktive oder repressive Marker der Genexpression wirken (Zhang et al. 2021). Histon-Acetylierungen sind allgemein aktivierend und unterstützen den Euchromatinzustand (Jeffries 2018). Anders als bei der Histon-Acetylierung hängen die Auswirkungen der Histon-Methylierung auf die Genregulation von der Lage der

modifizierten Position und der Anzahl oder Dichte der hinzugefügten Methylgruppen ab (Jeffries 2018).

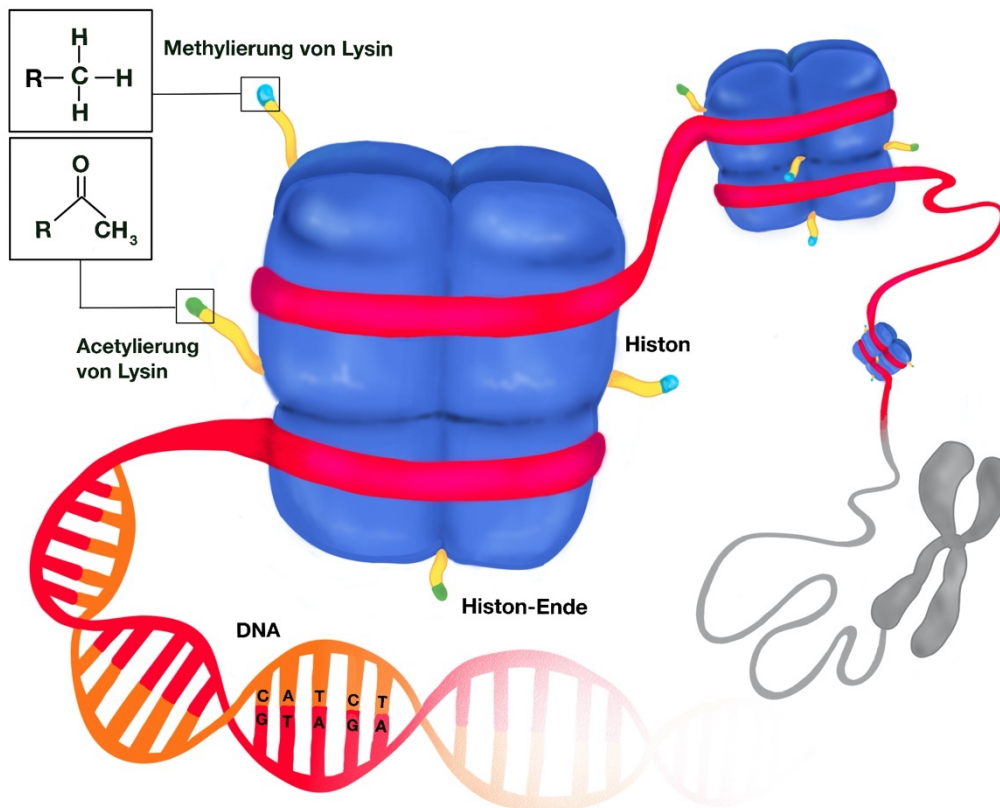


Abbildung 2: Darstellung von DNA, Histonen und deren epigenetische Modifikationen (von Natalie Ritz)

2.3.2.2 Pansengeschütztes Lysin (RPLys)

Bei Rationen mit hohem Rohproteinanteil kann es zu niedrigen postruminalen Lysinkonzentrationen kommen, da die Hauptproteinquellen meist niedrigere Lysingehalte aufweisen als mikrobiellen Proteine (Robinson 2010). Über die Supplementation von Lysin gibt es deutlich weniger Studien als über die Supplementation von Methionin oder eine Kombination von Methionin und Lysin. Dies liegt unter anderem daran, dass pansengeschützte Produkte mit Lysin später entwickelt wurden (Robinson 2010).

Kristallines Lysin wird fast vollständig im Pansen zersetzt und zeigt keinen Effekt auf die Pansenflora, Milchleistung oder den Aminosäuregehalt im Blut (Robinson et al. 2005; Johnson-VanWieringen et al. 2007). Lysin wird häufig mit Lipiden beschichtet (siehe Abbildung 3), um eine Verstoffwechslung im Pansen zu verhindern. Die Bioverfügbarkeit kann je nach Produkt zwischen 5,1 und 87,2 % variieren (Whitehouse et al. 2017). Pansengeschützte Lysin-Produkte weisen trotz gleicher Art der

Beschichtung oft einen höheren In-situ-Abbau auf als die entsprechenden Methionin-Produkte. Die positive Ladung von Lysin könnte ein Grund dafür sein (Rossi et al. 2003). Der Schutz durch pH-sensitive Polymere ist eingeschränkt, da es bei Rationen mit wenig Lysin, welche v.a. Mais enthalten, häufig zu sauren pH-Werten im Pansen kommt (Reiners et al. 2017). Versuche mit Lysin-Analoga oder -Derivaten (z.B. Di-hydroxymethyl-L-Lys-Ca) waren bis jetzt noch nicht erfolgreich (Schwab und Broderick 2017).

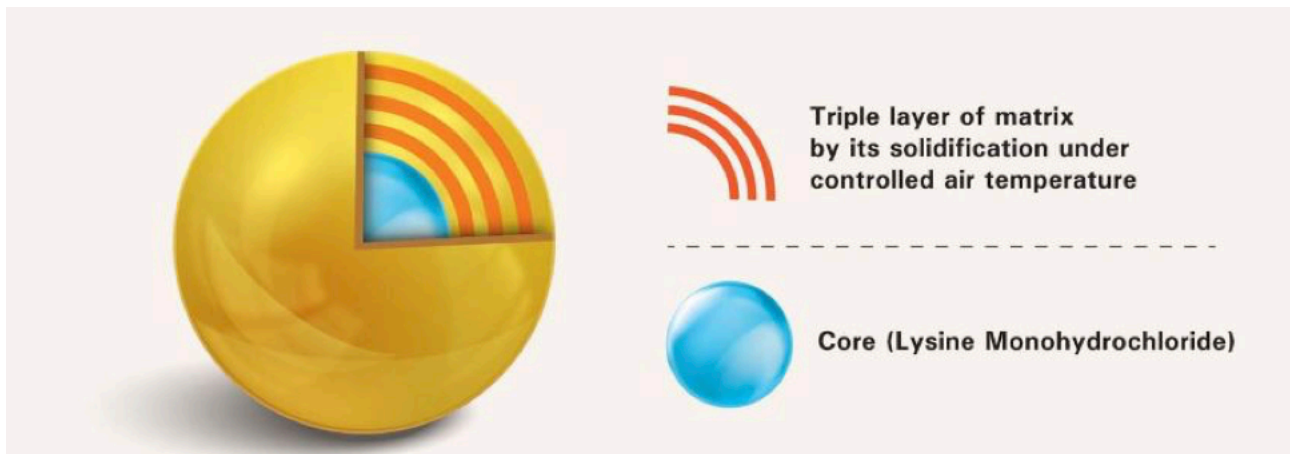


Abbildung 3: Aufbau von Kemin LysiGEM, einem ummantelten Lysinpräparat
(Quelle: <https://www.kemin.com/in/en/markets/animal/products/lysigem>)

Die Milchleistung und der Milchproteingehalt können durch ummanteltes Lysin gesteigert werden (Třináctý et al. 2009) und teilweise auch der Milchfettgehalt (Robinson et al. 2011). Vor allem im ersten Laktationsdrittel steigt der physiologische Bedarf an Aminosäuren rasant an. Aus diesem Grund können hauptsächlich in dieser Phase erhöhte Milchleistungen, Milchproteingehalte und Milchfettmengen durch Supplementation von ummanteltem Lysin beobachtet werden. Im zweiten Drittel der Laktation kommt es eher zu einer Überversorgung, da vermutlich der Bedarf an Lysin sinkt (Robinson et al. 2011).

Die Supplementation von Lysin vermindert die Trockenmasseaufnahme, was sich unter Umständen negativ auf die Milchleistung auswirken kann. Deshalb kann die alleinige Supplementation von Lysin auch als negativ gewertet werden (Robinson 2010). Auf mögliche Gründe dafür wird von den Autoren nicht weiter eingegangen.

Eine Ursache für ausbleibende positive Effekte ist, dass weniger Lysin als vorgesehen resorbiert wurde, da der Pansenschutz der AA in den RP-Produkten geringer als erwartet war oder durch die Supplementation eine AA-Imbalance bzw. ein AA-Mangel von anderen essenziellen AA entsteht, da

der Abstand zwischen erst-, zweit- und dritt-limitierenden AA sehr gering sein kann (Robinson et al. 2010).

2.3.3 Pansengeschütztes Methionin und Lysin

Methionin und Lysin sind meist erst- und zweitlimitierend und wirken auch co-limitierend, weshalb häufig beide Aminosäuren supplementiert werden (Schwab et al. 1976; Rulquin 1987). Das bedeutet, dass sich eine Supplementation von beiden Aminosäuren positiver auswirkt als die Supplementation von nur einer Aminosäure. In Kombination können sie vor allem den Milchproteingehalt erhöhen, aber z.B. auch die Milchmenge, Milch/TM und die N-Effizienz. Insgesamt werden die Effekte allerdings als gering eingeschätzt und sind nicht mit Sicherheit vorherzusagen (Robinson 2010).

Eine Überversorgung mit Methionin oder Lysin kann zu Leistungseinbußen und einer verringerten Trockenmasseaufnahme führen. Dies ist bei einer Überversorgung mit beiden Aminosäuren schwächer ausgeprägt (Robinson et al. 2000).

Die Effekte einer Supplementation von Methionin oder Methionin und Lysin nehmen mit steigender Milchleistung der Kontrollgruppe ab. Jedoch verstärken sich die Effekte bei steigendem Rohproteingehalt der Kontrollration. Dies könnte auf eine effizientere Verstoffwechselung der nicht essenziellen Aminosäuren hinweisen (Robinson 2010).

Da die Parameter zwischen den Studien mit RPAA großen Schwankungen unterliegen, ist es schwierig die geringen Unterschiede durch die Supplementation mit RPAA darzustellen (Robinson 2010).

Verglichen mit einer reinen Methionin-Infusionen neigen Infusionen mit Methionin und Lysin dazu, den Plasmagehalt von EAA und NEAA zu senken. Davon sind die Plasmagehalte von Methionin und Lysin ausgenommen. Nur bei wenigen Aminosäuren (His, Leu, Val) kommt es allerdings zu signifikanten Unterschieden. Insgesamt weisen diese Veränderungen auf einen erhöhten Verbrauch aller Aminosäuren hin (Schwab et al. 1992).

2.4 In-vitro-Produktion (IVP) boviner Embryonen

In den letzten Jahrzehnten wurde die In-vitro-Produktion (IVP) boviner Embryonen erheblich verbessert, sodass es mittlerweile auch im großen Umfang kommerziell eingesetzt wird.

Bovine Embryonen dienen zudem als Modellsystem zur Untersuchung der frühen Embryogenese von Säugetieren, einschließlich der des Menschen. Allgemein ist das Verfahren der IVP bei Rindern am weitesten entwickelt. Trotz allen Verbesserungen unterscheiden sich in vitro generierte Embryonen von ihren in vivo generierten Gegenstücken (Wrenzycki 2018).

Für die IVP boviner Embryonen können Kumulus-Oozyten-Komplexe (KOK) sowohl von Ovarien geschlachteter Kühe als auch von lebenden Spendertieren gewonnen werden. Nach dem Tod des Tieres kann dies durch Zerschneiden oder Aspiration des Follikelinhalts erfolgen, was unter direkter Sichtkontrolle möglich ist. Bei lebenden Spendern muss hingegen eine transrektale Manipulation des Ovars stattfinden, um die Visualisierung der Follikel durch laparoskopische oder ultrasonographische Bildgebung zu erleichtern (Kapitel 10.2, Niemann und Wrenzycki 2018).

Die IVP besteht aus drei Prozessschritten, der In-vitro-Maturation (IVM), der In-vitro-Fertilisation (IVF) und der In-vitro-Kultivierung (IVC) der vermeintlichen Zygoten bis zum Blastozystenstadium (Wrenzycki 2018). Die ersten Kälber, die vollständig mittels IVP erzeugt wurden, wurden 1987 geboren (Fukuda et al. 1990).

In der Regel durchlaufen in vitro ungefähr 80 bis 90 % der unreifen Oozyten die Kernreifung, davon werden ca. 80 % befruchtet, 30 bis 40 % von diesen entwickeln sich zum Blastozystenstadium und ca. 50 % der übertragenen Embryonen führen zu einer erfolgreichen Trächtigkeit (Kapitel 12.1, Niemann und Wrenzycki 2018).

Allgemein steigt die gesamte Embryonenproduktion in den meisten Regionen bei allen Spezies. Das Wachstum im Zeitraum 2021 bis 2022 war jedoch geringer als in dem Jahr zuvor. Im Jahr 2022 wurden 1.521.018 bovine IVP-Embryonen gemeldet, was eine Steigerung von 6,3 % zum Vorjahr darstellt. Im Gegensatz dazu wurden 394.509 in vivo generiert Embryonen (in vivo derived; IVD) entnommen, was einem Anstieg von 2,1 % gegenüber 2021 entspricht. In den letzten zehn Jahren war jedoch ein Rückgang der IVD-Zahlen zu beobachten (Viana 2023).

Seit 2012 kommt es zu einem kontinuierlichen Anstieg der IVP-Embryonen und ab dem Jahr 2016 übersteigt die Anzahl der lebensfähigen in vitro erzeugten Embryonen die Zahl der IVD-Embryonen (siehe Abbildung 4), die mittels Superovulation generiert wurden (Viana 2023). Diese Tendenz setzt sich in den darauffolgenden Jahren fort. In Europa hingegen ist der Anteil an IVD-Embryonen mit 75,8 % deutlich höher. Insgesamt wurden europaweit 137.036 IVD- und 43.749 IVP-Embryonen

generiert. Die Anzahl an IVP-Embryonen stieg 2022 (3,2 %), nachdem sie von 2020 auf 2021 um 10,7 % gesunken war. Unter den europäischen Ländern ging die Zahl der IVP-Embryonen im Jahr 2022 in den Niederlanden (-12,4 %) und im Vereinigten Königreich (-32,2 %) zurück, während sie in Deutschland (+6,4 %), Spanien (+109,4 %) und Frankreich (+8,7 %) stieg (Viana 2023).

Ovum Pick-Up (OPU) und IVP gilt somit als zuverlässige und kosteneffiziente Technik und nimmt eine wichtige Rolle in der Rinderzucht ein (Wrenzycki 2018).

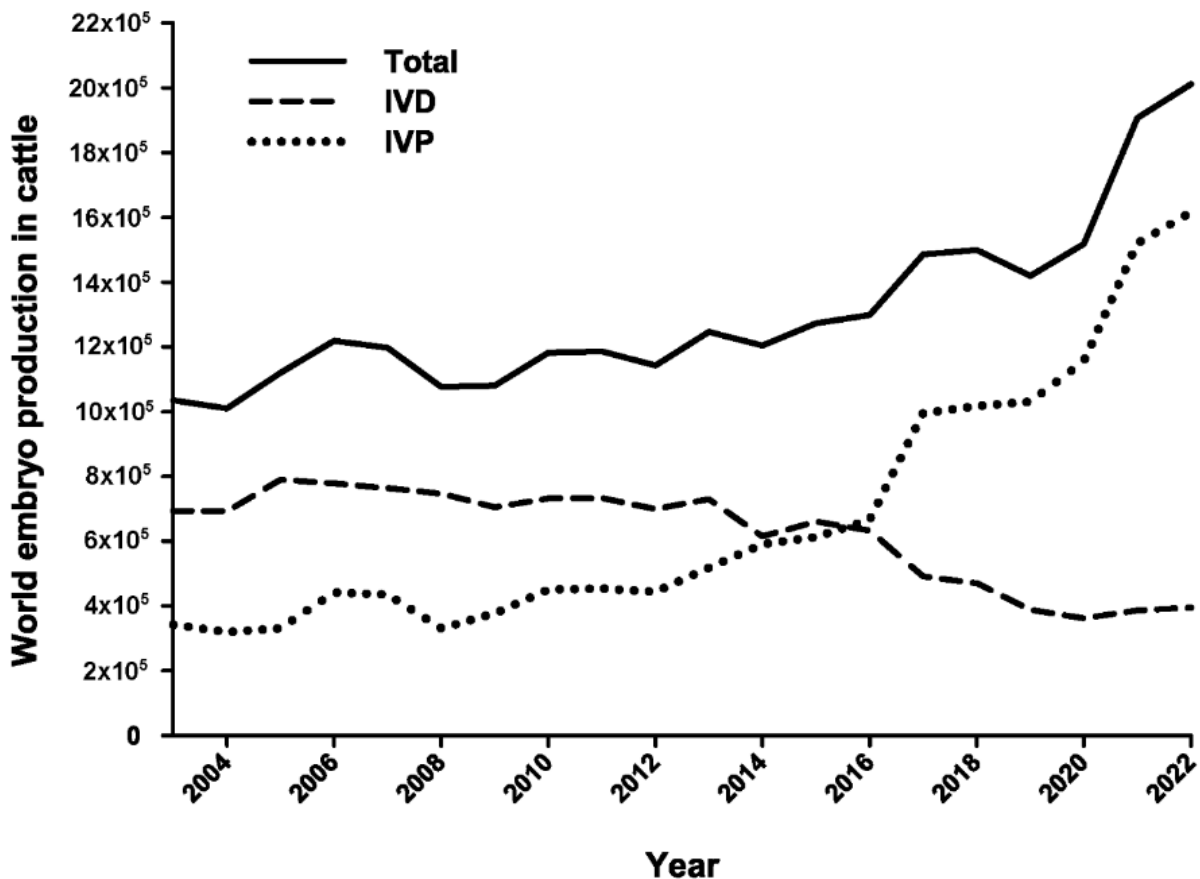


Abbildung 4: Anzahl boviner Embryonen von 2003 bis 2022 (Viana 2023)

2.4.1 Ovum Pick-Up (OPU)

Die transvaginale ultraschallgeleitete Punktion von Follikeln zur Gewinnung von Kumulus-Oozyten-Komplexen (KOK), auch Ovum Pick-Up (OPU) genannt, bietet die Möglichkeit wiederholbar unreife Oozyten für die In-vitro Produktion (IVP) von Embryonen zu gewinnen und stellt damit eine Alternative zum konventionellen Multiple Ovulation Embryo Transfer (MOET) dar (Pieterse et al. 1991a).

Literatur

Im Jahr 1988 zeigten Pieterse et al. erstmals, dass die wiederholte Entnahme boviner KOK während transvaginaler Ultraschalluntersuchung möglich ist. In der Regel werden hierbei alle Follikel mit einem Durchmesser zwischen drei und acht Millimeter aspiriert (Kapitel 12.2.1, Niemann und Wrenzycki 2018).

OPU ist eine verlässliche minimalinvasive Methode, die ursprünglich nur bei Kühen eingesetzt wurde, die nicht auf die Superovulation ansprechen, später wurden sie in größerem Umfang auch bei trächtigen Kühen und Färsen, einschließlich präpubertärer Färsen, eingesetzt (Galli et al. 2014). Eine hormonelle Stimulation des Spendertiers ist zwar möglich, aber nicht notwendig (Pieterse et al. 1991a; Galli et al. 2001). Zudem kann OPU einen therapeutischen Effekt auf unfruchtbare Spendertiere haben, insbesondere auf solche, die von Ovarialzysten betroffen sind (Galli et al. 2001).

Für die Entnahme von KOKs besteht keine Abhängigkeit von dem Zyklus des Spendertieres (Bungartz et al. 1995). Darüber hinaus kann OPU in verschiedenen Stadien des reproduktiven Lebens einer Kuh durchgeführt werden. Selbst eine Trächtigkeit schließt das OPU nicht aus, da KOKs auch in den ersten drei Monaten der Trächtigkeit erfolgreich entnommen werden können (Galli et al. 2001; Niemann und Wrenzycki 2018). Bei jungen Spendertieren liegt die Begrenzung v.a. in der Größe des Rektums und der Vagina. So können Holsteinfärsen bereits ab einem Alter von 6-8 Monaten als Spender dienen (Kapitel 10.4.3, Niemann und Wrenzycki 2018).

Die Entnahme der KOKs zweimal pro Woche ist das effektivste Protokoll, um KOKs ohne hormonelle Behandlung zu gewinnen (Galli et al. 2001, 2014; Merton et al. 2003). Die einmal wöchentliche Entnahme führt zur Gewinnung einer geringeren Anzahl an Oozyten, die zudem bereits eine Kumulusexpansion und Atresie durchlaufen haben können, was zu einer schlechteren Qualität der Oozyten führt. Das liegt daran, dass bei der zweimal wöchentlichen Entnahme, alle sichtbaren Follikel aspiriert werden und somit kein dominanter Follikel entstehen kann (Galli et al. 2001).

Die Erfolgsrate von OPU wird zunächst anhand der Wiederfindungsrate von Oozyten (Anzahl der KOKs pro 100 punktierte Follikel) quantifiziert (Bols et al. 1996).

Durch kontinuierliche technische Verbesserungen, wie z.B. die Ultraschalltechnologie, wurde die Bildauflösung, die Darstellung der Ovarialstrukturen und damit die Genauigkeit der Methode verbessert (Kapitel 10.3, Niemann und Wrenzycki 2018). So konnten Wiederfindungsraten von über 70 % ermöglicht werden (Galli et al. 2014). Zudem spielen viele andere Faktoren eine Rolle bei der erfolgreichen KOK-Gewinnung. Dazu zählen unter anderem die hormonelle Vorbehandlung, der Zyklusstatus, der Kanülendurchmesser, der Aspirationsdruck und die Erfahrung des Teams (Bols et al. 1996). Eine Analyse von 7.800 OPU-Sitzungen hat gezeigt, dass die KOK-Ausbeute vom Team und

insbesondere von der Person abhängt, die die Eierstöcke bearbeitet (Merton et al. 2003). Der Kanüledurchmesser und der Aspirationsdruck beeinflussen sich gegenseitig, weshalb meist die daraus resultierende Flussgeschwindigkeit herangezogen wird. Sie sollte ungefähr zwischen 20-25 mL/min liegen, um einen Kompromiss zwischen guter Wiederfindungsrate und gleichzeitig möglichst geringem Schaden an den KOKs zu erlangen (Galli et al. 2001). Zudem kann ein kürzerer Anschliff der Kanüle negative Effekte durch erhöhten Aspirationsdruck verringern, da die kürzeren Kanten ein geringeres Risiko für den KOK darstellt, die Kumuluszellen entlang der scharfen Kante zu verlieren (Bols et al. 1997).

2.4.1.1 Mögliche Auswirkungen des OPU auf Spendertiere

OPU kann mehrfach wiederholt werden, ohne die Fertilität des Spendertiers einzuschränken (Pieterse et al. 1991a). Trotzdem kann es zu Veränderung an den Ovarien kommen, wie z.B. zu Einblutungen der punktierten Follikel (Pieterse et al. 1988). Diese hämorrhagischen Herde organisieren sich allerdings recht schnell und hinterlassen keine bleibenden Schäden. Außerdem können eine Bildung von Narbengewebe und eine verhärtete Textur der Ovarien mit Verdickung der ovariellen Tunica albuginea auftreten. Allerdings gibt es keine Anzeichen einer Beeinträchtigung der Ovarfunktion, da keine Veränderungen an den Funktionsgebilden oder deren Anzahl zu finden sind (Petyim et al. 2000; McEvoy et al. 2002). Selbst eine zweimal wöchentliche Entnahme von KOKs über mehr als ein Jahr ist ohne Nebenwirkungen für das Spendertier möglich, weshalb keine Einflüsse auf folgende Trächtigkeiten zu erwarten sind (Galli et al. 2001).

Nach Follikelpunktionen können sich Gelbkörper-ähnliche Strukturen bilden, die kleiner sind als normale Gelbkörper und eine kürzere Lebensspanne und/oder luteal aktive Phase haben. OPU scheint den Brunstzyklus zu beeinflussen, indem es die Mechanismen der Follikelentwicklung und die endokrine Funktion verändert (Petyim et al. 2001). Jedoch setzt der normale Zyklus wenige Tage nach der letzten Punktion wieder ein (Petyim et al. 2000; Chastant-Maillard et al. 2003).

Während der Follikelpunktion kann es v.a. gegen Ende einer längeren Punktionsphase (vier Monate) zu einem Anstieg der Herzfrequenz und des Kortisolspiegels kommen, wobei sich beide Parameter zehn Minuten nach Abschluss des Verfahrens wieder normalisieren. Die stärkste Reaktion zeigen die Tiere auf die Epiduralanästhesie, mit einer Tendenz zu einer intensiveren Reaktion auch gegen Ende einer längeren Punktionsphase. Die Reaktion auf das Einführen des Geräts und die Punktion variiert bei den einzelnen Tieren unabhängig vom Zeitpunkt (Petyim et al. 2007). In einem weiteren Versuch konnte gezeigt werden, dass der Anstieg des Kortisolspiegels unabhängig davon ist, ob eine Follikelpunktion durchgeführt wird (Chastant-Maillard et al. 2003).

Bei der Epiduralanästhesie können Neovaskularisierungen und Knorpelmetaplasien der darunterliegenden Bandscheibe hervorgerufen werden, was auf Verletzungen durch die Kanüle zurückzuführen ist und zu einer Schwächung der betroffenen Bandscheibe führt. Durch korrekte Durchführung lässt sich dies vermieden (McEvoy et al. 2002).

2.5 Einflüsse von Aminosäuren auf die Oozyten- und Embryonenqualität

2.5.1 Einflüsse von pansengeschütztem Methionin (RPMet) auf die Embryonalentwicklung in vivo

Die frühe embryonale Nährstoffversorgung spielt eine wichtige Rolle für die weitere embryonale Entwicklung und kann Folgen bis ins Erwachsenenalter mit sich bringen. Ein Nährstoffmangel in der maternalen Ernährung kann sich beispielsweise prädisponierend für bestimmte Krankheiten auswirken. Bei Schafen und Menschen konnte gezeigt werden, dass eine perikonzeptionelle Restriktion von Vitamin B12, Folsäure und Methionin im physiologischen Bereich mit weitreichenden epigenetischen Veränderungen im Genom einhergehen kann. Bei erwachsenen Nachkommen äußert sich dies in einem erhöhten Risiko für Adipositas, Insulinresistenz, veränderter Immunfunktion und Bluthochdruck (Sinclair et al. 2007). An Proben der fetalen Leber von Schafen, welche an Tag 90 der Trächtigkeit entnommen wurden, wurden die epigenetischen Analysen vorgenommen. Dabei waren vier Prozent der 1.400 untersuchten CpG-Inseln bei zwei oder mehr Tieren, die die Diät erhielten, verändert ($P < 0,001$). Außerdem waren 88 % dieser veränderten CpG-Inseln unmethyliert oder hypomethyliert im Vergleich zu denen der Kontrolle. CpG-Inseln sind DNA-Abschnitte, die sich in der Nukleotidfolge Cytosin-Guanin häufig wiederholen und als Promotorregion dienen. Eine Methylierung des Promotors führt in der Regel dazu, dass ein Gen nicht mehr oder schwächer exprimiert wird. Diese Veränderungen sind auf die perikonzeptionelle Ernährung zurückzuführen, da die Embryonen an Tag 6 auf bedarfsdeckend gefütterte Empfängertiere übertragen wurden (Sinclair et al. 2007).

In Versuchen unter Durchführung der Multiple Ovulation Embryo Transfer (MOET)-Methode wurden bereits die Einflüsse von RPMet bei Holstein Kühen untersucht. Die Tiere wurden zunächst hormonell vorsynchronisiert und ungefähr 70 Tage postpartum superovuliert. Die Superovulation

erfolgte mit acht Injektionen von follikelstimulierendem Hormon (FSH) im Abstand von 12 Stunden. Sechseinhalb Tage nach der ersten Besamung wurden die Embryonen aus dem Uterus gespült. Bei den Wiederfindungsraten, den Entwicklungsstadien, der Zellzahl und der Qualität der Embryonen zeigten sich keine Unterschiede zu denen der Kontrollgruppe (Peñagaricano et al. 2013; Acosta et al. 2016). Stella et al. (2024) konnten jedoch bei Kühen, die mit RPMet gefüttert wurden, eine stärkere Reaktion auf die Superovulation nachweisen.

Eine Supplementierung der Ration mit RPMet hat bei pluriparen Holsteinkühen keinen Einfluss auf den Tag der ersten Ovulation und das Wachstum des ersten dominanten Follikels postpartum. Im ersten dominanten Follikel ist der Methioningehalt allerdings signifikant höher als in denen der Kontrollgruppe ($18,2 \pm 0,1 \mu\text{M}$ vs. $11,1 \pm 0,9 \mu\text{M}$; Acosta et al. 2017).

Außerdem kommt es zu erhöhten zytoplasmatischen Lipidgehalten bei den jeweiligen Embryonen, wenn die Kühe 30 Tage nach der Kalbung RPMet erhalten. Die Fütterung davor zeigt dabei keine signifikanten Effekte. Erhöhte Lipidgehalte in Embryonen können zum einen als Energiereserven angesehen und somit als positiv erachtet werden (Acosta et al. 2016), zum anderen erhöhen sie die Empfindlichkeit gegenüber kälteren Temperaturen und verringern dadurch die Chancen einer erfolgreichen Kryokonservierung (Nagashima et al. 1994; Acosta et al. 2016).

Insgesamt war die Expression von 72 % der signifikanten Gene in den Embryonen von Kühen, die mit Methionin-reicher Nahrung gefüttert wurden, verringert (Peñagaricano et al. 2013). Dies könnte an der erhöhten Menge an Methyl-Donoren, wie Methionin liegen, welche die DNA-Methylierung vieler embryonaler Gene erhöhen und dadurch meist die Genexpression unterdrücken (Van den Veyver 2002; Peñagaricano et al. 2013; Li und Zhang 2014).

Allerdings weisen Embryonen von Kühen, die nur die Kontrollration erhalten haben, eine größere Methylierung auf, als Embryonen von Kühen, die bis zum 30. Tag nach der Kalbung RPMet erhalten und danach nur noch die Kontrollration. Dies könnte bedeuten, dass die Ernährungsumstellung einen Einfluss auf S-Adenosylmethionin oder Homocystein hat, da sie hauptverantwortlich für die globale Methylierung der DNA zuständig sind (Acosta et al. 2016).

Unter den 30 signifikantesten Genen wurden nur zwei Gene durch die Supplementierung von Methionin stärker exprimiert. Eines der beiden Gene ist noch uncharakterisiert (LOC100849660) und das andere ist für die Synthese des Apolipoproteins L (LOC510193) zuständig (Peñagaricano et al. 2013). Apolipoproteine sind für den Transport und die Umverteilung von Lipiden verantwortlich. Dabei wirken sie z.B. als Liganden für Lipoproteinrezeptoren. Verschiedene Apolipoproteine scheinen die mizellare Struktur der Lipoproteine zu stabilisieren und sorgen in Verbindung mit Phospholipiden für eine hydrophile Oberfläche (Mahley et al. 1984). Durch intrauterine Infusionen

geringer Mengen von Interferon tau, welches normalerweise von Rinderblastozysten abgesondert wird und der Trächtigkeitserkennung dient, konnte die Apolipoproteinsekretion aus dem Endometriumepithel angeregt werden. Dies schafft ein entzündungshemmendes Umfeld, das den Weg für die Aufnahme des frühen Embryos im Uterus ebnet könnte (Rashid et al. 2022). Während der Oozytenreifung *in vitro* wirkt sich eine Zugabe von Apolipoproteinen jedoch negativ auf die frühe Embryonalentwicklung aus (Rincón et al. 2019).

2.5.2 Einflüsse von Methionin auf die Embryonalentwicklung *in vitro*

In einem *In-vitro*-Versuch ermittelten Bonilla et al. (2010) den extrazellulären Bedarf von Zygoten und Embryonen an Methionin im Kultivierungsmedium. Dabei war der Prozentsatz der Oozyten, die sich zu Blastozysten entwickelten, bei Embryonen ohne Methionin niedriger als bei denen der anderen Gruppen. Weder die Gesamtzellzahl noch die Apoptoserate oder die Verteilung der Zellen auf das Trophektoderm und die innere Zellmasse wurden durch die Methionin-Konzentration beeinflusst. Die Teilungsrate wurde ebenfalls nicht beeinflusst. Allerdings war der Anteil der Blastozysten, die am 7. Tag expandierten, schlüpften oder geschlüpft sind, bei niedrigeren Methionin-Konzentrationen (7 und 14 $\mu\text{mol/L}$) geringer (Bonilla et al. 2010).

Die DNA-Methylierung der Blastozysten-DNA wurde durch die Methioninkonzentration nicht beeinflusst. Bonilla et al. (2010) vermuten, dass das extrazelluläre Methionin für die DNA-Methylierung nicht limitierend ist, da der Bedarf an S-Adenosylmethionin über Reserven aus der Oozyte oder die Umwandlung von S-Adenosylhomocystein, Homocystein und Methionin gedeckt wird. Interessanterweise ist der intrazelluläre Glutathiongehalt bei Embryonen ohne extrazelluläres Methionin höher, obwohl Methionin als Vorläufer für Cystein dienen kann, welches wiederum für die Synthese von Glutathion benötigt wird (Martínez et al. 2017). Diese Beobachtung erklären sich Bonilla et al. (2010) damit, dass es vermeintlich zu einer verstärkten Oxidation von Glutathion kommt, da die Oxidation von Methionin zu reaktiven Methionin-Sauerstoffspezies führen kann (Schöneich 2005).

Die Einflüsse von Methionin während der Reifung wurden *in vitro* noch nicht untersucht. *In vivo* konnten hingegen die durchschnittlichen physiologischen Konzentrationen an Methionin bereits bestimmt werden. Sie liegen bei 32-49 $\mu\text{mol/L}$ in der Eileiterflüssigkeit, 31-46 $\mu\text{mol/L}$ in der Uterusflüssigkeit und 16-35 $\mu\text{mol/L}$ im Blutplasma (Hugentobler et al. 2007). Bei einer Fütterung mit niedrigem XP liegen die Plasmakonzentrationen bei ungefähr 21,6 $\mu\text{mol/L}$ (Piepenbrink et al. 1996). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Methionin-Bedarf zwischen 14 und 21 $\mu\text{mol/L}$ liegt.

Diese Konzentrationen sind niedriger oder vergleichbar mit denen im Reproduktionstrakt. Ein Mangel an Methionin im Uterus ist deswegen sehr unwahrscheinlich (Bonilla et al. 2010).

2.6 Massenspektrometrische Untersuchungen chemischer Verbindungen aus Oozyten und Embryonen

Vor der Etablierung der Massenspektrometrie wurden Oozyten und Embryonen mittels Gaschromatographie untersucht, wofür mindestens 10 bis 100 Oozyten oder Embryonen pro Analyse notwendig sind. Dies gilt als unpraktisch und liefert keinerlei individuelle chemische Informationen. Die Massenspektrometrie ermöglicht die Analyse einzelner Embryonen oder Oozyten und erlangt somit immer größere Bedeutung in diesem Gebiet (Ferreira et al. 2015).

2.6.1 Lipidanalysen von Oozyten und Embryonen

Lipide spielen eine wichtige Rolle als Bestandteil von Zellmembranen, Hormonen, bei der Energiespeicherung und als Mediator von zellulären Signalwegen (Wu et al. 2020).

Die umfassende Analyse von Lipidmolekülen, auch „Lipidomik“, dient zum Verständnis der Zellphysiologie und -pathologie. Lipide werden in acht Kategorien unterteilt (Fettsäuren, Glycerolipide, Glycerophospholipide, Sphingolipide, Sterolipide, Prenolipide, Saccharolipide und Polyketide), welche wiederum verschiedene Molekülklassen und Unterklassen enthalten (Fahy et al. 2005). Lipide werden definiert als hydrophobe oder amphipathische kleine Moleküle, die ganz oder teilweise durch Carbanion-basierte Kondensationen von Thioestern (Fettsäuren, Polyketide usw.) und/oder durch Carbokation-basierte Kondensationen von Isopren-Einheiten (Prenole, Sterole usw.) entstehen können (Fahy et al. 2005). Darüber hinaus wurden Lipide grob in "einfache" und "komplexe" Gruppen unterteilt, wobei einfache Lipide bei der Hydrolyse höchstens zwei Arten von Produkten (z. B. Fettsäuren, Sterole und Acylglycerine) und komplexe Lipide (z. B. Glycerophospholipide und Glycosphingolipide) drei oder mehr Produkte ergeben (Fahy et al. 2005). Oozyten von Säugetieren sind meist reich an Lipiden. Intrazelluläre Lipidtröpfchen, welche hauptsächlich aus Triacylglycerolen (TAG) bestehen, erscheinen unter dem Mikroskop dunkel. Während der Oozytenreifung und Embryonalentwicklung kommt es zu Veränderungen im Lipidprofil. Dazu gehört die Verstoffwechslung von TAGs v.a. während der Reifung und der Membranspezialisierung in Blastozysten durch komplexere Phospholipide (Ferreira et al. 2015).

Während des Follikelwachstums kommt es im Ooplasm zu einer Akkumulation von Lipidtröpfchen über die Bereitstellung aus der Follikelflüssigkeit. Zudem ist die Anreicherung von Phospholipiden und Cholesterin während der Oozytenreifung essenziell für die Bildung von Membranen (Prates et al. 2014).

Darüber hinaus wurde gezeigt, dass sich das Fettsäureprofil der Oozyten durch das Kultivierungsmedium oder die Supplementation von Lipiden verändert. Die vorherrschenden Fettsäuren während der Reifung sind Palmitinsäure (16:0) gefolgt von Stearinsäure (18:0; Prates et al. 2014).

Unabhängig von der Spezies zeigen sich in den Massenspektrometrie-Profilen der Oozyten und Embryonen grundlegende strukturelle Ähnlichkeiten der Lipide, wie z. B. der große Anteil von Phosphatidylcholin (34:1), was darauf hindeutet, dass dies ein wichtiger Bestandteil der Membrandoppelschicht ist (Ferreira et al. 2010, 2015).

2.6.2 Metabolomanalysen von Oozyten und Embryonen

Analysen des Metaboloms werden häufig nicht-invasiv über die Kultivierungsmedien vorgenommen. Dabei wird untersucht, welche Stoffe aufgrund von Stoffwechselprozessen der Oozyten oder Embryonen an das Medium abgegeben und aufgenommen werden. Dies wird auch als Sekretom bezeichnet (Nel-Themaat und Nagy 2011). Die intrinsische Kontrolle der Oogenese durch intrazelluläre Metabolite hat z.B. lange Zeit kaum Beachtung gefunden (Li et al. 2020). Dafür werden ganze Oozyten und Embryonen analysiert. Als Methode der Wahl gilt die Massenspektrometrie. Mittels Massenspektrometrie können ganze Embryonen, Oozyten, einzelne Zellen oder selbst subzelluläre Organellen analysiert werden. Sie weist eine hohe Genauigkeit auf und ermöglicht die Analyse von hunderten Metaboliten (Lombard-Banek et al. 2017).

In den letzten zehn Jahren wurde eine Vielzahl an unterschiedlichen Technologien der Massenspektrometrie entwickelt, die unter normalen Versuchsbedingungen (Umgebungstemperatur und -luftdruck) arbeiten können. Diese Methoden, die auch als „ambient ionisation“ Massenspektrometrie bezeichnet werden, eignen sich besonders für die Untersuchung kleiner Moleküle (Lombard-Banek et al. 2017).

Transkriptome und Proteome werden als Zwischenstufen in der Verarbeitung des Genoms betrachtet. Im Gegensatz dazu liegt das Metabolom näher am Phänotyp, da es das Endprodukt der Genexpression darstellt (Hayashi et al. 2011). Niedermolekulare Metabolite sind die Produkte von

Zellregulationsprozessen und geben daher Aufschluss über die Reaktion biologischer Systeme auf genetische, nährstoffbedingte oder umweltbedingte Einflüsse (Singh und Sinclair 2007). Die Untersuchung von Metaboliten birgt das Potenzial, molekulare Pfade der Zell- und Entwicklungsprozesse zu entdecken, welche nicht unbedingt auf der Ebene des Transkriptoms oder Proteoms nachweisbar sind. Allgemein können Veränderungen im Metabolom innerhalb von Sekunden auftreten und sich über weite Konzentrationsbereiche (z.B. millimolar bis nanomolar) erstrecken (Lombard-Banek et al. 2017).

2.6.3 Massenspektrometrie in Lipidomik und Metabolomik

Die Massenspektrometrie (MS) hat sich zu einem der leistungsfähigsten Hilfsmittel für die Identifizierung von Lipiden und Metaboliten entwickelt (Lombard-Banek et al. 2017; Wu et al. 2020). Dabei werden die entsprechenden Moleküle ionisiert, in die Gasphase überführt und durch ein elektrisches Feld als Ionen beschleunigt, um im Massenspektrometer nach ihrem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z) weiter getrennt zu werden (Wu et al. 2020). Bei jeder MS wird das m/z -Verhältnis mit der entsprechenden Häufigkeit der Moleküle gemessen, wodurch das Massenspektrum gebildet wird (Ferreira et al. 2015).

Massenspektrometer sind grundsätzlich unterteilt in Probenezufuhrsystem, Ionenquelle, Massenanalysator und Massendetektor (Wu et al. 2020).

Lipide kommen in Zellen nur selten in freier Form vor, sondern sind in den meisten Fällen in eine Matrix gebettet, weshalb eine Lipidextraktion wie z.B. nach Bligh und Dyer, welche besonders für die Isolierung von Lipiden aus Zellkulturen geeignet ist, notwendig ist (Wu et al. 2020). Je nach Extraktionsmethodik werden bestimmte Lipidgruppen bei ihrer Detektion bevorzugt, werden jedoch die Proben bei gleichen Bedingungen und mit derselben Methodik aufbereitet, lassen sich trotzdem aussagekräftige Ergebnisse generieren (De Lima et al. 2024).

Grundvoraussetzung für jede lipidomische Quantifizierung ist die Verwendung mindestens eines nicht endogenen internen Standards (IS) für jede zu quantifizierende Lipidunterklasse (Holčapek et al. 2018). Dabei sollte es sich möglichst um ein Analogon des Analyten handeln (Wang et al. 2017)

2.6.3.1 Ionenquelle: Elektrospray-Ionisation (ESI)

ESI ist aufgrund der Vielseitigkeit und der Kompatibilität mit der Flüssigchromatographie die beliebteste Form der Ionenquelle (Wu et al. 2020). ESI kann allerdings auch mit direkter Infusion der

Probe durchgeführt werden. Dies wird als Shotgun-Lipidomik bezeichnet, mit der verschiedene Lipidklassen aus komplexen biologischen Proben ohne vorherige chromatographische Trennung quantifiziert werden können (Ejsing et al. 2009).

Für ESI müssen die Proben in Form von Lösungen, bestehend aus flüchtigem Lösungsmittel und ionischen Analyten vorliegen. Diese werden bei Atmosphärendruck in die Gasphase überführt und ionisiert, was zur Isolierung der entstehenden Ionen führt und das schrittweise Einleiten der Ionen in das Hochvakuum des Massenanalysators ermöglicht (Gross 2013). Der sanfte Ionisierungsprozess schützt die chemischen Strukturen der ausgewählten Lipide vor Beeinträchtigungen oder Fragmentierungen (Ferreira et al. 2015; Wu et al. 2020). Daher eignet sich diese Methode gleichermaßen für die massenspektrometrische Analyse sowohl einfacher Fettsäuren als auch größerer Lipide wie Triacylglyceride (TAGs). Darüber hinaus bietet ESI eine der höchsten Ionisierungseffizienzen und ermöglicht den Nachweis von Lipiden in sehr geringer Konzentration (Wu et al. 2020).

ESI ist die einzige Ionisierungsquelle, der es durch selektive Ionisierung aufgrund unterschiedlicher Ladungseigenschaften gelingt, Lipidarten voneinander zu trennen (Han et al. 2006; Wu et al. 2020).

2.6.3.2 Massenanalysator: Triple Quadrupol (QqQ)

Nach dem Ionisierungsprozess werden die Ionen zur Trennung im Masseanalysator beschleunigt (Wu et al. 2020). In den Masseanalysatoren findet die Bestimmung der Masse-zu-Ladungsverhältnisse (m/z) der Ionen und die selektive Weiterleitung der Ionen an den Detektor statt, welcher die Intensität aufzeichnet (Ferreira et al. 2015).

Quadrupole gehören zu den Masseanalysatoren mit niedriger Auflösung, welche am weitesten verbreitet sind, da sie in der Regel preiswerter, robuster, kompakter und leichter zu bedienen sind (Ferreira et al. 2015).

Die Kombination mehrere Analysatoren (Tandem-Massenspektrometrie MS/MS) bietet die Möglichkeit eine Fragmentierung der Ionen zu induzieren (Wu et al. 2020). Bei dem Triple-Quadrupol sind drei Quadrupole linear hintereinandergeschaltet. Der erste Quadrupol bildet die erste Stufe der m/z -Analyse und selektiert die Vorläuferionen für die weitere Fragmentierung und Analyse. Der zweite Quadrupol hingegen dient rein als Stoßkammer und sorgt für die Fragmentierung der Ionen. Der dritte Quadrupol ist somit die zweite Stufe der m/z Analyse, in welcher die Produktionen selektiert und analysiert werden können (Gross 2013).

2.6.3.3 Massendetektor: Multiple reaction monitoring (MRM)

Im Prinzip gibt es fünf MS/MS-Scan-Modi. Zur Veranschaulichung werden eine festgelegte Masse (●), die variable bzw. gescannte Masse (○), spezifische (→) und nicht spezifische Verbindungen (-) dargestellt. Zu den Scan-Modi gehört die Erfassung des Datenbereichs (○-○), der Produktionenscan (●-○), der Vorläuferionenscan (○-●), der Neutralverlustscan (○→○) und der reaction-monitoring-Scan (●→●; Ferreira et al. 2015). In Abbildung 5 und Abbildung 6 werden vier Scan-Modi graphisch veranschaulicht.

Damit gilt für die MRM-Analyse, dass im ersten Quadrupol die Selektion und anschließend im zweiten Quadrupol die Fragmentierung des Vorläuferions stattfindet. Darauf folgt im dritten Quadrupol die Auswahl eines bestimmten Produktions, um dies zu analysieren (Ferreira et al. 2016).

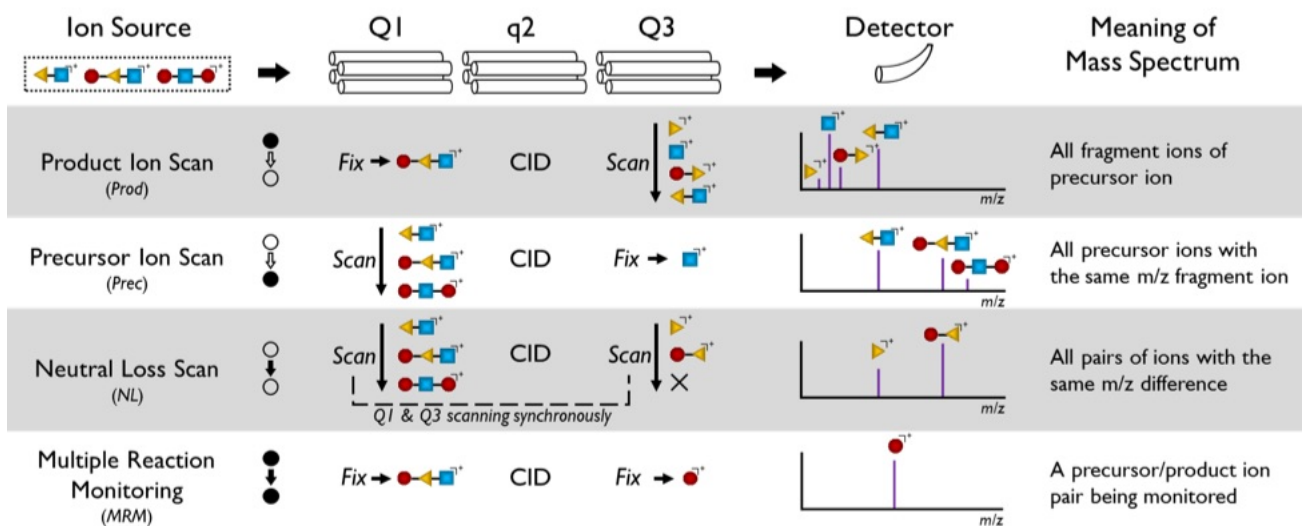


Abbildung 5: Vier Basisfunktionen eines Triple-Quadrupols

Produktionenscan (Prod), Vorläuferionenscan (Prec), Neutralverlustscan (NL) und Multiple Reaction Monitoring (MRM). Jeder Quadrupol kann entweder alle Ionen (Scan) oder nur ein bestimmtes Ion (Fix) scannen, mit der Ausnahme, dass im zweiten Quadrupol (q2) immer die Fragmentierung stattfindet. (Quelle: <https://aston.chem.purdue.edu/research/mrm.html>)

Mit freundlicher Genehmigung zur Verfügung gestellt von Christina Ramires Ferreira.

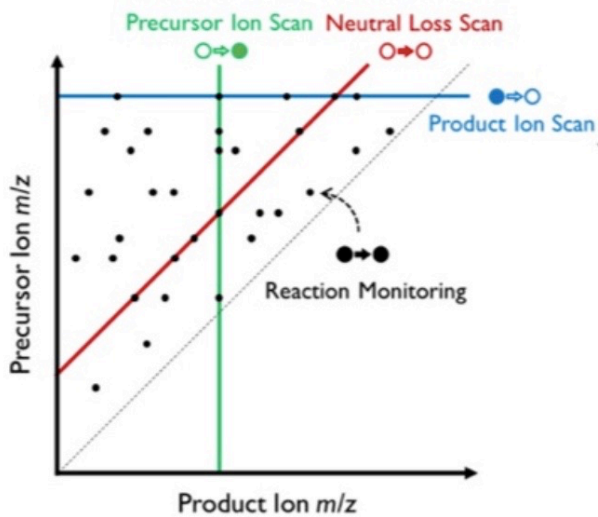


Abbildung 6: Graphische Darstellung der MS/MS-Scan-Modi
(Quelle: <https://aston.chem.purdue.edu/research/mrm.html>)

Mit freundlicher Genehmigung zur Verfügung gestellt von Christina Ramires Ferreira.

Vor einer MRM-Analyse ist eine Discovery-Phase notwendig, welche mittels Vorläuferionen- und Neutralverlustscans durchgeführt wird, um informative MRMs zu finden und diese für die Analyse auszuwählen (Cordeiro et al. 2017). Die Analyse der ausgewählten MRMs erfolgt anschließend wie bei Datenanalysen von vollständigen Massescanprofilen und gilt als chemisches Profil (de Lima et al. 2018).

Bei MRM-Analysen wird häufig kein interner Standard verwendet, der für eine absolute Quantifizierung nötig wäre. Durch Vergleiche mit Flüssigchromatographien (liquid chromatography; LC) mit anschließender MS/MS konnte allerdings gezeigt werden, dass eine relative Quantifizierung möglich ist (Franco et al. 2018; de Lima et al. 2018).

Für Oozyten und Embryonen ist die MRM-Analyse besonders geeignet, da trotz der kleinen Probenmengen die Möglichkeit besteht, eine große Zahl an Lipiden zu untersuchen, unter anderem auch, weil keine Chromatographie notwendig ist (de Lima et al. 2018).

Aufgrund der begrenzten Signaldauer (unter einer Minute) pro Injektion und Untersuchung können maximal 200 MRMs untersucht werden. Pro Untersuchung wird allerdings nur ein Teil der Probenlösung benötigt (de Lima et al. 2018).

Isomere werden bei dieser Untersuchung zusammengefasst, indem die Lipidklasse, die Anzahl der Alkylreste und der Doppelbindungen aufgeführt werden (De Lima 2018). Die Bestimmung der freien Fettsäuren basiert allein auf dem Vorläuferion und die Bestimmung der Triacylglycerine (TAG) auf den Neutralverlusten der veresterten Fettsäurereste. Da in Oozyten und Embryonen keine

Fettsäuren mit ungerader Anzahl an Kohlenstoffatomen vorkommen, fällt die Untersuchung dieser weg (de Lima et al. 2018).

2.6.3.4 Datenanalyse Massenspektrometrie

Bei der Massenspektrometrie gibt es vielfältige Möglichkeiten die gewonnenen Daten zu analysieren. Dazu gehören univariate Analysen, welche als einfach zu verwenden und zu verstehen gelten. Sie werden in der Metabolomik häufig verwendet, um wichtige Merkmale auszuwählen, nehmen allerdings keinen Bezug auf andere Variablen (Chong et al. 2019). Ein Beispiel dafür ist der t-Test oder die false discovery rate (FDR). Ein typisches Merkmal vollständiger Massescanprofile ist die große Menge an Informationen, die in jedem Datensatz enthalten ist. Multivariaten-Datenanalysen ermöglichen hierbei eine eingehendere und effizientere Erforschung und Interpretation chemischer Informationen (Ferreira et al. 2015). Ein Beispiel dafür ist die Hauptkomponentenanalyse (principal component analysis; PCA). Mit Hilfe der PCA wird der Informationsgehalt der Daten in wenige Hauptkomponenten (Linearkombinationen der ursprünglichen Variablen) verdichtet, um die größten Unterschiede der Proben in möglichst wenig Dimensionen darzustellen. Nicht korrelierende Variablen werden orthogonal dargestellt und beschreiben unabhängig Beiträge zu einem Teil der Varianz in den Daten (Ferreira et al. 2015). Die erste Hauptkomponente (PC1) zeigt die maximale Varianz. Die zweite Hauptkomponente (PC2) liegt in der Richtung der maximalen verbleibenden Varianz orthogonal zu PC1 und so weiter. Die Bedeutung jeder Variablen zur Definition einer bestimmten Hauptkomponente wird über Ladekoeffizienten angegeben (Ferreira et al. 2015).

Um unerwünschte Schwankungen der Signalintensität durch den Matrixeffekt, der aufgrund instrumenteller Variabilität oder anderer Interferenzen auftritt (González-Serrano et al. 2016), zu korrigieren, wird das gesamte Spektrum einem Normierungsprozess unterzogen. Sie werden auf den Gesamtionenstrom (TIC) normalisiert, indem alle Werte durch das Gesamtsignal der entsprechenden Probe dividiert werden (Deininger et al. 2011; Ferreira et al. 2015; Wulff und Mitchell 2018).

2.6.3.5 Multiple testing problem in der Massenspektrometrie

Bei Hypothesentests ist die Wahrscheinlichkeit eines Fehlers erster Art auf ein "akzeptables" Risiko begrenzt, das üblicherweise 0,05 entspricht. Probleme treten jedoch auf, wenn nicht nur ein einziger Hypothesentest durchgeführt wird, sondern eine große Anzahl, wie beispielsweise in der

Massenspektrometrie. Da jeder Test wiederum eine Wahrscheinlichkeit für einen Fehler erster Art (falsch positiv) hat, ist bei einer großen Anzahl von Hypothesentests das Vorhandensein von Fehlern erster Art in den Ergebnissen praktisch garantiert (Goeman und Solari 2014). Um dieses Problem, auch multiple testing problem genannt, zu umgehen, wird häufig die false discovery rate (FDR) herangezogen (Benjamini and Hochberg 1995; Green and Diggle 2007).

2.7 Gentranskripte präimplantatorischer Rinderembryonen

Etwa 10.000 Gene müssen in einer gut aufeinander abgestimmten Weise exprimiert werden, um eine embryonale und frühe fetale Entwicklung zu gewährleisten (Niemann und Wrenzycki 2000). Die Expression bestimmter Gene ist unterschiedlichen Regulationsmechanismen unterworfen. Dabei wird nach der Vorlage der DNA die dazugehörige mRNA synthetisiert, die wiederum als Bauplan für die Proteinbiosynthese dient.

Mit der Verbesserung des IVP-Systems für bovine Embryonen und der Verfügbarkeit der hochsensitiven reversen Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) stehen mehr Informationen über genetische Aktivitäten zur Verfügung, die es ermöglichen Transkriptionsmuster entwicklungsrelevanter Gene zu charakterisieren (Wrenzycki et al. 1998). Aufgrund der Nachweismöglichkeit seltener Gentranskripte und der semi-quantitativen Bestimmung dieser war die RT-PCR die Methode der Wahl zur Untersuchung einzelner Gene. Erst mit der Einführung der reversen-Transkriptase-quantitativen Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction; RT-qPCR) lässt sich die Amplifikation eines bestimmten cDNA-Moleküls in Echtzeit überwachen (Wrenzycki 2018).

2.7.1 Methionin Adenosyltransferasen 2A, 2B

Durch das Gen für die Methionin Adenosyltransferase (MAT) wird ein Protein synthetisiert, das für die Produktion von S-Adenosylmethionin (SAM) zuständig ist. Konkret überträgt die MAT eine Adenosylgruppe von Adenosintriphosphat (ATP) auf Methionin und erzeugt SAM und Triphosphat. Triphosphat wird anschließend zu Pyrophosphat und Phosphat gespalten. SAM ist ein universeller Methyl-Donor, der die Synthese von Phosphatidylcholin, das Aminosäuregleichgewicht, die Redox-

Abwehr und die Methylierung von DNA und Histonen unterstützt. Durch Methylierung lässt sich SAM zu S-Adenosylhomocystein umgewandelt (McFadden et al. 2020).

Exprimiert werden MAT in den meisten Geweben (Steele et al. 2005; McFadden et al. 2020), einschließlich Oozyten und Embryonen (Ikeda et al. 2010). Dies deutet darauf hin, dass Oozyten und Embryonen Methylierungsnährstoffe wie Methionin unter Umständen als Methylquelle für epigenetische Modifikationen nutzen (Ikeda et al. 2010).

In Zellkulturen konnte die Beeinflussbarkeit von MAT nachgewiesen werden. Hormone, Wachstumsfaktoren, unterschiedliche Sauerstoff- oder auch beispielsweise Methionin-Konzentrationen sind Faktoren, die die Genexpression regulieren können. Ein Mangel an Methionin kann beispielsweise die Expression von MAT2A erhöhen, während der SAM-Gehalt sinkt. Ein erhöhter Gehalt an SAM oder Methylthioadenosin vermindert die Expression MAT2A (Pajares and Markham 2011).

2.7.2 DNA-Methyltransferasen 1a, 3a

Die Familie der DNA-Methyltransferasen (DNMT) umfasst eine konservierte Gruppe von DNA-modifizierenden Enzymen, die eine zentrale Rolle bei der epigenetischen Genregulation spielen. Alle DNMTs verwenden SAM als Methylgruppendonator (Lyko 2018).

Die DNA-Methylierung ist möglicherweise entscheidend an der genetischen Prägung (Imprinting), X-Chromosom-Inaktivierung, Genomstabilität, Unterdrückung von Transkriptionsrauschen und Kontrolle gewebespezifischer Genexpression beteiligt (Bird und Wolffe 1999). Durch DNA-Methylierung wird die Expression der methylierten Gene entweder induziert oder vermindert (Barlow 1997). Diese Regulierung findet v.a. über die Methylierung von CpG (Cytosin-phosphatidyl-Guanin) - Inseln statt. Sie gelten als eine Art zelluläres Gedächtnis (Li und Zhang 2014). Während des gesamten Lebenszyklus unterliegt das Genom dynamischen Veränderungen der Methylierung. Nach der Fertilisation findet zuerst eine Demethylierung des paternalen und ab dem Zweizellstadium des maternalen Genoms statt. Darauf folgt eine De-novo-Methylierung, welche die Methylierungsmuster bis zum Blastozystenstadium wiederherstellt (Li und Zhang 2014). Jegliche Störungen des Methylierungsprozesses können zu Dysregulationen im Entwicklungsprozess führen (Wrenzycki und Niemann 2003) und letal sein (Li et al. 1992). Abnormal hohe Transkriptionsmengen an DNMTs stehen meist mit Methylierungsfehlern im Zusammenhang, welche auch in der De-novo Methylierung auftreten und nach der Zellteilung übernommen werden (Wrenzycki et al. 2001b). In

vivo generierte Embryonen weisen geringere DNMT-Transkriptionsgehalte als in vitro generierte auf (Wrenzycki et al. 2001b). Nachweisbar sind DNMTs während der gesamten Embryonalentwicklung boviner Embryonen (Golding und Westhusin 2003).

DNMT1 ist das am häufigsten untersuchte, am häufigsten vorkommende und eines der wichtigsten DNMT-Gene. Die Hauptaufgabe von DNMT1 ist es den Methylierungsstatus während der DNA-Replikation zu regulieren und zu erhalten (Wrenzycki et al. 2001b; Grohmann et al. 2005; Li und Zhang 2014). Dabei geht es vor allem um den Erhalt stark methylierter CpG-Inseln, indem hemimethylierte DNA-Stänge vervollständigt werden (Li und Zhang 2014). De-novo-Methylierungen führt sie kaum oder gar nicht aus (Chen und Li 2006). Beim Rind besitzt das Gen DNMT1 zwei Transkriptionsvarianten. Das längere Transkript wird als DNMT1A und die gespleißte Variante als DNMT1B bezeichnet (Russell und Betts 2008).

Im Gegensatz zu DNMT1 haben die Polypeptide von DNMT3A und DNMT3B keine Präferenz für hemimethylierte DNA und tragen dazu bei Methylierungsmuster während der Embryonalentwicklung mittels De-novo-Methylierung zu etablieren (Uysal et al. 2015).

2.7.3 Interferon tau (IFNT)

IFNT dient der maternalen Erkennung und Erhaltung der Trächtigkeit durch dessen antiluteolytischen Effekt. Die Hemmung des Oxytocinrezeptorgens verhindert die Freisetzung luteolytischer Stoffe wie PGF₂ α im Endometrium. Zudem werden Interferon-stimulierte Gene in den Endometriumszellen parakrin aktiviert, um die Implantation zu erleichtern. Bis zum 16. Tag der Trächtigkeit muss dieses Signal erfolgen (Roberts et al. 1992; Sánchez et al. 2018).

Mit der Expansion der Blastozyste und der gleichzeitigen Differenzierung des Tropheklasten beginnt dieser IFNT zu exprimieren. Ausschließlich das Tropheklasten ist in der Lage IFNT zu exprimieren (Hernandez-Ledezma et al. 1992). Das Entwicklungsstadium und die Qualität des Embryos beeinflussen dabei die Expression von IFNT (Hernandez-Ledezma et al. 1993). Eine frühe Erhöhung der IFNT-Expression wurde mit einer guten Qualität der Embryonen assoziiert (Hernandez-Ledezma et al. 1993). Sich früh entwickelnde Embryonen weisen allerdings einen geringeren Gehalt an IFNT auf und besitzen gleichzeitig eine höhere Entwicklungskompetenz (Kubisch et al. 1998). Unterstützt wird dies auch dadurch, dass in vitro generierte Embryonen eine höhere Expression an IFNT aufweisen als in vivo generierte, welche eine höhere Entwicklungskompetenz aufweisen (Wrenzycki et al. 2001a).

2.7.4 Heat shock protein 1 (HSPA1A)

HSPA1A gehört zu der Gruppe der Heat shock Proteine (HSP), welche zunächst in Zellen nachgewiesen wurden, die erhöhten Temperaturen ausgesetzt wurden (Levy 2001). Dabei stellte Ritossa (1962) ein Aufblähen der Speicheldrüsenchromosomen bei der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* fest, was 12 Jahre später mit der Genexpression von HSPs in Zusammenhang gebracht wurde (Neuer et al. 1999).

Alle untersuchten Organismen von prokaryotischen Bakterien bis zu Säugetieren reagieren auf Hitze mit einer Reduzierung der Synthese der meisten Proteine und steigern die Synthese weniger HSPs. Diese Art der zellulären Antwort hat sich in der Evolution kaum verändert, da die Aminosäuremuster der HSPs stark konserviert sind (Neuer et al. 1999).

HSPs besitzen zwei Hauptaufgaben. Zum einen wird ihre Expression durch eine Vielzahl an metabolischen Störfaktoren gesteigert, weshalb sie auch als Marker für zellulären Stress dienen (Welch 1992). Zum anderen fungieren HSPs als Chaperone, welche häufig als intrazelluläre Housekeeping-Proteine bezeichnet werden (Neuer et al. 1999; Levy 2001); d.h. sie unterstützen die richtige Faltung neusynthetisierter Proteine oder anderer Proteine, die ihre native Konformation verloren haben. Außerdem lösen Chaperone Proteinaggregate auf und leiten den Abbau beschädigter Peptide ein (Macario 2007).

HSPs werden nach ihrem Molekulargewicht eingeteilt und nicht nach ihrer Funktion (Neuer et al. 1999). HSPA1A wird aufgrund seines Molekulargewichts von 70 kDa auch HSP70 genannt. Es ist das am stärksten induzierte Stressprotein in der Gruppe der HSPs (Welch 1992).

Auch bei Embryonen wird durch Umweltfaktoren wie Hitzestress (Edwards et al. 1997; Kawarsky und King 2001) oder oxidativem Stress die Expression von Genen wie HSPs verstärkt (Wrenzycki et al. 2001a). Außerdem wird ihnen eine wesentliche Rolle beim Schutz vor Apoptose zugeschrieben (Neuer et al. 1999).

Die mRNA von HSPA1A ist während der gesamten Embryonalentwicklung nachweisbar (Wrenzycki et al. 1998; Kawarsky und King 2001). Schon ab dem Zweizellstadium sind die Embryonen in der Lage auf Hitzestress mittels erhöhter Bildung von HSPA1A zu reagieren (Lannett Edwards und Hansen 1996). Aufgrund dessen wird HSPA1A häufig als Indikator von Umweltstress verwendet (Wrenzycki et al. 1998, 1999; Russell et al. 2006).

3 MATERIAL UND METHODEN

Die verwendeten Medien und Chemikalien stammen, sofern im Text nicht anders angegeben, von der Firma Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) und sind im Anhang beschrieben.

3.1 Tiere

In einem Tierversuch (18_12_10_LUA_ATS_RF_G 18-20-073 - Aminokuh) auf dem Hofgut Neumühle (Lehr- und Versuchsanstalt für Viehhaltung, Münchweiler an der Alsenz, Deutschland) wurden 30 pluripare Holstein Kühe nach der Abkalbung zufällig in zwei Gruppen aufgeteilt. Zu der Versuchsgruppe (RPAA) gehörten 14 Kühe und zu der Kontrollgruppe (CON) 16 Kühe. Im Zeitraum der Oozytengewinnung befanden sich die Kühe in der zweiten bis maximal vierten Laktation. Die durchschnittliche Anzahl der Laktationen betrug in der Versuchsgruppe $2,64 \pm 0,84$ (Standardabweichung (SD)) und in der Kontrollgruppe $2,38 \pm 0,5$ (SD) Laktationen. Gehalten wurden die Tiere in einem Liegeboxenlaufstall mit Tiefboxen. Die Gewinnung der Kumulus-Oozyten-Komplexe (KOK) fand in dem Zeitraum vom 12.03.2019 bis zum 30.07.2019 statt. Dies erfolgte wöchentlich ab dem 40. Tag post partum mittels Ovum Pick-Up (OPU). Die Kühe wurden maximal achtmal und am Puktionstag in zufälliger Reihenfolge punktiert.

3.2 Rationen

Die Kühe erhielten zwei unterschiedliche Total-Mischrationen (TMR). Die erste TMR erhielten alle Tiere, also sowohl die Tiere der Versuchs- als auch die der Kontrollgruppe, während der Trockenperiode (bis zum Tag des Kalbens). Sie deckte den Bedarf an Nettoenergie und Rohprotein (XP) einer trockenstehenden Kuh mit einem Körpergewicht von 650 kg und einer angenommenen Trockenmasseaufnahme (DMI) von 12 kg pro Tag. Die zweite TMR wurde nach dem Kalben an die Kühe verfüttert. Diese deckte den Bedarf an Energie und XP für eine Milchleistung von 37 kg bei einem angenommenen DMI von 22,6 kg. Die Zusammensetzung der Rationen beider Gruppen ist in Tabelle 1 dargestellt und erfolgte nach bedarfsgerechter Versorgung an Rohprotein (XP), nutzbarem Rohprotein (nXP) und Netto-Energie-Laktation (NEL). Die Versuchsgruppe erhielt, bei gleichbleibendem Anteil an XP, zusätzlich die pansengeschützten Aminosäuren Methionin als Kemin Metasmart dry® (45 g pro Tag) und Lysin als LysiGEM® (40 g pro Tag). Die Berechnung der Netto-Energie-Laktation (NEL) und des Rohproteins (XP) der Futtermittel erfolgte nach Empfehlungen der

Gesellschaft für Ernährungsphysiologie der Haustiere (GfE 2001). Die Futterkomponenten wurden zweiwöchentlich beprobt und bei -20 °C für weitere Analysen gelagert.

Fünf Tage vor dem geschätzten Geburtstermin bis fünf Tage post partum wurden die Kühe getrennt von der Herde in strohbedeckten Abkalbeboxen gehalten. Die Futterraufnahme der einzelnen Kühe konnte während dieser Zeit nicht erfasst werden. Nachdem die Kühe in den Freilaufstall kamen, wurde die individuelle Futterraufnahme der Kühe durch ein elektronisches Fütterungssystem (Roughage Intake Control, Insentec B.V., Marknesse, Niederlande) aufgezeichnet.

Supplementierung von Methionin und Lysin

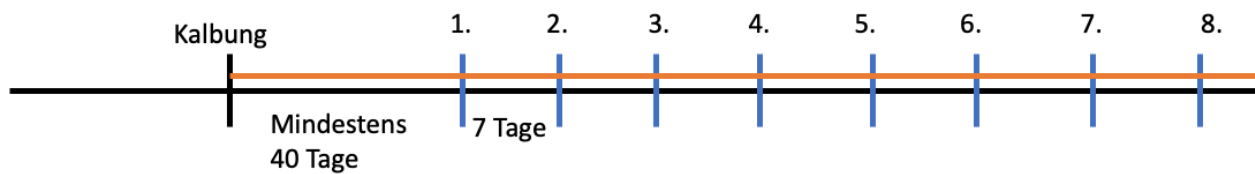


Abbildung 7: Versuchsschema mit acht OPU-Sitzungen

Tabelle 1: Futtermittelzusammensetzung

Parameter	-21 bis 0 Tage	-21 bis 0 Tage	1 bis 100 Tage	1 bis 100 Tage
	CON ●	RPAA ●	CON ●	RPAA ●
XP (g/kg TM)	140	140	160	160
nXP (g/kg TM)	140	140	160	160
RNB (g/kg TM)	0	0	0	0
NEL (MJ/kg TM)	6,3	6,3	7,0	7,0
Aminosäure-Zulage	--	--	--	Metasmart (45 g) + Lysin (40 g)

XP Rohprotein; nXP nutzbares Rohprotein; RNB ruminale Stickstoffbilanz; NEL Netto-Energie-Laktation

3.3 Gewinnung und Analyse der Milchleistungsdaten

Die Milchleistungsdaten wurden von der Lehr- und Versuchsanstalt für Viehhaltung, Hofgut Neumühle bereitgestellt. Zum Vergleich beider Gruppen erfolgte die Auswertung der Milchleistungen über die ersten 15 Wochen der Laktationen. Die Protein-, Fett- und

Harnstoffgehalte in der Milch wurden in unregelmäßigen Abständen bestimmt, aber zur Auswertung und Veranschaulichung in wöchentlichen Abständen dargestellt. Die Ergebnisse wurden in Excel (Version 16.73) mittels Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung geprüft und als arithmetischer Mittelwerte (\bar{x}) und Standardabweichung (SD) dargestellt. Es erfolgte ein gepaarter und ungepaarter T-Test. Als statistisch signifikant wurden Unterschiede mit einem $P \leq 0,05$ angesehen.

3.4 Technische Ausrüstung für die ultraschallgeleitete transvaginale Follikelpunktion

Für die ultraschallgeleitete transvaginale Follikelpunktion (engl. Ovum Pick-Up; OPU) ist eine umfangreiche technische Ausrüstung notwendig. In diesem Versuch wurde ein Ultraschallgerät (Logiq e, GE Healthcare GmbH, Solingen, Deutschland) mit dazugehöriger Mikrokonvex Sonde (GE 8C-RS, 3,5-10 MHz), ein Sondenträger aus PVC, eine Absaugpumpe mit integrierter Wärmeplatte (Aspirator 3, Labotect Labor-Technik-Göttingen GmbH, Rosdorf, Deutschland), ein Aluminiumwärmeblock (Labotect Labor-Technik-Göttingen GmbH, Rosdorf, Deutschland) zum Stabilisieren der Temperatur des Mediums sowie geeignete Kanülen zur Follikelpunktion genutzt. Zur Verwendung kamen 70 mm lange 20G Kanülen mit kurzem Anschliff (Terumo Europe N.V., Leuven, Belgien).



Abbildung 8: Sondenträger¹ mit Ultraschallsonde², Metallführstab³ und aufgesetzter Kanüle⁴

Wie in Abbildung 8 dargestellt, konnte durch den oberen Führungskanal des Sondenträgers die Kanüle mit Saugvorrichtung mithilfe eines Metallstabes eingeführt und wieder zurückgezogen werden. Am Ende des Metallstabs befand sich ein einschraubbarer Adapter, der die Befestigung des Schlauches und der Punktionskanüle ermöglichte (siehe Abbildung 9).

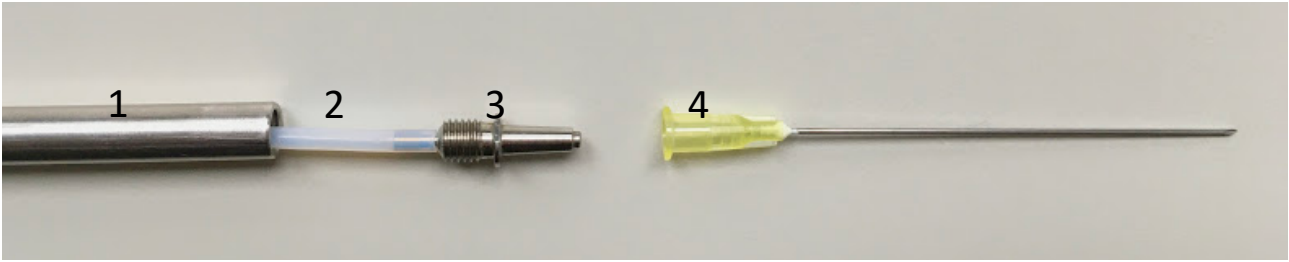


Abbildung 9: Metallstab¹, Adapter³ mit aufgesetztem PTFE-Schlauch² und Punktionskanüle⁴

Der Schlauch (Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) bestand aus Polytetrafluorethylen (PTFE) und besaß einen Innendurchmesser von 1,5 mm und eine Wandstärke von einem Millimeter. Dieser wurde durch einen Silikongummistopfen (Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) geführt, der ein 50 mL Falconröhrchen (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) verschloss. Um in diesem System einen Unterdruck zu generieren, erfolgte das Durchstechen des Silikongummistopfes mittels Kanüle (Sterican 1,2 x 40mm, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland), die durch Heidelberger Verlängerungen (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) an die Absaugpumpe angeschlossen wurde. Dies ist in Abbildung 10 dargestellt.

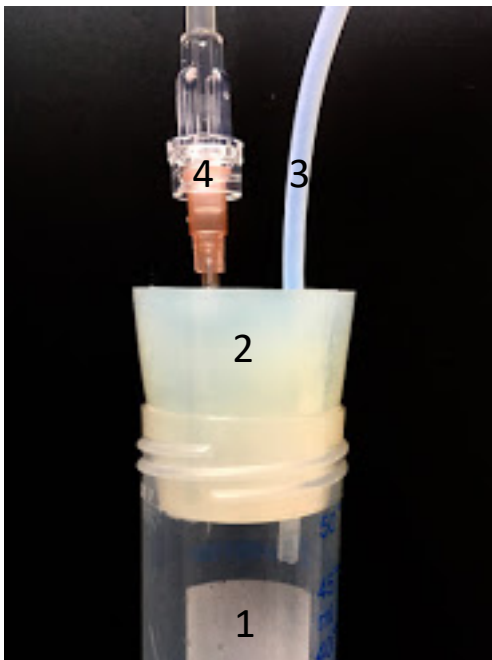


Abbildung 10: Falconröhrchen¹, Silikongummistopfen², Schlauch³ und Kanüle mit Heidelberger Verlängerung⁴

In den unteren Führungskanal wurde die Ultraschallsonde eingelegt. Bei dem Sondenträger handelte es sich um einen Eigenbau der Feinmechanik-Werkstatt des Instituts für Nutztiergenetik des Friedrich-Löffler-Instituts in Mariensee in Zusammenarbeit mit der Klinik für Rinder der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover. Um eine Follikelpunktion direkt im Stall zu ermöglichen, erfolgte

die Installation der technischen Ausrüstung wie in Abbildung 11 dargestellt auf einem rollbaren Tisch.



Abbildung 11: Rollbarer Tisch mit technischer Ausrüstung: Ultraschallgerät¹, Absaugpumpe² mit dazugehörigem Pedal³ und Wärmeblock⁴

3.5 Gewinnung der KOK mittels OPU

Für die Durchführung der transvaginalen, ultraschallgeleiteten Follikelpunktion erhielten die Kühe eine Epiduralanästhesie mit ca. 5 mL 2 %iger Procainhydrochlorid-Lösung (Procamidor®, WDT, Grabsen, Deutschland). Die Epiduralanästhesie erfolgte als eine kleine Sakral-Anästhesie zwischen Kreuzbein und erstem Schwanzwirbel bzw. zwischen erstem und zweitem Schwanzwirbel. Vor der Applikation des Lokalanästhetikums mittels Kanüle (Sterican 1,2 x 40mm, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) wurde die Injektionsstelle rasiert, gewaschen und desinfiziert (Spitacid™, Ecolab, Mohnheim am Rhein, Deutschland). Nach der Reinigung der Vulva und des

Material und Methoden

Perineums mittels Spitacid™ wurde der Sondenträger mit Punktionsgerät vaginal eingeführt. Daraufhin erfolgte eine transrektale Lagerung des jeweiligen Ovars vor den Ultraschallkopf. Follikel, die größer als 2 mm waren, wurden durch das Vaginaldach unter Ultraschallkontrolle punktiert. Als Spülflüssigkeit diente 37 °C warme PBS-Lösung mit 1 % FBS (Fetal Bovine Serum, GIBCO, Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA) und 11,2 mg Heparin (\pm 4 I.E.) pro Liter. Die Pumpe erzeugte einen Unterdruck von \approx 90 mmHg, wodurch sich die KOK samt Follikelflüssigkeit in ein 50 mL-Falconröhrchen aspirieren ließen. Der Wärmeblock, der durch die Absaugpumpe mit integrierter Wärmeplatte auf 37 °C erhitzt wurde, diente der Warmhaltung der Falconröhrchen. In Abbildung 12, Abbildung 13 und Abbildung 14 ist zu sehen, wie die KOK-Gewinnung im Stall stattfand.



Abbildung 12: Gewinnung der KOKs mittels OPU



Abbildung 13: Ultraschallbild während des OPU



Abbildung 14: Gewinnung der KOK mittels OPU unter Praxisbedingungen

3.6 In-vitro-Produktion (IVP)

Die In-vitro-Produktion (IVP) besteht aus der In-vitro-Maturation (IVM), In-vitro-Fertilisation (IVF) und In-vitro-Kultivierung (IVC).

3.6.1 In-vitro-Maturation (IVM)

Die Follikelflüssigkeit wurde durch ein Sieb (Retsch, Haan, Deutschland) mit einer Maschenweite von 75 μm gegeben, um die KOK von der Follikelflüssigkeit und anderen kleineren Bestandteilen zu trennen. Mithilfe von PBS-Lösung ließen sich die KOK in eine Petrischale ($\phi 60$ mm, Greiner Bio one

GmbH, Kretschmünster, Österreich) spülen. Die KOK wurden unter einem Stereomikroskop (Olympus, Hamburg, Deutschland) mit Heiztisch (180 x 180 mm, Minitüb, Tiefenbach, Deutschland) herausgesucht und mit einem Pipettierhelfer (micro-classic, Brand, Wertheim, Deutschland) und dazugehöriger 20 µL-Glaspipette (Blaubrand intraMARK, Brand, Wertheim, Deutschland) durch drei vorgewärmte Waschtropfen (100 µL Tropfen aus Tissue Culture Medium (TCM) air) pipettiert. Diese wurden auf Heizplatten warmgehalten. Die Reifung der KOK erfolgte in 250 µL Reifungsmedium in einem 0,5 mL Reagiergefäß (SafeSeal micro tube, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland), das zusätzlich mit Parafilm® verschlossen wurde. Als Reifungsmedium dienten 975 µL TCMAir kombiniert mit 25 µL Suigonan® (MSD, Haar, Deutschland); bestehend aus Pregnant Mare Serum Gonadotropin (PMSG, 10 I.E.) und Choriongonadotropin (hCG, 5 I.E.). Die Reifung erfolgte für 24 Stunden in einem Wärmeschrank (UN 30, Memmert, Schwabach, Deutschland) bei 39 °C. In Abbildung 15 sind die dafür verwendeten Laborgeräte zu sehen.

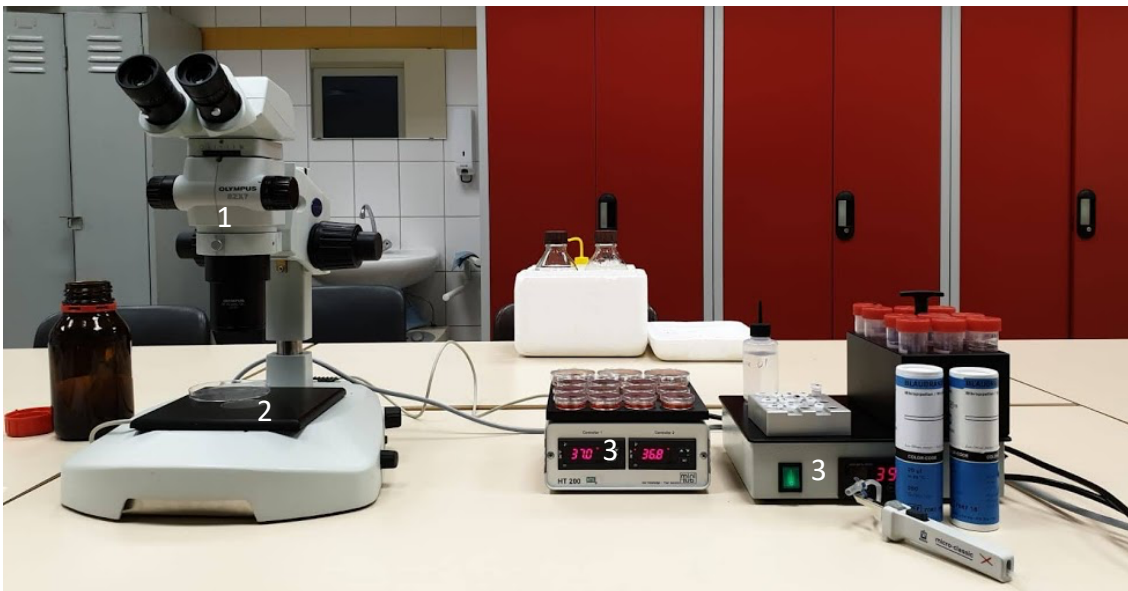


Abbildung 15: Mikroskop¹ mit aufliegendem Heiztisch² und Steuergeräte mit eingebauter Heizplatte³

3.6.2 In-vitro-Fertilisation (IVF)

Für die In-vitro-Fertilisation wurde eine Paillette mit tiefgefrorenem Sperm für 10 Sekunden in 37 °C warmem Wasser aufgetaut, die Flüssigkeit in ein Reagiergefäß mit 675 µL SpermFilter® (Gynotec B.V., Malden, Niederlande) und 75 µL Fert.-TALP-Gebrauchslösung gegeben und 16 Minuten bei 380 x g in eine Zentrifuge (Minispin® plus, Eppendorf, Hamburg Deutschland) gestellt. Der Überstand

wurde bis auf ca. 50 μL abpipettiert, mit 750 μL Fert.-TALP-Gebrauchslösung aufgefüllt und anschließend erneut für 3 Minuten bei 380 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder auf 50 μL abpipettiert und mit 750 μL Fert.-TALP-Gebrauchslösung aufgefüllt. Diese enthielt, um die Kapazitation der Spermien zu induzieren, Hypotaurin, Heparin und Epinephrin (HHE; 0,1 IE/ml Heparin, 10 μM Hypotaurin und 1 μM Epinephrin). Es folgte eine Zentrifugation für 3 min bei 380 x g. Danach wurde der Überstand bis auf ca. 100 μL abpipettiert und die Flüssigkeit im offenen Reagiergefäß im Brutschrank bei 39 °C und 5 % CO_2 aufbewahrt. Um das Volumen der benötigten Spermiesuspension (Soll-Dichte: 10^6 Spermien/mL) zu berechnen, erfolgte eine Spermiedichtebestimmung mittels Thoma-Zählkammer (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland). Die KOK wurden davor unter einem Stereomikroskop (SZX7 Olympus, Hamburg, Deutschland) mit beheizbarem Tisch (Gynemed, Lensahn, Deutschland) durch drei Fert.-TALP-Tropfen gewaschen und in 100 μL HHE-Tropfen in eine Petrischale (\varnothing 35 mm) pipettiert. Die Tropfen wurden vorher mit Silikonöl (DC 200, Serva, Heidelberg, Deutschland) bedeckt und in einem Brutschrank (Heracell 150i, Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA) bei 39 °C mit 5 % CO_2 und feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre äquilibriert.

3.6.3 In-vitro-Kultivierung (IVC)

Achtzehn Stunden nach Zugabe der Spermien erfolgte die Denudierung der vermeintlichen Zygoten durch vierminütiges Vortexen in einem Reagiergefäß mit 37 °C warmem TCMair. Anschließend wurden diese in drei Waschtropfen (80 μL) SOF-Kultivierungsmedium mit bovinem Serumalbumin (BSA; 4 mg/1 mL SOFaa) unter Silikonöl gewaschen und zu je 5-7 Zygoten pro Kulturtropfen (30 μL) unter Öl in eine Petrischale (\varnothing 35 mm) gesetzt. In einem Brutschrank mit 5 % CO_2 , 5 % O_2 , 90 % N_2 bei 39 °C und feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre erfolgte die Kultivierung.

An Tag 7 (Tag 0 = IVF) und Tag 8 wurde unter einem Stereomikroskop die Teilungs- und Entwicklungsrate der Embryonen beurteilt. Die Teilungsrate berechnete sich aus dem Anteil der geteilten Embryonen zu den kultivierten vermeintlichen Zygoten pro Gruppe. Die Entwicklungsrate ergab sich hingegen aus dem Anteil an Morulae, Blastozysten, expandierten Blastozysten (siehe Abbildung 16), schlüpfenden und geschlüpften Blastozysten an der Gesamtzahl der kultivierten vermeintlichen Zygoten pro Gruppe.

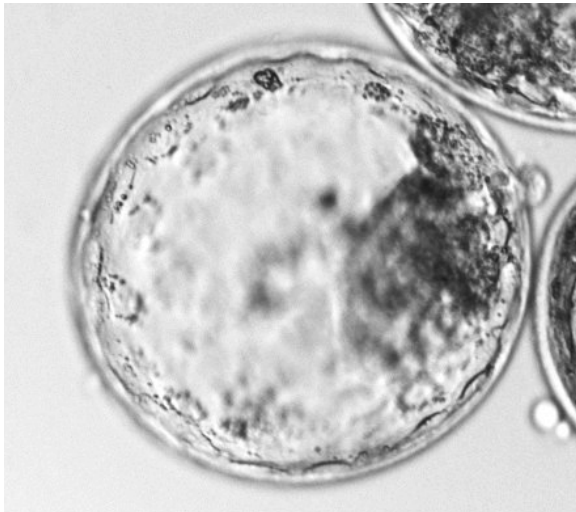


Abbildung 16: Expandierte Blastozyste

3.7 IVP boviner Embryonen aus Ovarien geschlachteter Kühe

Die IVP von Embryonen aus Ovarien geschlachteter Kühe diente als Laborkontrolle im Vergleich zu den Embryonen, die aus mittel OPU gewonnenen Oozyten erzeugt wurden.

3.7.1 Herkunft der Ovarien

An dem Schlachthof, Fleischmarkt Olpe (Olpe, Deutschland), erfolgte die Entnahme der Ovarien adulter, geschlechts gesunder Kühe direkt nach der Schlachtung. In 37 °C warmer PBS-Lösung wurden die Ovarien in einem Thermobehälter innerhalb von maximal vier Stunden in das IVP-Labor nach Gießen transportiert.

3.7.2 Gewinnung der Kumulus-Oozyten-Komplexe (KOK)

Zunächst erfolgte das Waschen der Ovarien mit einem Liter 37 °C warmer, 0,9 %iger Natriumchlorid-Lösung, welche zusätzlich 0,1 g Streptomycin und 0,06 g Penicillin enthielt. Anschließend fand in einer Glaspetrischale (\varnothing 150 mm) mittels Slicing-Methode (Eckert und Niemann 1995) die Isolierung der KOK statt. Für diese Methode wurden in einem Block zehn Kürschnerklingen in einem Abstand von zwei bis drei Millimetern aneinandergeschraubt. Die Fixierung der Ovarien erfolgte mit einer Arterienklemme, um die Follikel in 100 ml PBS-Lösung mit den „Slicern“ zu eröffnen, sodass die

Follikelflüssigkeit mit den KOK heraus gespült werden konnte. Mit einem herkömmlichen Sieb erfolgte anschließend das Abfangen grober Gewebestücke. Petrischale und Sieb wurden danach mit PBS-Lösung ausgespült. Das weitere Vorgehen entspricht, bis auf kleine Unterschiede in der Maturation, dem in Kapitel 3.5. beschriebenen Vorgehen. In diesem Fall wurden 20 KOK pro Reifungstropfen in 100 µL TCM199, unter Silikonöl in einer Petrischale (ø 35mm) inkubiert. Zudem erfolgte die Inkubation bei 39 °C, 5 % CO₂ und feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre in einem Brutschrank (Heracell 150i, Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA).

3.8 Blutuntersuchungen

3.8.1 Gewinnung, Aufbereitung und Archivierung der Serum- und Plasmaproben

Im Anschluss an das OPU erfolgte die Blutentnahme aus der Schwanzvene der jeweiligen Milchkühe. Von jedem Versuchstier wurde jeweils eine Probe für die Serum- und eine Probe für die Plasmauntersuchung entnommen. Die Serumröhrchen (S-Monovette® 9 mL Z, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) mussten im Gegensatz zu den Plasmaröhrchen (S-Monovette® 9 mL LH, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) über eine Stunde bei 4 °C aufrecht gelagert werden, damit diese komplett gerinnen konnten. Zur Gewinnung des Serums und des Plasmas wurden die Röhrchen 10 Minuten bei 2000 x g zentrifugiert. Anschließend erfolgte das Abpipettieren und Einfrieren des Überstandes bei -20 °C. Insgesamt wurden 50 Blutproben von 16 Kühen (jeweils 8 Kühe pro Gruppe) entnommen. Davon waren 22 Blutproben aus der Versuchsgruppe und 28 aus der Kontrollgruppe.

3.8.2 Bestimmung der Aminosäurekonzentration im Plasma

Die Bestimmung der Amminosäurekonzentration im Plasma wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Eder aus dem Institut für Tierernährung und Ernährungsphysiologie der JLU Gießen durchgeführt.

3.8.2.1 Aufbereitung

Zunächst erfolgte eine Eiweißfällung durch eine Vermischung von 200 µL aufgetautem Plasma mit 200 µL Sulfosalicylsäure (10 %ig; 5965-83-3; mit entionisiertem Wasser verdünnt) in einem 1,5 mL Reagiergefäß (SafeSeal Reagiergefäß, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland). Anschließend wurden 20 µL Norleucin (2099 µM, N6877) als interner Standard hinzugegeben. Der interne Standard diente zur Berechnung der Aminosäurekonzentrationen. Es erfolgte eine erneute Vermischung und eine Inkubation für eine Stunde bei 4 °C zur vollständigen Präzipitation. Um ausgefallene Proteine und größeren Bestandteile zu entfernen, schloss sich eine Zentrifugation (Fresco 21 Mikrozentrifuge, Fischer Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland) mit 21,1 x g, über 10 min bei 4 °C an. Zur Abtrennung kleinerer Bestandteile wurde der Überstand auf einen Zentrifugationsfilter (Centrifuge tube filters, Costar® Spin-X®) gegeben. Die Zentrifugation erfolgte mit 16,1 x g für 5 min bei 4 °C. Danach wurden mindestens 100 µL der Probe in ein Mikroliter-Probengefäß aus Kunststoff (Art. Nr. 6.021.233, Laborbedarf Onken GmbH, Gründau, Deutschland) gegeben, das mittels Septum-Deckel (Art. Nr. 6.021.233, Laborbedarf Onken GmbH, Gründau, Deutschland) verschlossen wurde. Die Messungen erfolgten mit 50 µL der einzelnen Proben.

Zur Kalibrierung wurde eine Aminosäure-Eichlösung mit einer Konzentration von 25 µM angesetzt. Hierzu wurde eine 1:20 Verdünnung einer Aminosäure-Standard-Lösung (500 µM, A-9906) hergestellt, indem 50 µL dieses Standards mit 1950 µL Probenverdünnungspuffer (pH = 2,2; Art. Nr. 80-2083-10; Laborbedarf Onken GmbH, Gründau, Deutschland) versehen wurde. Diese Kalibrierlösung wurde analog zu den Proben behandelt und bei -20 °C eingefroren. Über die Messungen der Eichlösungen ließen sich die Responsfaktoren der einzelnen Aminosäuren berechnen. Diese geben an, wie sich das photometrische Signal der Aminosäurederivate im Vergleich zum Signal des Norleucin-Derivats (Interner Standard) verhält.

3.8.2.2 Aminosäurenanalysator (AAA)

Untersucht wurden die Plasma-Proben mit einem Aminosäurenanalysator (Biochrom 30+, Biochrom Ltd., Cambridge, UK). Dabei erfolgte die chromatographische Auftrennung der freien Aminosäuren auf einem Kationenaustauscherharz. Um die Bindung der Aminosäuren auf dem Harz zu erreichen, mussten diese in protonierter Form als NH_3^+ -Ion vorliegen. Dies erfolgte bei einem pH-Wert von 2,2, da dieser unter dem pK_s -Wert der „sauersten“ Aminosäure lag. Die Elution und Auftrennung der Aminosäuren wurde über einen pH- und Konzentrationsgradienten mit fünf verschiedenen Lithiumcitratpuffern (80-2038-15, 80-2038-16, 80-2099-83, 80-2097-18, 80-2037-69; Laborbedarf Onken GmbH, Gründau, Deutschland) und einem Temperaturgradienten von 35 bis 85 °C erreicht.

Der Auftrennung der Aminosäuren über die Säule folgte eine Nachsäulenderivatisierung mittels Ninhydrin (80-6000-13, Laborbedarf Onken GmbH, Gründau, Deutschland) in einem Reaktor bei 120 °C. Die photometrische Messung der blau-violett gefärbten Aminosäurederivate (Ruhemanns-Purpur) wurde bei 570 nm vorgenommen. Mit einer Fließgeschwindigkeit der Puffer von 20 mL/h und Förderung von Ninhydrin mit 20 mL/h betrug die Gesamtlaufzeit einer Analyse inklusive Konditionierung 181 min. mit dem AAA.

3.8.2.3 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse wurden in Excel (Version 16.73) mittels Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung geprüft und als arithmetische Mittelwerte (\bar{x}) mit der Standardabweichung (SD) dargestellt. Es erfolgte ein einfacher T-Test. Als statistisch signifikant wurden Unterschiede mit einem $P \leq 0,05$ angesehen.

3.9 Massenspektrometrie

Die massenspektrometrische Untersuchung wurde von Christina Ramires Ferreira am Bindley Bioscience Center der Purdue University durchgeführt.

Ziel der Untersuchung war es mögliche Unterschiede im Lipidmuster und dem Metabolom darzustellen. Dafür wurden unreife Oozyten (unmittelbar nach der Gewinnung), reife Oozyten (nach 24 Stunden IVM) und expandierte Blastozysten (Tag 7 oder 8) von der Versuchs- und Kontrollgruppe aufbereitet. Eine Probe bestand aus 4 unreifen/reifen Oozyten, da einzelne Oozyten zu geringe Metabolit- und Lipidgehalte für diese Untersuchung aufweisen. Die expandierten Blastozysten ließen sich einzeln untersuchen.

3.9.1 Aufbereitung für die Massenspektrometrie

Zunächst erfolgte das Entfernen der Kumuluszellen von den unreifen und reifen Oozyten. Dafür wurden die Oozyten 30 Sekunden in Hyaluronidasemedium (GM501 Hyaluronidase, Gynemed, Deutschland), mit 80 IU/mL Hyaluronidase in HEPES-gepuffertem Medium mit 4 g/L hSA (Human Serum Albumin) inkubiert und anschließend 3 Minuten gevortext. Um alle Kumuluszellen zu

entfernen, wurden die Oozyten mehrfach mit einem Stripper (EZ-Grip, Research Instruments Ltd, Falmouth, UK) aufgezogen. Die dazugehörigen Spitzen (EZ-TIP, Research Instruments Ltd, Cornwall, UK) hatten einen Durchmesser von 135 μm .

Die Proben wurden anschließend in einem Methanol/Wasser (1/3) -Gemisch gewaschen und bei -80 °C in 0,5 mL Reagiergefäßen (SafeSeal micro tube, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) tiefgefroren.

Daraufhin erfolgte eine modifizierte Lipidextraktion nach Bligh und Dyer (1959): Zur Induzierung der Zelllysis wurde 40 μL Ampuwa® (Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland) zu der Probe pipettiert. Zudem wurden 90 μL Methanol und 50 μL Chloroform hinzugefügt und alles mithilfe einer Pipette 15 Sekunden gemischt, sodass eine einphasige Lösung entstand. Das Methanol wurde zuvor mit 2,5 mg BHT (2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol) auf 50 mL zur Verhinderung der Lipidperoxidation versetzt. Es folgte eine 15-minütige Inkubation bei 4 °C. Nach Zugabe von 50 μL Chloroform und 50 μL Ampuwa® erfolgte eine Zentrifugation bei 800 x g für 5 Minuten, um die Separierung der polaren von der nicht polaren Phase zu verstärken. Zwischen beiden Phasen befanden sich ausgefällte Proteine. Diese wurden zurückgelassen, indem von beiden Phasen jeweils 80 μL in ein neues Reagiergefäß pipettiert wurden. In einem Evaporator (MicroDancer Infrared Evaporation System, Zinsser Analytic, Frankfurt am Main, Deutschland) erfolgte die Trocknung der Proben bei ca. 30 °C. Bis zur Durchführung der Massenspektrometrie wurden die Proben mit Parafilm luftdicht verschlossen, vakuumiert und bei -80 °C gelagert.

3.9.2 Multiple Reaction Monitoring (MRM)

Untersucht wurden 72 Proben. Das entspricht 12 Proben aus jeder der 6 Gruppen. Diese Gruppen sind expandierten Blastozysten, unreifen und reifen Oozyten, jeweils aus der Versuchs- (RPAA) und Kontrollgruppe (CON). Aufgrund zweier Kontaminationen und gleichartig veränderter Untersuchungsergebnisse, welche auf eine zu hohe Temperatur bei der Evaporation zurückzuführen waren, folgte der Ausschluss der ersten sechs Proben. Dies betraf jeweils eine Probe pro Gruppe. Bei 7 der 11 Proben jeder Gruppe fand eine Lipidanalyse statt, in der in 2 unterschiedlichen Injektionen (M1 und M2) auf 368 MRMs (siehe Anhang 9.6.1 und 9.6.2) untersucht wurde. Aufgrund der vielen zu untersuchenden MRMs mussten zwei Injektionen durchgeführt werden. Für die Lipidanalyse erfolgte eine Verdünnung der getrockneten Lipidextrakte der jeweiligen Proben mit 25 μL der Injektionslösung [Acetonitril (ACN)/Methanol/Ammoniumacetat 300 mM bei 3:6,65:0,35

(v/v)]. Davon wurden 8 μL durch einen Mikro-Autosampler (G1377A) mit einem QQQ6410 Triple-Quadrupole Massenspektrometer (Agilent Technologies, San Jose, CA, USA), ausgestattet mit einer Jetstream ESI-Ionenquelle, im positiven Ionen-Modus untersucht. Zwischen den Injektionen erfolgte eine Spülung mit ACN + 0.1% Ameisensäure. Die an den Autosampler angeschlossene Kapillarpumpe arbeitete mit einem Fluss von 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ und einem Druck von 150 bar. Die Kapillarspannung am Gerät betrug 3,5-5 kV und der Gasfluss 5,1 L/min bei 300 °C.

Mit den restlichen 4 Proben fand eine Metabolomanalyse statt. Hier wurden alle Proben in 4 unterschiedlichen Injektionen (Met 1-4) auf 717 MRMs (siehe Anhang 9.6.3, 9.6.4, 9.6.5 und 9.6.6) untersucht. Die Zuordnung dieser MRMs zu den dazugehörigen Metaboliten muss vorsichtig bzw. vorläufig betrachtet werden, da die Untersuchung der Metaboliten in dieser Form noch nicht durchgeführt wurde. Da es sich um kleinere Moleküle handelt, kann ein MRM hierbei für mehrere Metaboliten stehen, was die genaue Zuordnung erschweren kann.

Die Rohdaten der Massenspektrometrie wurden mithilfe eines hauseigenen Skripts mit MRM-Übergängen (siehe Anhang 9.6) und den entsprechenden Ionenintensitätswerten verarbeitet und in Microsoft Excel (2019, Version 16.0) exportiert.

3.9.3 MetaboAnalyst

Die statistische Analyse wurde mithilfe von MetaboAnalyst 5.0 (www.metaboanalyst.ca, Xia Lab, McGill University) durchgeführt. Erforderlich dafür war eine Eliminierung der MRMs, deren Werte nicht über das Rauschen in der Massenspektrometrie hinausreichten. Dafür musste mindestens ein Wert eines MRMs 30 % über dem Signal der Leerprobe liegen. Um die Variationen durch den Matrixeffekt zu umgehen, wurden die Daten mittels TIC (total ion current) normalisiert. Dies erfolgte durch die Bestimmung der Anteile der MRMs am Gesamtionenstrom einer jeweiligen Probe. Der Matrixeffekt beschreibt die Abhängigkeit der Signalintensität von dem Begleitmaterial der Proben, veränderten Konditionen oder Charakteristik der Umgebung. Die Bestimmung der Probenzusammensetzung ist davon kaum betroffen, allerdings kann es bei einer quantitativen Bestimmung zu falschen Ergebnissen kommen.

Durch MetaboAnalyst wurden alle Daten nach einem Auto-Scaling (Mittelwert geteilt durch die Standardabweichung jeder Variablen) auf ihre Normalverteilung untersucht. Ein t-Test und die Bestimmung der FDR, basierend auf dem Benjamini-Hochberg-Verfahren, ermöglichte die Identifikation potenziell gegebener Signifikanzen. Als statistisch signifikant wurden Unterschiede

mit einem $P \leq 0,05$ angesehen. Die False Discovery Rate (FDR) weist bei diesem Versuch keine signifikanten Komponenten ($P \leq 0,05$) auf, wird aber trotzdem aufgeführt.

Der Fold change diente der Berechnung der Größenordnungen der Unterschiede. Steigert sich ein Wert z.B. um das Doppelte, entspricht das einem Fold change von zwei. Unterscheiden sich die Werte nicht, beträgt der Fold change eins. Weitere Darstellungen der Unterschiede waren Heatmaps und PCAs. Sie zeigen, ob und wie sich beide Gruppen voneinander unterscheiden.

3.10 RT-qPCR

Bettina Zimmer und Birgit Rabenau aus der Tierklinik für Reproduktionsmedizin und Neugeborenenkunde führten die RT-qPCR durch. Die Reverse-Transkriptase-quantitative Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction; RT-qPCR) vervielfältigt Gentranskripte mit Hilfe entsprechender Primerpaare nach Umschreibung der RNA in cDNA. Die Quantifizierung erfolgte mittels Fluoreszenz, die proportional zur Menge der PCR-Produkte während eines PCR-Zyklus ansteigt. Hierfür wurden expandierte Blastozysten von Tag sieben oder acht in PBS-PVA-Lösung gewaschen und bei -80 °C in 0,5 mL Reagiergefäßen (SafeSeal micro tube, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) eingefroren. Von der Versuchsgruppe (RPAA) wurden jeweils fünf Embryonen, von der Kontrollgruppe vier Embryonen von Tag sieben, fünf von Tag acht und von der Laborkontrolle jeweils vier Embryonen untersucht. Zu den untersuchten Gentranskripten zählten zwei Methioninadenyltransferasen (MAT2A, MAT2B), zwei DNA-Methyltransferasen (DNMT1A, DNMT3A), Interferon tau ($IFN\tau$) und das Heat Shock Protein (HSPA1A). In Tabelle 2 sind die verwendeten Primersequenzen aufgelistet. Synthetisiert wurden die Primer von Eurofins Genomics (Luxemburg).

Tabelle 2: Verwendete Primer

Gen		Primersequenzen (5´-3´)	Amplifikationsgröße (bp)	Startposition des Primers	Datenbanknr.
MAT2A	forward	TTG TGC CCT ATC ACC CAA CC	128	1596	NM_001101131
	reverse	GGC ATT GCC AGA CAA GAA GC		1723	
MAT2B	forward	TAT GAA ATG GCG TGT GCA AT	201	832	NM_001046526
	reverse	GTC AAT CAG GAA AGG CCA GA		1032	
DNMT1A	forward	CCT GCA GAA GAA CCA GGA AG	172	649	AY173048
	reverse	TCA TTT CAG CCT GAG CTC CT		820	
DNMT3A	forward	ACT ATA CCG ACG TCT CCA ACA TGA	57	2162	NM_001206502
	reverse	ACC GGC CCA GCA GTC TCT		2201	
IFNT	forward	TCT CTA CTG ATG GCC CTG GT	203	95	NM_001015511
	reverse	GAT CCT TCT GGA GCT GGT TG		302	
HSPA1A	forward	GGG GAG GAC TTC GAC AAC AGG	245	844	NM_203322
	reverse	CGG ACC AGG TCG GAG CAC AGC		1088	
Globin	forward	GCA GCC ACG GTG GCG AGT AT	257	241	X04751
	reverse	GTG GGA CAG GAG CTT GAA AT		555	

3.10.1 Isolierung der Messenger-RNA (mRNA)

Zunächst erfolgte die Aufbereitung der Dynabeads (DYNAL™ Dynabeads™ mRNA DIREKT, Invitrogen, Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA). Dafür wurden diese mittels Vortex (Heidolph Instruments GmbH und Co.KG, Schwalbach, Deutschland) resuspendiert und pro Probe jeweils 10 µL in ein Reagiergefäß (SaveSeal, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) pipettiert. Auf einem Magnetic Particle Concentrator (MPC, invitrogen, Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA) sonderten sich die magnetischen Dynabeads von der restlichen Flüssigkeit ab. Nach 30 Sekunden ließ sich der Überstand abnehmen. Dieser Waschschrift wurde anschließend mit jeweils 10 µL pro Probe

Lysis/Binding Puffer (siehe Tabelle 37) wiederholt. Zum Abschluss der Aufbereitung erfolgte eine Resuspension der Dynabeads mit 10 µL Lysis/Binding Puffer pro Probe.

Für die Präparation der mRNA wurde zu jeder Probe 120 µL Lysis/Binding Puffer und 1 µL Kaninchen-Globin-mRNA (1pg/µL), die als interner Standard diente, gegeben. Nach dem Vortexen und Abzentrifugieren (Mikro 22 R, Hettich AG, Bäch, Schweiz) der Proben erfolgte eine Inkubation über zehn Minuten bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurden die vorgewaschenen Dynabeads (10 µL pro Probe) dazu pipettiert und die Proben fünf Minuten in einem Thermoschüttler (TS-100, PEQLAB, VWR™, Radnor, USA) bei Raumtemperatur gemischt (≈600 rpm). Dabei erfolgte die Bindung der mRNA an die Dynabeads, weshalb eine Separation mittels MPC und das Verwerfen des Überstands möglich war. Anschließend wurde jede Probe einmal mit 100 µL washing buffer A (siehe Tabelle 38) und dreimal mit 100 µL washing buffer B (Tabelle 39) gewaschen und der Überstand nach jedem Waschschrift verworfen.

Die Eluierung der mRNA von den Dynabeads erfolgte nach Zugabe von 11 µL Ampuwa® in einem Thermocycler bei 65 °C über 3 min. Die Proben wurden anschließend in den gekühlten MPC auf Eis verbracht und anschließend der Überstand für die Reverse Transkription verwendet.

3.10.2 Reverse Transkription (RT)

In der Reversen Transkription wurde die mRNA in cDNA umgeschrieben. Dafür erfolgte zunächst die Vorbereitung des Master-Mixes, von dem zu jeder Probe 9 µL hinzugegeben wurde. Die Zusammensetzung des Master-Mixes ist im Anhang in Tabelle 40 beschrieben. Von den zu untersuchenden Proben erfolgte eine Zugabe von 11 µL. Neben diesen wurde auch eine Standard-Probe untersucht, in der zu dem Master-Mix 1 µL Kaninchen-Globin gegeben wurde. Alle Proben enthielten ein Endvolumen von 20 µL und wurden, falls nötig, mit Ampuwa® aufgefüllt. Die Zusammensetzung der beiden Ansätze ist in Tabelle 3 veranschaulicht. Alle Schritte wurden auf Eis durchgeführt.

Tabelle 3: Ansätze für die Reverse Transkriptase

Probe	Standard-Probe
9 µL Master-Mix	9 µL Mastermix
11 µL mRNA (Probe)	1 µL Kaninchen-Globin
	10 µL Ampuwa®

In einem Thermocycler (Biometra, Analytik Jena AG, Jena, Deutschland) erfolgte die Reverse Transkription. Das Programm, zum Umschreiben der mRNA zu cDNA, dauerte 75 min und enthielt folgende Schritte:

1. 10 min bei 25 °C
2. 60 min bei 42 °C
3. 5 min bei 99 °C.

Danach wurden die Proben erneut auf Eis gelagert.

3.10.3 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Für die quantitative Real-Time PCR wurde der IQTM SYBR[®] Green Supermix (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) mit den entsprechenden Primern und der vorbereiteten cDNA zusammengefügt. Um ein Endvolumen von 20 µL zu erhalten, wurde jeder Ansatz mit Ampuwa[®] aufgefüllt. Die Zusammensetzung für das gesamte Reaktionsgemisch ist in

Tabelle 5 dargestellt. Zur Bestimmung der Standardkurve erfolgten vier Verdünnungsreihen (50, 25, 12,5 und 6,25 fg Kaninchen-Globin pro 20 µL) von der Standard-Probe. Von allen Proben wurde immer ein doppelter Ansatz angefertigt und untersucht.

Der IQTM SYBR[®] Green Supermix setzte sich aus SYBR Green I, iTaqTM DNA-Polymerase, Deoxynukleosidtriphosphate (dNTPs), MgCl₂, Tris-HCl, KCl, Stabilisatoren und Fluorescein zusammen.

Die eingesetzten Embryonenäquivalente von der aufbereiteten cDNA variierten je nach Gen und sind in Tabelle 4 aufgelistet.

Anhang

Tabelle 4: Eingesetzte Embryonenäquivalente

Gen	Embryonenäquivalent (einfacher Ansatz)	Eingesetzte Menge an cDNA (in µL) (einfacher Ansatz)
MAT2A	0,05	1
MAT2B	0,1	2
DNMT1A	0,1	2
DNMT3A	0,025	0,5
IFNT	0,1	2
HSPA1A	0,05	1
Globin	0,05	1

Tabelle 5: Zusammensetzung des Reaktionsgemisches für RT-qPCR

	Endkonzentration	Einfacher Ansatz
SYBR® Green Supermix	Einfacher Ansatz	10 µL
Primer forward	0,2 µM	0,4 µL
Primer reverse	0,2 µM	0,4 µL
cDNA		0,25-2 µL
H₂O (Ampuwa®, Fresenius, Bad Homburg, Deutschland)		Ad 20 µL

Die qPCR fand in einem Thermocycler (CFX96 Real.Time System, Bio-Rad Laboratories, CA, USA) statt. Diese startete mit einer zehnmütigen Denaturierungsphase bei 95 °C. Darauf folgten 43 Zyklen:

- 15 s bei 95 °C
- 30 s bei 60 °C
- 30 s bei 70 °C.

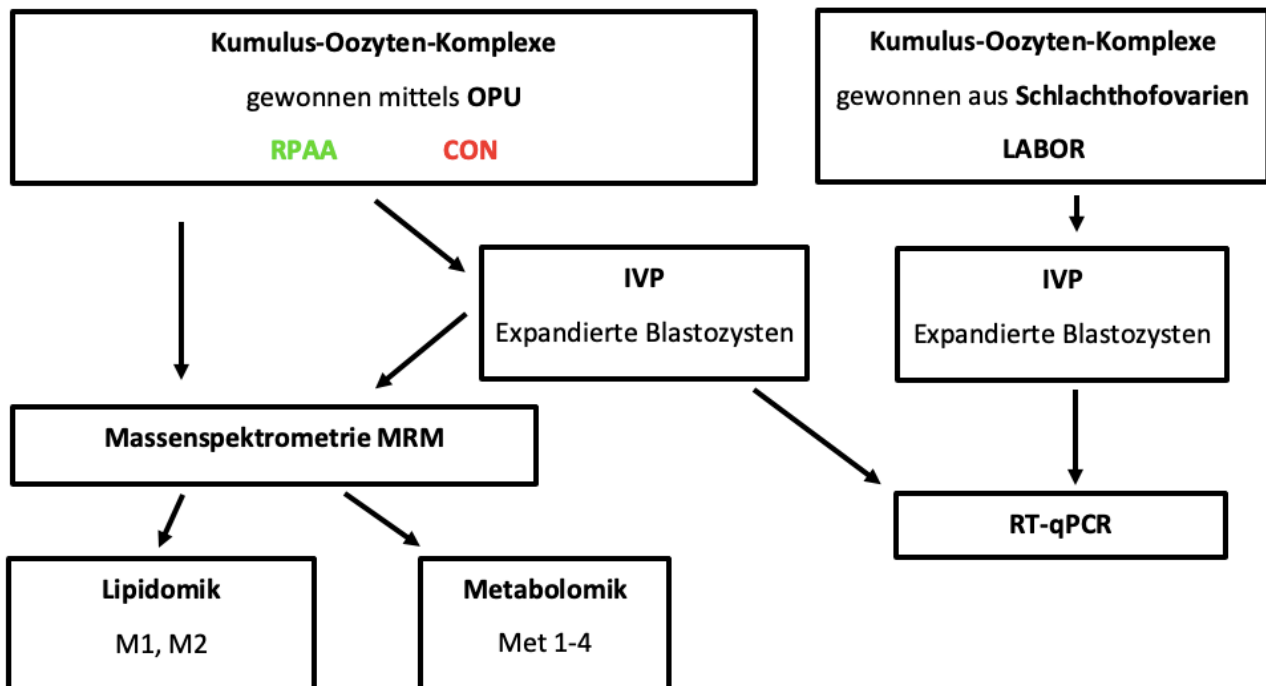
Zur Verifizierung der PCR-Fragmente erfolgte die Erstellung einer Schmelzkurve durch eine schrittweise Erhöhung der Temperatur um 0,5 °C alle zehn Sekunden von 55 °C bis 95 °C.

3.10.4 Statistische Analyse

Die statistische Analyse der RT-qPCR erfolgte mithilfe von SigmaStat (Version 4.0, Systat Software Inc., San Jose, California). Um die Normalverteilung der Daten zu überprüfen wurde der Kolmogorov-Smirnov-Test durchgeführt. Der Levene-Median-Test erfolgte, um die Gleichheit der Varianzen zu überprüfen.

Es erfolgte eine One way ANOVA (Analysis of variance) und ein Tukey-Test, um potenziell gegebene Signifikanzen festzustellen. Als statistisch signifikant galten Unterschiede mit $P \leq 0,05$. Die Ergebnisse wurden als arithmetischer Mittelwert (\bar{x}) \pm Standardfehler (SEM) dargestellt.

3.11 Versuchsaufbau



4 ERGEBNISSE

4.1 Ergebnisse des OPU

Insgesamt wurden 17 OPU-Sitzungen durchgeführt. Diese fanden im Zeitraum vom 12.03.2019 bis 30.07.2019 wöchentlich statt. Pro Sitzung standen 8 bis 12 Tiere zur Verfügung.

4.1.1 Wiederfindungsrate

Es wurden insgesamt 2624 Follikel mit einer Größe von mindestens 2 mm punktiert, 1211 Follikel stammten von Kühen der Versuchsgruppe (RPAA) und 1413 Follikel von Kühen der Kontrollgruppe (CON). Aus diesen Follikeln wurden 1627 Kumulus-Oozyten-Komplexe (KOK) gewonnen. Siebenhundertzweiundvierzig gehörten zu der RPAA-Gruppe und 885 zu der CON-Gruppe. Das ergibt insgesamt eine Wiederfindungsrate (= gewonnene KOK / punktierte Follikel) von durchschnittlich 62 % (61,3 % für RPAA und 62,6 % für CON). In Tabelle 6 sind die Wiederfindungsraten zusammengefasst. Es ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen erkennen ($P > 0,05$).

Tabelle 6: Wiederfindungsraten

	Folikelpunktionen (N)	Kumulus-Oozyten-Komplexe (KOK; N)	Wiederfindungsrate (%; $\bar{x} \pm SD$)
RPAA ●	1211	742	61,3 ± 29,4
CON ●	1413	885	62,6 ± 33,5

4.2 Ergebnisse der In-vitro-Produktion (IVP)

Von den mittels OPU gewonnenen KOK wurden 539 erfolgreich in die IVP eingebracht. Das entsprach 240 KOK aus der RPAA- und 299 der CON-Gruppe. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen ($P > 0,05$).

In Abbildung 17 sind die Teilungs- und Entwicklungsraten genauer dargestellt.

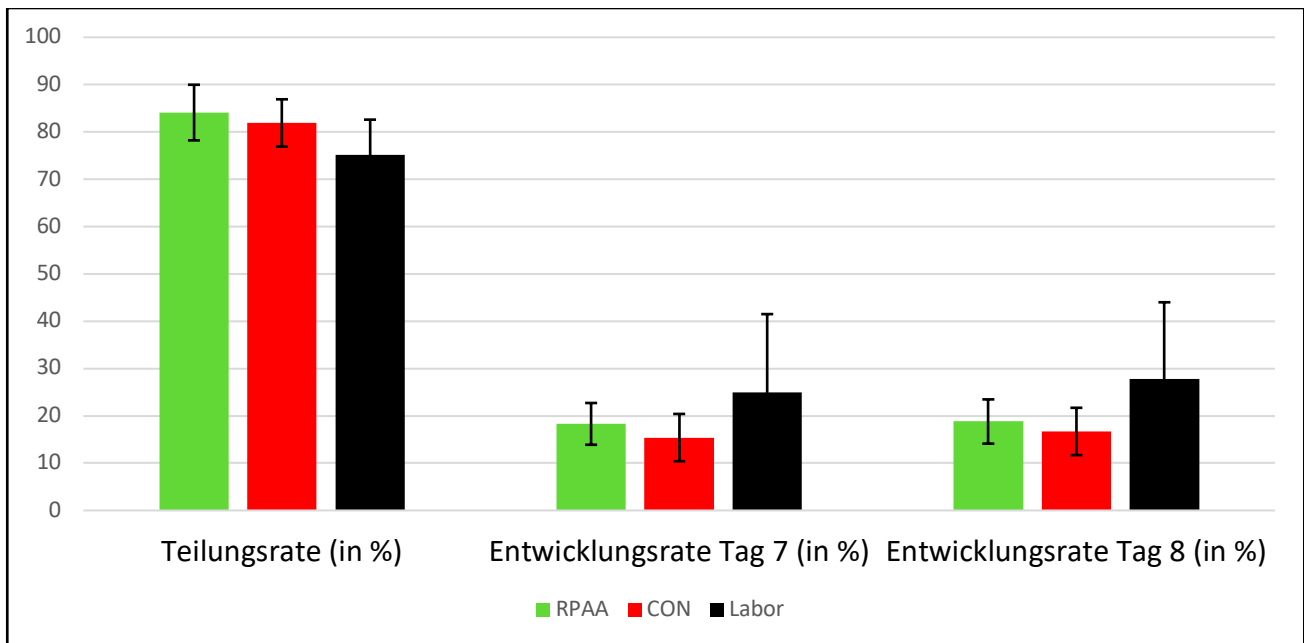


Abbildung 17: Teilungs- und Entwicklungsraten

4.3 Milchleistungsdaten

Für die Auswertung der Milchleistungen wurden die ersten 15 Wochen der Laktationen beider Gruppen verglichen. Die Protein-, Fett- und Harnstoffgehalte in der Milch wurden in unregelmäßigen Abständen bestimmt, aber zur Auswertung und Veranschaulichung in wöchentlichen Abständen dargestellt.

4.3.1 Milchmenge

In Abbildung 18 sind die wöchentlichen Mittelwerte der Milchleistung beider Gruppen dargestellt. Es ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen feststellen ($P > 0,05$). Die

Ergebnisse

Kühe aus der Versuchsgruppe (RPAA) lieferten durchschnittlich $45,9 \pm 4,3$ kg Milch/Tag ($\bar{x} \pm SD$) und die der Kontrollgruppe (CON) $46,0 \pm 4,3$ kg Milch/Tag ($\bar{x} \pm SD$).

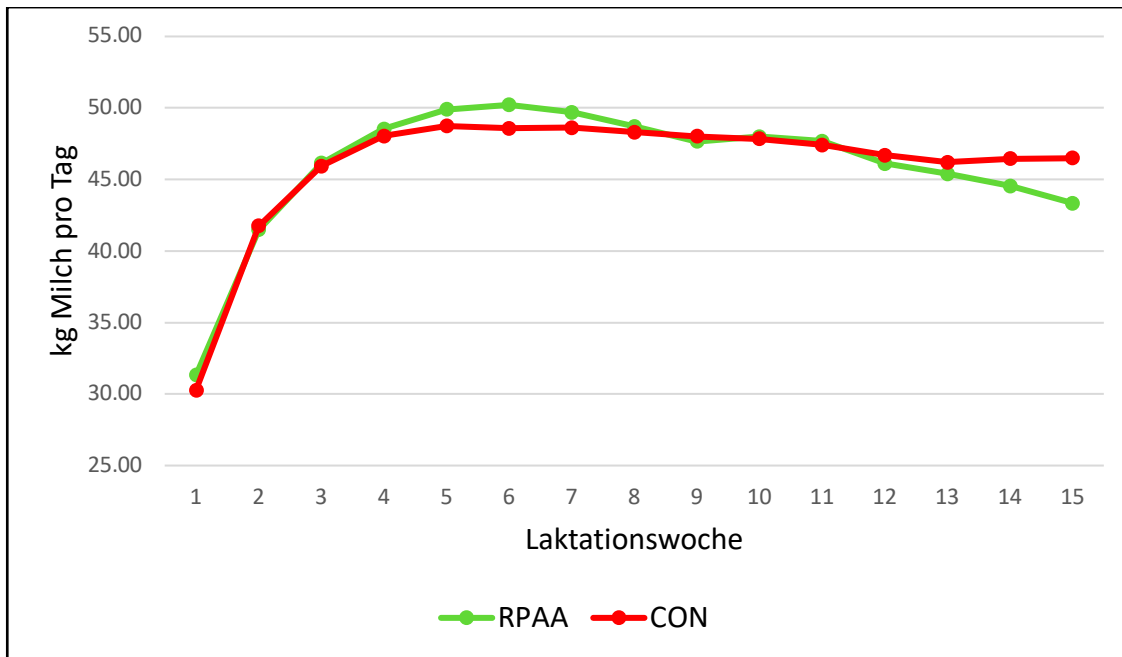


Abbildung 18: Milchleistung

4.3.2 Milchproteingehalt

Die Proteingehalte in der Milch unterschied sich in einem gepaarten t-Test signifikant zwischen den Gruppen ($P \leq 0,05$). Der Mittelwert für Tiere der RPAA-Gruppe lag bei $3,15 \pm 0,25$ % ($\bar{x} \pm SD$) und der für die CON-Tiere bei $3,07 \pm 0,22$ % ($\bar{x} \pm SD$). Die wöchentlichen Werte sind in Abbildung 19 veranschaulicht.

Die 15. Laktationswoche ist nicht dargestellt, da die Daten einzelner Kühe fehlten.

Ergebnisse

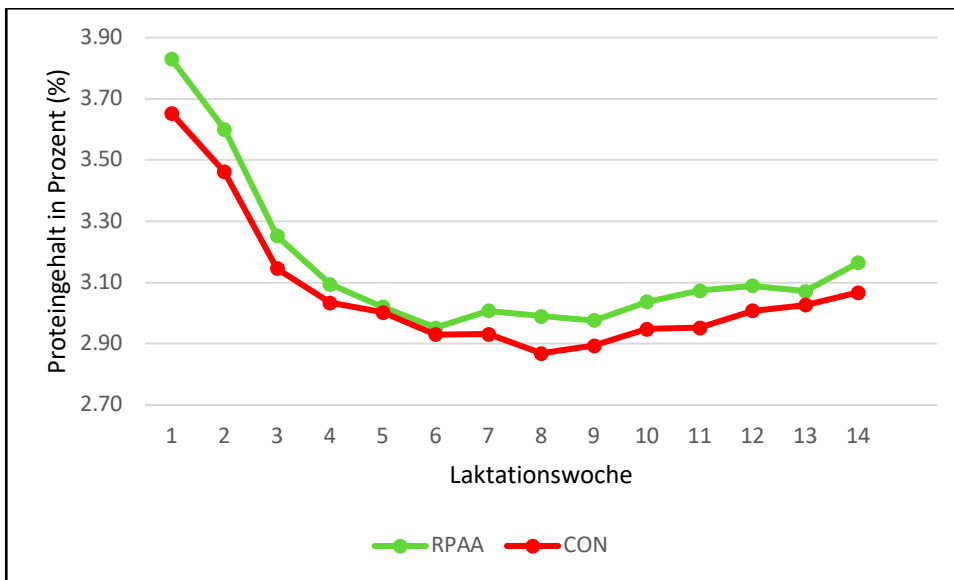


Abbildung 19: Milchproteingehalt

4.3.3 Milchfettgehalt

In einem gepaarten t-Test wiesen die Fettgehalte von Tieren der RPAA-Gruppe in der Milch signifikant höhere Werte auf ($P \leq 0,05$). Der Mittelwert für Tiere der RPAA-Gruppe lag bei $4,18 \pm 0,5$ ($\bar{x} \pm SD$) und für Tiere der CON-Gruppe bei $4,01 \pm 0,5$ ($\bar{x} \pm SD$). In Abbildung 20 sind die wöchentlichen Werte im Vergleich dargestellt.

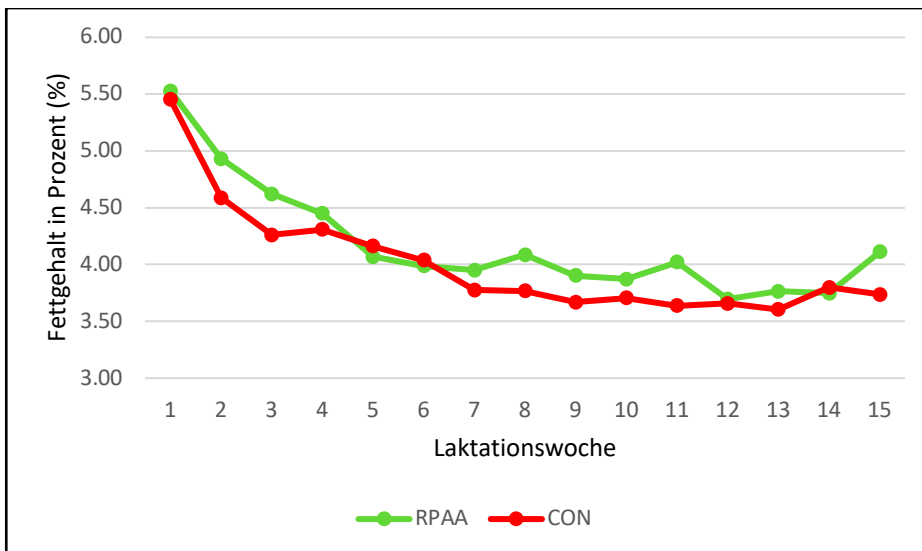


Abbildung 20: Milchfettgehalt

4.3.4 Milchwahnstoffgehalt

Die Milchwahnstoffwerte wiesen keine signifikanten Unterschiede zwischen Tieren der RPAA- und CON-Gruppe auf ($P > 0,05$). Siehe Abbildung 21. In den ersten 15 Wochen lagen diese durchschnittlich bei $157 \pm 17,5$ mg/L ($\bar{x} \pm SD$) von Tieren der RPAA-Gruppe und bei $161 \pm 13,2$ mg/L ($\bar{x} \pm SD$) von Tieren der CON-Gruppe.

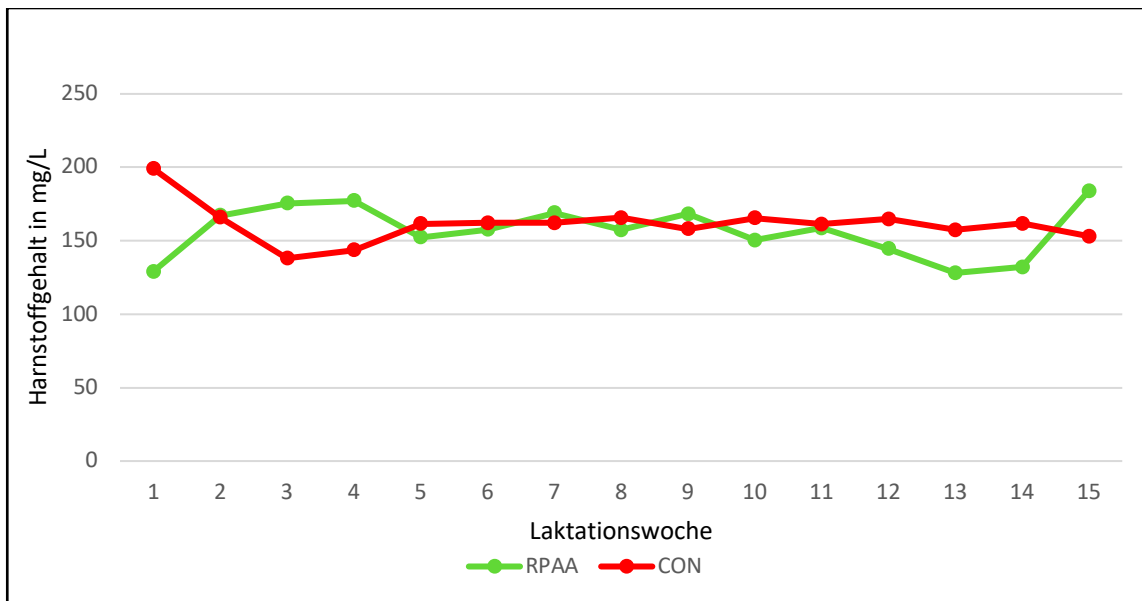


Abbildung 21: Milchwahnstoffgehalt

4.4 Bestimmung der Aminosäurekonzentrationen im Plasma

Insgesamt sind die Aminosäurekonzentrationen bei RPAA signifikant niedriger als bei CON ($P = 0,005$). Dies spiegelt sich auch im Gehalt an essenziellen Aminosäuren (EAA) wider ($P = 0,04$), wobei bei den nicht-essenziellen Aminosäuren (NEAA) nur eine Tendenz dazu besteht ($P = 0,07$). Für die einzelnen Aminosäuren ist aber nur bei Threonin, Glutamin und Valin ein signifikanter Effekt nachzuweisen. Die Ergebnisse werden in Tabelle 7 dargestellt.

Anhang

Tabelle 7: Aminosäurekonzentrationen im Plasma

AMINOSÄUREN	RPAA • (µM)	CON • (µM)	SD	P-WERT
TAU	31,98	33,58	10,43	0,59
THR	109,24	133,5	30,01	0,003
SER	103,19	107,74	19,19	0,41
GLU	44,4	50,86	10,79	0,03
GLN	179,61	185,69	35,02	0,55
SARC	24,28	24,83	4,12	0,64
AAAA	5,93	5,95	1,1	0,97
PRO	48,86	51,05	11,65	0,51
GLY	386,11	417,57	106,84	0,31
ALA	279,83	298,53	60,54	0,28
CIT	51,63	51,54	11,94	0,98
AABA	26,29	22,58	11,06	0,24
VAL	274,99	314,53	47,51	0,003
MET	22,09	23,36	4,69	0,35
ILE	116,31	127,44	23,5	0,097
LEU	111,85	126,69	28,2	0,06
TYR	48,07	46,46	12,66	0,66
PHE	43,31	45,78	8,8	0,33
GABA	12,35	12,86	2,33	0,45
NH4	123,42	119,37	18,09	0,44
ORN	40,55	45,5	9,92	0,08
LYS	80,56	84,84	18,36	0,42
1-MET-HIS	16,46	14,79	3,58	0,1
HIS	46,26	51,95	12,81	0,12
ARG	72,38	72,59	17,83	0,97

TAU: Taurin; THR: Threonin; SER: Serin; GLU: Glutaminsäure; GLN: Glutamin; SARC: Sarcosin; AAAA: alpha-Amino adipinsäure; PRO: Prolin; GLY: Glycin; ALA: Alanin; CIT: Citrullin; AABA: alpha- Aminobuttersäure; VAL: Valin; MET: Methionin; ILE: Isoleucin; LEU: Leucin; TYR: Tyrosin; PHE: Phenylalanin; GABA: gamma-Aminobuttersäure; NH4: Ammonium; ORN: Ornithin; LYS: Lysin; 1-MET-HIS: 1- Methyl- Histidin; HIS: Histidin; ARG: Arginin

4.5 Ergebnisse der RT-qPCR

Verglichen wurden expandierte Blastozysten aus der Versuchsgruppe (RPAA•), der dazugehörigen Kontrollgruppe (CON•) und einer Laborkontrolle (•). Die statistische Analyse der Blastozysten von Tag 7 und Tag 8 erfolgte separat. Die exakten Werte der Analyse sind im Anhang zu finden (Tabelle 43 und Tabelle 44).

4.5.1 Analyse der expandierten Blastozysten von Tag 7

Eine Zusammenfassung der signifikanten mRNA-Gehalte der Blastozysten von Tag 7 ist in Abbildung 22 zu finden.

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den mRNA-Gehalten von IFNT.

Für DNMT1A war bei den Blastozysten der CON-Gruppe eine signifikant höhere Transkriptmenge als bei denen der anderen beiden Gruppen festzustellen. Die Blastozysten der Laborkontrolle und RPAA-Gruppe unterschieden sich nicht signifikant voneinander. Der mRNA-Gehalt der Blastozysten von Versuchsgruppe war bei DNMT3A signifikant niedriger als bei Blastozysten der Laborkontrolle. Die Blastozysten der Kontrollgruppe unterschieden sich in ihrem Gehalt an DNMT3A nicht signifikant von den Blastozysten der beiden anderen Gruppen.

In Abbildung 22 ist zu sehen, dass sich die Blastozysten der Versuchsgruppe signifikant in der relativen Transkriptmenge von HSPA1A zu den beiden anderen Gruppen unterschieden. Zwischen Blastozysten der Kontrollgruppe (CON) und der Laborkontrolle ließen sich keine signifikanten Unterschiede feststellen.

Die Transkriptmenge von MAT2A war bei Blastozysten der CON-Gruppe signifikant höher als bei denen der Laborkontrolle. Zu den Blastozysten der Versuchsgruppe ließ sich keine Signifikanz darstellen. Bei MAT2B wiesen die Blastozysten der CON-Gruppe ein signifikant höhere Transkriptmenge auf als die der Versuchsgruppe und der Laborkontrolle.

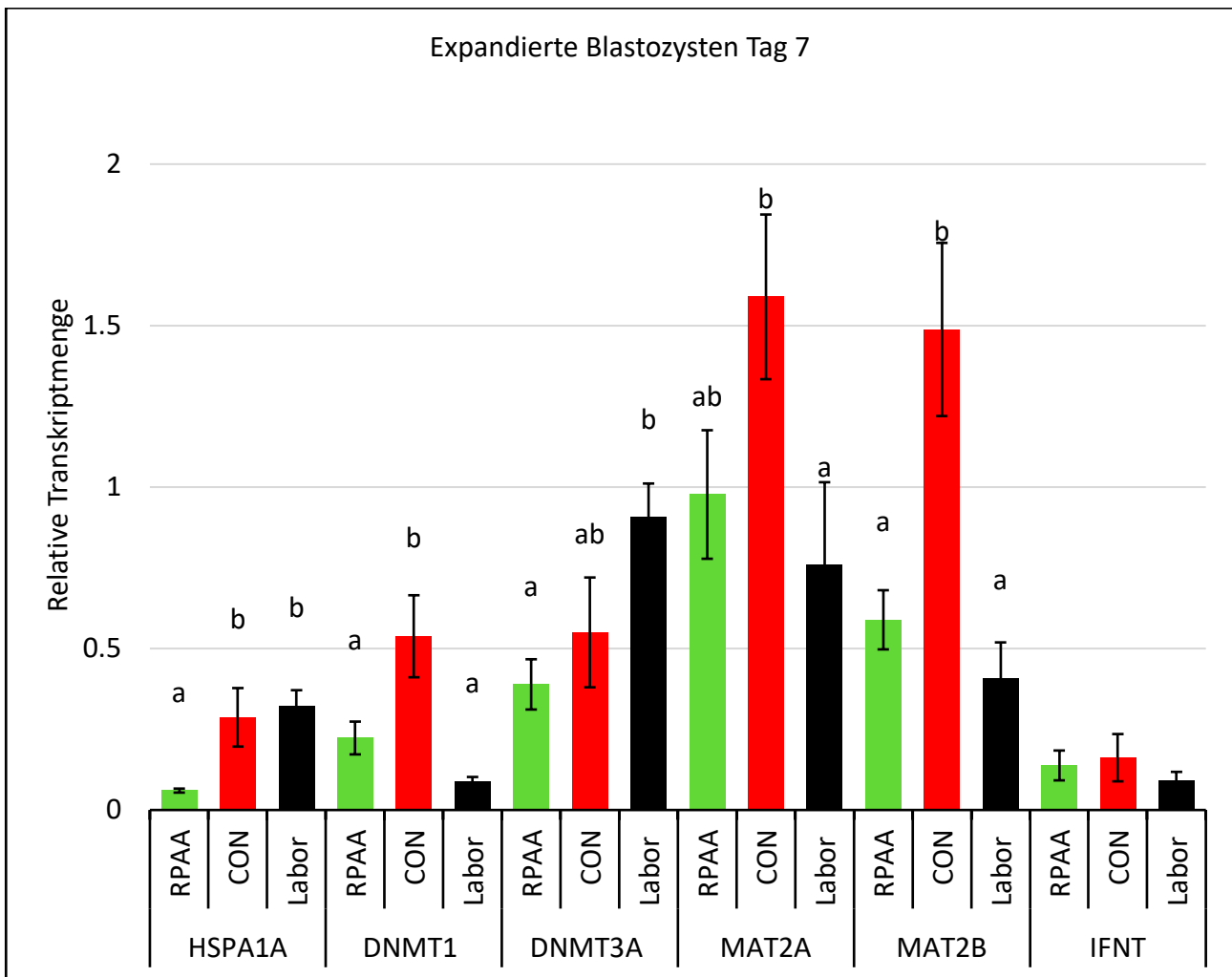


Abbildung 22: mRNA-Gehalte der expandierten Blastozysten von Tag 7 (P a:b \leq 0,05)

4.5.2 Analyse der expandierten Blastozysten von Tag 8

In Abbildung 23 sind die Ergebnisse der expandierten Blastozysten von Tag 8 zusammengefasst.

Bei MAT2A, MAT2B, IFNT und DNMT3A konnten keine signifikanten Unterschiede im mRNA-Gehalt festgestellt werden.

Für Blastozysten der Versuchsgruppe (RPAA) ließen sich bei DNMT3A keine Unterschiede zu den anderen Gruppen feststellen. Die Blastozysten der Kontrollgruppe (CON) unterschieden sich jedoch durch einen signifikant höheren mRNA-Gehalt zu denen der Laborkontrolle.

Bei HSPA1A wiesen die Blastozysten der Versuchsgruppe (RPAA) einen signifikant niedrigeren mRNA-Gehalt im Vergleich zu denen der Laborkontrolle auf. Zu Blastozysten der Kontrollgruppe (CON) wurden keine signifikanten Unterschiede beobachtet.

Ergebnisse

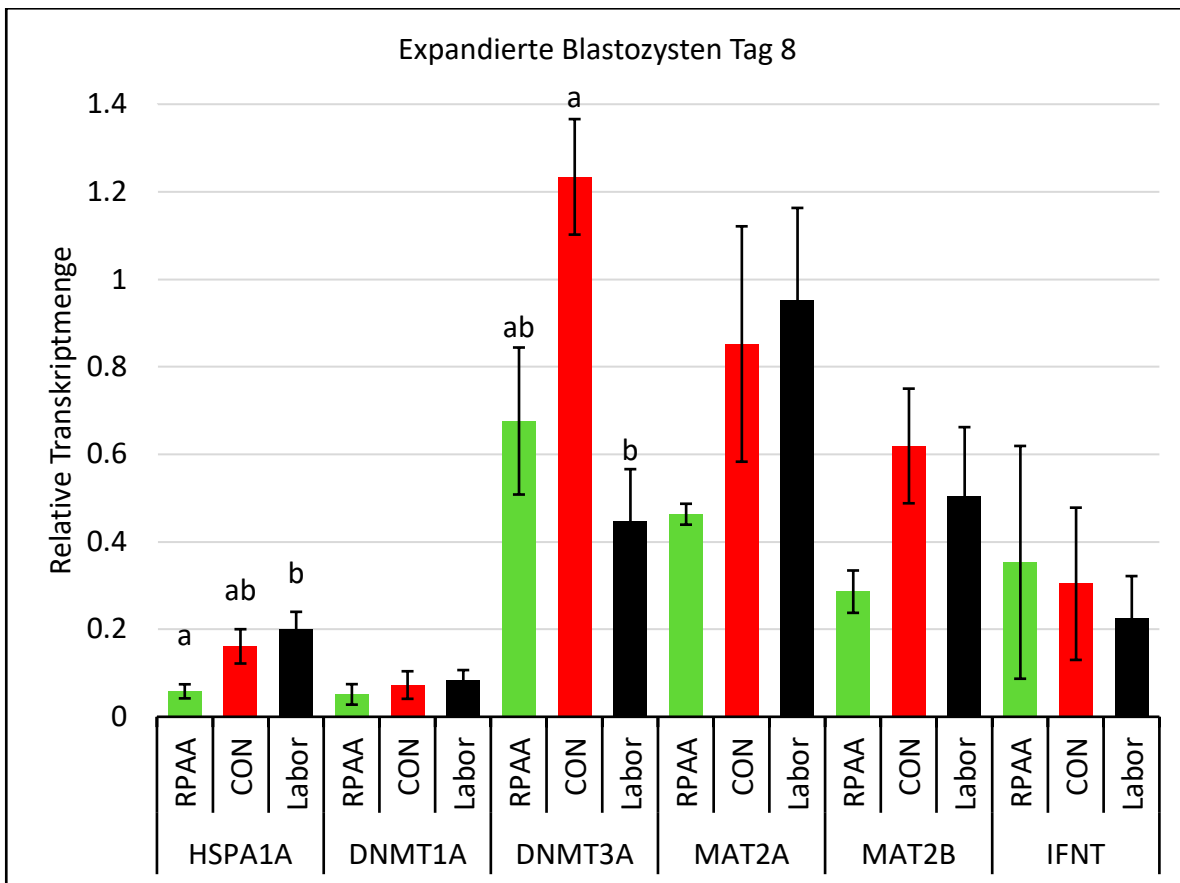


Abbildung 23: mRNA-Gehalte der expandierten Blastozysten von Tag 8 (P a:b ≤ 0,05)

4.6 Ergebnisse des Multiple-Reaction-Monitorings (MRM)

Die folgenden Darstellungen beziehen sich auf Komponenten mit signifikantem P-Wert ($P \leq 0,05$). Um weitere Unterschiede zu veranschaulichen, wurden Heatmaps erstellt und Principal-Component-Analysen (PCA) durchgeführt. Die Heatmaps repräsentieren die Komponenten mit der deutlichsten Clusterbildung, ausgewählt nach P-Werten. Mittels PCA werden die Unterschiede zwischen den einzelnen Proben zweidimensional dargestellt. Die grünen Punkte stellen Proben von RPAA, die roten Punkte von CON dar.

4.6.1 Lipidanalyse

Bei der Lipidanalyse wurde jede Probe in zwei unterschiedlichen Injektionen/Analysen (M1 und M2) untersucht. In diesen Analysen wurden unterschiedliche Lipide und Lipidgruppen untersucht. Da in

Ergebnisse

M2 keine signifikanten Komponenten vorlagen, wird im Weiteren nicht auf diese Analyse eingegangen.

4.6.1.1 Unreife Oozyten

4.6.1.1.1 M1

Unter den signifikanten Analyten finden sich neun Triacylglyceride (TAG) und das Phosphatidylcholin (PC) 38:3, welche allesamt einen höheren Gehalt in Oozyten der CON aufweisen. Fünf von ihnen enthalten zudem die Fettsäure 18:1, zwei 16:0 und jeweils eine 18:0 und 16:1. In Tabelle 8 sind alle signifikanten Komponenten aufgelistet. Diese Unterschiede sind auch mittels heatmap dargestellt (Abbildung 25). Bei der Analyse der Lipidgruppen zeigte sich allerdings kein signifikant höherer Gehalt an TAGs bei den Oozyten von CON (nicht dargestellt).

In der PCA stellt jeder Punkt eine Probe dar, welche jeweils aus vier unreifen Oozyten bestehen. Sie zeigt die Unterschiede der einzelnen Proben in ihren Hauptkomponenten, reduziert auf zwei Dimensionen. Die Darstellung veranschaulicht, dass sich die Gruppen der unreifen Oozyten nur sehr gering voneinander unterscheiden (Abbildung 24).

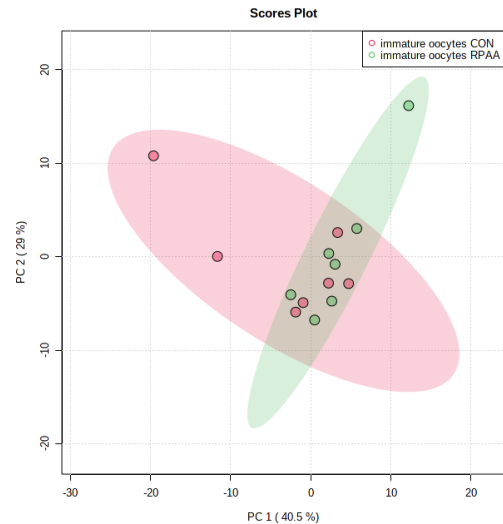


Abbildung 24: PCA der unreifen Oozyten (M1)

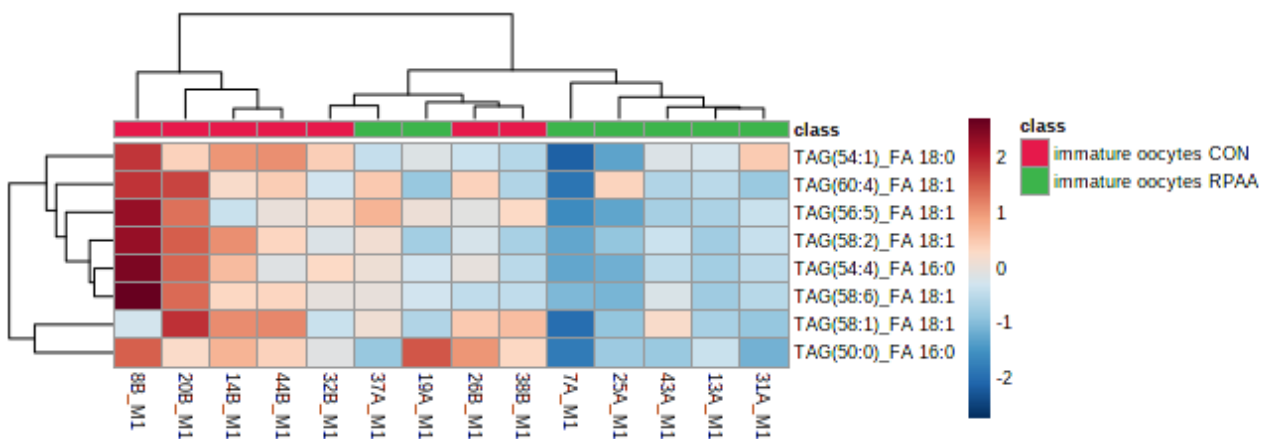


Abbildung 25: Heatmap der unreifen Oozyten (M1)

Anhang

Tabelle 8: t-Test der unreifen Oozyten (M1)

	P-Value	FDR	Fold change
TAG (58:1) _FA 18:1	0.0075381	0.56772	1.3063
TAG (54:4) _FA 16:0	0.015717	0.56772	1.2886
TAG (58:2) _FA 18:1	0.018451	0.56772	1.2431
TAG (50:0) _FA 16:0	0.020484	0.56772	1.1837
TAG (54:1) _FA 18:0	0.032149	0.56772	1.1435
TAG (58:6) _FA 18:1	0.032713	0.56772	1.2664
TAG (60:4) _FA 18:1	0.037742	0.56772	1.2284
TAG (56:5) _FA 18:1	0.037784	0.56772	1.2284
PC (38:3)	0.039268	0.56772	1.1648
TAG (52:2) _FA 16:1	0.049907	0.56772	1.2601

4.6.1.2 Reife Oozyten

4.6.1.2.1 M1

PCp (36:5), PC (36:0) bzw. PCp (38:6), PCo (36:0) und TAG (60:4) mit der Fettsäure (18:1) weisen einen signifikanten P-Wert mit erhöhtem Gehalt in CON auf (siehe Tabelle 9). PCp sind Phosphatidylcholine mit Alkenylether (Plasmalogen)-Substituenten. Ist jedoch ein Alkylether-Substituent vorhanden, werden diese Phosphatidylcholine mit PCo abgekürzt.

In der PCA und der heatmap der reifen Oozyten lassen sich leichte Unterschiede zwischen den Gruppen darstellen (siehe Abbildung 26 und Abbildung 27).

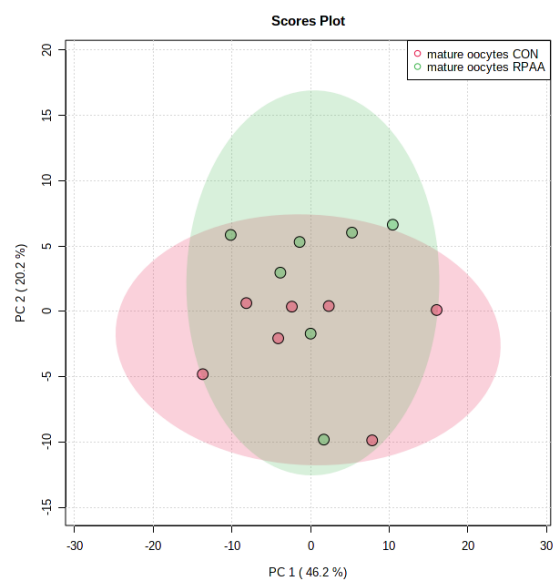


Abbildung 26: PCA von reifen Oozyten (M1)

Ergebnisse

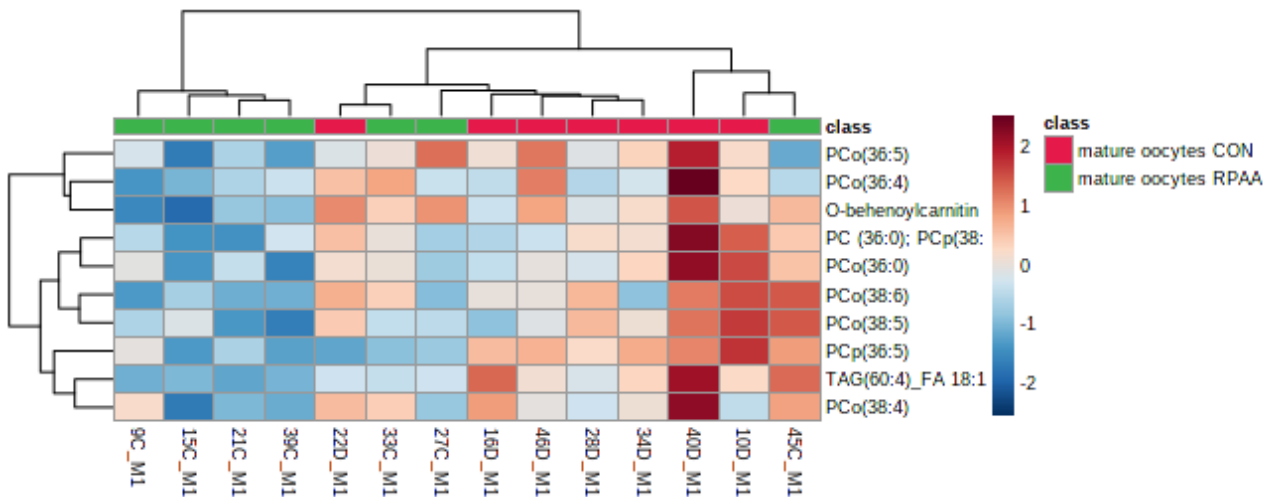


Abbildung 27: Heatmap der reifen Oozyten (M1)

Tabelle 9: t-Test der reifen Oozyten (M1)

	P-Value	FDR	Fold change
PCp (36:5)	0.027996	0.96397	1.17
PC (36:0); PCp (38:6)	0.03865	0.96397	1.1562
TAG (60:4)_FA 18:1	0.045617	0.96397	1.1548
PCo (36:0)	0.049239	0.96397	1.1672

4.6.1.3 Expandierte Blastozysten

4.6.1.3.1 M1

Die Gehalte von PC (34:2) und PC (34:1) sind signifikant höher bei RPAA. O-behenoylcarnitine hingegen weist bei CON einen höheren Gehalt auf (siehe Tabelle 10). Dies ist mittels heatmap in Abbildung 29 dargestellt. Abbildung 28 zeigt die PCA dieser Analyse der Blastozysten, welche keine großen Unterschiede zwischen den Gruppen aufzeigt.

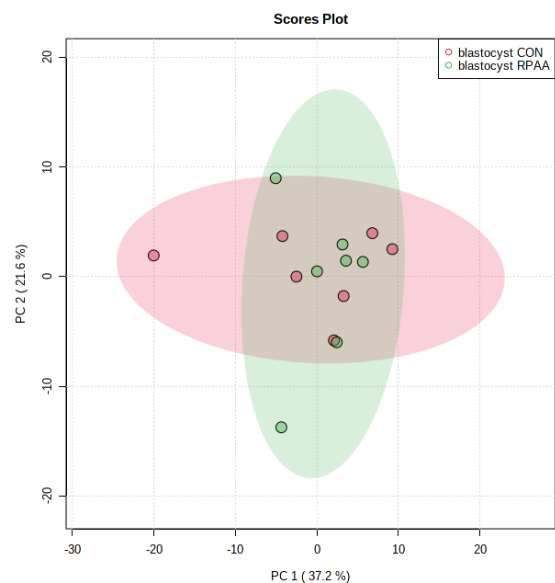


Abbildung 28: PCA von Blastozysten (M1)

Ergebnisse

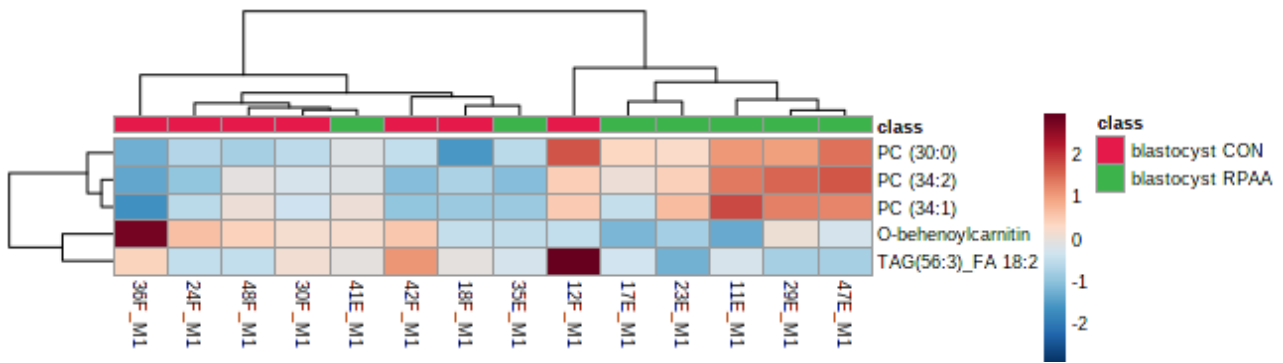


Abbildung 29: Heatmap der Blastozysten (M1)

Tabelle 10: t-Test von Blastozysten (M1)

	P-Value	FDR	Fold change
PC (34:2)	0.031131	0.90283	0.72704
PC (34:1)	0.036994	0.90283	0.69269
O-behenoylcarnitine	0.045467	0.90283	1.1679

4.6.2 Metabolomanalyse

Das Metabolom der jeweiligen Proben wurde, aufgrund der hohen Anzahl an MRMs, in vier unterschiedlichen Injektionen/Analysen (Met1-4) analysiert. In der Analyse von Met 3 und 4 konnten nur wenige Maxima der Metaboliten die Werte der Leerprobe um mindestens 30 % übertreffen. Das bedeutet, dass die untersuchten Metaboliten gar nicht oder nur in sehr kleinen Mengen in den Proben vorhanden sind. Zudem wiesen diese keine Signifikanzen auf, weshalb auf diese Analysen nicht weiter eingegangen wird.

4.6.2.1 Unreife Oozyten

4.6.2.1.1 Met1

Laurinsäure ist die einzige Komponente, die in dieser Untersuchung einen signifikanten P-Wert aufweist (siehe Tabelle 11). Die relativen Mengen an Laurinsäure sind in Abbildung 31 veranschaulicht. Eine solche Darstellung lässt sich für jede Komponente erstellen. Aufgrund der Übersichtlichkeit, wird jedoch meist eine Heatmap bevorzugt. In diesem Fall findet jedoch keine Clusterbildung in der Heatmap statt (nicht dargestellt). Mittels PCA lässt sich keine deutliche Differenzierung zwischen beiden Gruppen vornehmen (Abbildung 30).

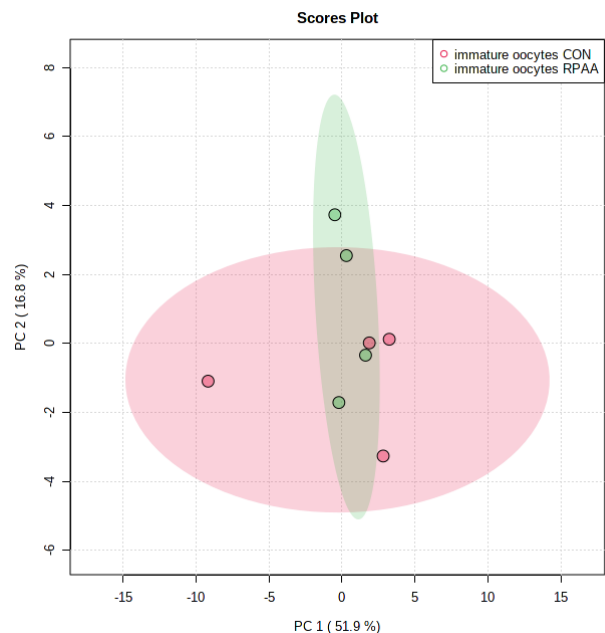


Abbildung 30: PCA von unreifen Oozyten (Met 1)

Ergebnisse

5_Lauric acid

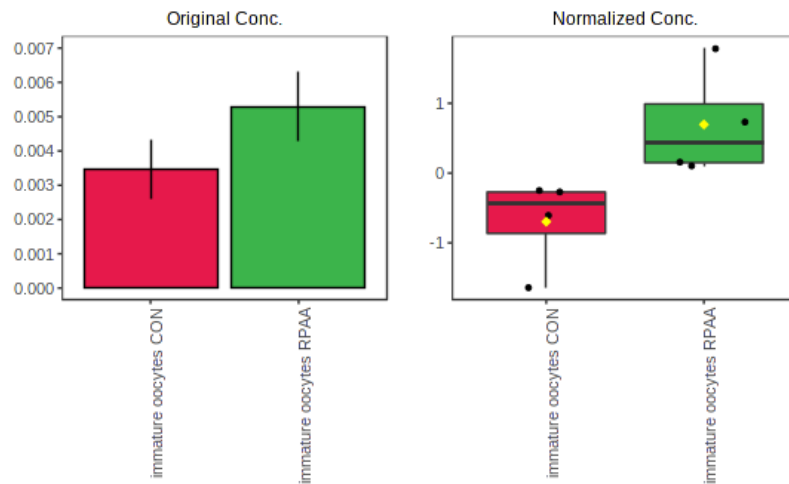


Abbildung 31: Relative Konzentrationen von Laurinsäure

Tabelle 11: t-Test der unreifen Oozyten (Met 1)

	P-Value	FDR	Fold change
5_Lauric acid	0.034204	0.99229	0.65531

4.6.2.1.2 Met2

Die MRMs von Thymidin, D-Erythrose 4-phosphat, und Acetylcarnitin weisen einen erhöhten Gehalt in der CON-Gruppe mit signifikantem P-Wert auf (siehe Tabelle 12). In der heatmap (Abbildung 33) ist zudem eine Clusterbildung sichtbar. In Abbildung 32 wird mittels PCA dargestellt, wie sich die einzelnen Proben der unreifen Oozyten in dieser Analyse unterscheiden. Dabei zeigt sich, dass sich die Proben von der RPAA-Gruppe sehr ähneln und die Proben von der CON-Gruppe Variationen aufweisen.

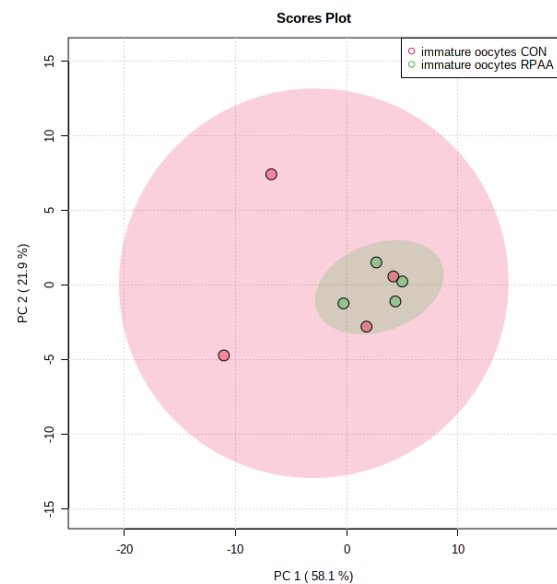


Abbildung 32: PCA der unreifen Oozyten (Met 2)

Ergebnisse

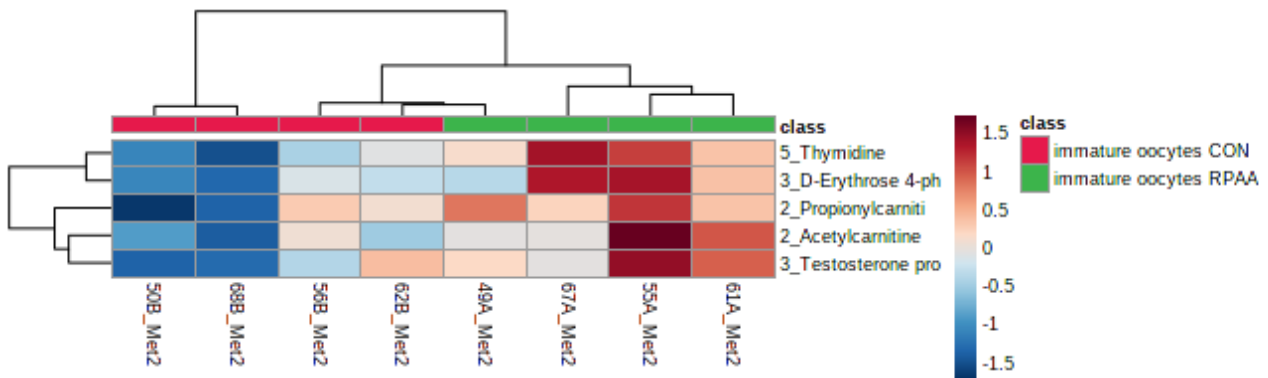


Abbildung 33: Heatmap der unreifen Oozyten (Met 2)

Tabelle 12: t-Test von unreifen Oozyten (Met 2)

	P-Value	FDR	Fold change
5_Thymidine	0.013377	0.53788	0.56659
3_D-Erythrose 4-phosphate	0.034683	0.53788	0.60102
2_Acetylcarnitine	0.043769	0.53788	0.70846

4.6.2.2 Reife Oozyten

4.6.2.2.1 Met1

Bei dieser Analyse zeigten sich keine signifikanten Werte ($P \geq 0,05$).

4.6.2.2.2 Met2

Hierbei konnten keine Signifikanzen ($P \geq 0,05$) beobachtet werden.

4.6.2.3 Expandierte Blastozysten

4.6.2.3.1 Met1

Es wurden keine signifikanten ($P \geq 0,05$) Werte in dieser Untersuchung von expandierten Blastozysten festgestellt.

4.6.2.3.2 Met2

Bei der Met2-Analyse von Blastozysten traten keine Komponenten mit signifikantem P-Wert ($P \leq 0,05$) auf.

5 DISKUSSION

5.1 Ovum Pick-Up (OPU)

Ovum Pick-Up (OPU) ist eine Methode, die es ermöglicht Oozyten zu gewinnen. Über eine identische Kultivierung der Oozyten in der IVP kann beispielsweise gezeigt werden, ob es Unterschiede in der Entwicklungskompetenz der Oozyten und der Qualität der anschließend erzeugten Embryonen gibt. Durch die hohe Wiederholbarkeit (Galli et al. 2001; Merton et al. 2003) dieser Methodik lassen sich Effekte über eine längere Zeitspanne untersuchen. Zudem besteht die Möglichkeit, gleichzeitig das Leistungsniveau der einzelnen Tiere zu überprüfen, da die Tiere weiterhin ohne Einschränkungen genutzt werden können.

In diesem Versuch ergab sich eine Wiederfindungsrate von durchschnittlich ca. 62 %. Galli et al. (2014) berichteten von Wiederfindungsraten von durchschnittlich 55 – 60 %, wobei auch Wiederfindungsraten von bis zu über 70 % möglich sind. Die Wiederfindungsraten der Versuchs- und Kontrollgruppe unterschieden sich dabei kaum ($61,3 \pm 29,4\%$; $62,6 \pm 33,5\%$).

Die Wiederfindungsrate wird allgemein am stärksten über die Durchführung des OPU, der Erfahrung des Teams und das individuelle Tier beeinflusst (Merton et al. 2003). Außerdem spielt der Zyklusstand, der Kanüldurchmesser und der Aspirationsdruck eine wichtige Rolle (Bols et al. 1996). Mit einem hohen Aspirationsdruck und einem größeren Kanüldurchmesser lassen sich eventuell mehr KOK gewinnen, um den Schaden an ihnen jedoch so gering wie möglich zu halten, wird eine Flussgeschwindigkeit von 20 bis 25 mL/min empfohlen (Galli et al. 2001). Mit einem kürzeren Punktionsintervall von drei bis vier Tagen hätte die Anzahl an KOK erhöht, sowie die Wiederfindungsraten und die Qualität der KOK verbessert werden können. Dies hängt damit zusammen, dass sich innerhalb von sieben Tagen ein dominanter Follikel ausbilden kann und nicht-

dominante Follikel in die Regression drängt (Garcia and Salaheddine 1998). Zudem gibt es eine negative Korrelation der Follikelgröße zur Wiederfindungsrate (Pieterse et al. 1991b).

Insgesamt konnten bei dem OPU keine Unterschiede durch die Fütterung pansengeschützten Methionins und Lysins festgestellt werden. Ein direkter Einfluss auf die Follikelentwicklung konnte dadurch nicht nachgewiesen werden. Dies ist im Einklang mit den Ergebnissen eines Versuchs, in dem die Tiere superovuliert wurden (Acosta et al. 2016). Es konnten keine Unterschiede bei der Anzahl der gewonnenen Embryonen festgestellt werden.

5.2 In-vitro-Produktion (IVP)

Über die IVP wurde die Entwicklungskompetenz der gewonnenen Oozyten analysiert. Hierbei konnten keine signifikanten Unterschiede durch die Fütterung pansengeschützten Methionins und Lysins festgestellt werden. Die Entwicklungsraten an Tag sieben lag in der RPAA-Gruppe bei $18,3 \pm 4,4\%$ und in der CON-Gruppe bei $15,4 \pm 8,9\%$. Dies entspricht wiederum den Ergebnissen von Acosta et al. (2016), bei welchen keine Unterschiede bei der Anzahl und Qualität der gewonnenen Embryonen auffielen.

Bei in vitro produzierten Embryonen aus Ovarien geschlachteter Kühe liegen die Teilungsraten durchschnittlich zwischen 70 bis 85 % (Ferré et al. 2020). Die Teilungsraten der Laborkontrolle entsprechen somit mit $75,1 \pm 7,5\%$ den durchschnittlichen Werten. Teilungsraten von mittels OPU produzierten Embryonen liegen im Schnitt bei 70 % (Galli et al. 2014), dementsprechend sind die im Versuch erzielten Teilungsraten von $84,1 \pm 5,9\%$ in der RPAA- und $81,9 \pm 8,6\%$ in der CON-Gruppe sehr gute Werte.

Die Entwicklungsraten an Tag 7 können mit $18,3 \pm 4,4\%$ bei der RPAA-Gruppe und $15,4 \pm 8,9\%$ bei der CON-Gruppe als gut betrachtet werden, da bei Kühen circa 20 % angestrebt werden (Galli et al. 2014). Dies gilt vor allem, weil das OPU direkt im Stall und nicht unter optimalen Bedingungen durchgeführt wurde. Die Oozyten können dadurch Temperaturschwankung ausgesetzt sein, wodurch es zu einer Einschränkung der Entwicklungskompetenz kommen kann (Sun et al. 2004). Üblicherweise wird OPU in Räumen durchgeführt, in denen die Regulation der Umgebung hinsichtlich Temperatur möglich ist (Galli et al. 2001).

5.3 Milchleistung

Die Auswertung der Milchleistung dient hauptsächlich der Leistungskontrolle und gibt Aufschluss über den allgemeinen Versorgungszustand der Tiere.

Bei der Milchmenge lassen sich keine Unterschiede bei den beiden Tiergruppen feststellen. Laut Robinson (2010) ist meist nur mit einem Anstieg des Proteingehalts zu rechnen. Bei der Supplementation von Lysin beschrieben Robinson et al. (2011), dass v.a. im ersten Laktationsdrittel mit einem stärkeren Anstieg der Milchleistung gerechnet werden kann, da Lysin in dieser Phase eher einen limitierenden Effekt verursacht. In diesem Versuch ist allerdings nur eine leichte Tendenz dazu in den ersten Wochen zu erkennen. Die Tiere beider Gruppen erreichen jedoch ein hohes Milchleistungsniveau, weshalb die Effekte einer Supplementation kleiner ausfallen können (Robinson 2010). Der Milchproteingehalt und der Milchfettgehalt erfuhren hingegen durch die Supplementation pansengeschützten Methionins und Lysins eine leichte Steigerung.

Eine Steigerung des Fettgehalts wird seltener festgestellt, wobei dies bei Hydroxymethylthiobuttersäure (HMB) häufig vorkommt. HMB führt zu einer Mobilisierung von Lipiden im Pansen, die über das Blut aufgenommen werden und in die Milch gelangen (Patton et al. 1970; Huber et al. 1984). Dieser Prozess findet bei dem entsprechenden Isopropylester (HMBi) im kleineren Maße statt, da die Bioverfügbarkeit bei 45 bis 50 % liegt (Graulet et al. 2005) und der Verstoffwechslung durch die Mikroorganismen im Pansen nicht komplett entgeht.

Die Harnstoffwerte in der Milch wurden in diesem Versuch nicht beeinflusst, wie auch bei Schwab et al. (1992) oder Arriola Apelo et al. (2014). In anderen Versuchen wurde hingegen ein geringer Anstieg wahrgenommen, welcher allerdings nicht so intensiv war wie durch Erhöhungen des Rohproteingehalts der Ration (Xu et al. 1998; Třináctý et al. 2009).

Insgesamt spricht die Erhöhung des Protein- und Fettgehalts für eine optimierte Versorgung mit Aminosäuren, welche in keiner Überversorgung resultiert. Aufgrund der begrenzten Anzahl an Versuchstieren sind diese Ergebnisse jedoch nur eingeschränkt aussagekräftig, zumal die Effekte nur sehr gering sind.

5.4 Aminosäurekonzentration im Plasma

Die Aminosäurekonzentration im Plasma spiegelt die Effekte und Reaktionen auf eine Diät wider. Dies muss immer in Verbindung mit dem Bedarf des Tieres gesetzt werden. Als Vergleichswerte für laktierende Milchkühe lassen sich beispielsweise die Werte von Meijer et al. (1995) heranziehen.

Eine Unterversorgung mit einer Aminosäure äußert sich durch ein niedriges Plasmaniveau, welches erst auf Normalniveau ansteigt, wenn der Bedarf gedeckt ist. Umso deutlicher eine Aminosäure hingegen den Bedarf übersteigt, umso stärker erhöht sich der Gehalt im Blut (Almquist 1954). Hierbei kommt es in der Regel zu linearen Anstiegen (Whitehouse et al. 2017). Allgemein sinkt die Tendenz einer Anreicherung der Aminosäuren im Blut, wenn die Zufuhr dem Bedarf entspricht. Unter optimalen Versorgungsbedingungen wird deshalb davon ausgegangen, dass die Aminosäuren mit der höchstmöglichen Geschwindigkeit aus dem Blut resorbiert werden (Almquist 1954).

Insgesamt sind die Aminosäurekonzentrationen bei Tieren der RPAA- signifikant niedriger als bei denen der CON-Gruppe ($P=0,005$). Dies spiegelt sich auch im Gehalt an essenziellen Aminosäuren (EAA) wider ($P=0,04$), wobei bei den nicht-essenziellen Aminosäuren (NEAA) nur eine Tendenz dazu besteht ($P=0,07$). Für die einzelnen Aminosäuren ist aber nur bei Threonin, Glutamin und Valin ein signifikanter Effekt nachzuweisen. Schwab et al. (1992) beobachteten ähnliche Veränderungen bei Infusionen mit Methionin und Lysin im Vergleich zu reinen Methionin-Infusionen. Hierbei sank der Plasmagehalt an EAA und NEAA, wobei sich in diesem Fall Histidin, Leucin und Valin als signifikant niedriger zeigten. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass die Aminosäureversorgung nicht identisch ist, da es sich um unterschiedliche Grundrationen handelte. Schwab et al. (1992) vermuteten, dass es zu einem erhöhten Verbrauch an allen Aminosäuren kommt, da das Aminosäureprofil durch die Supplementation limitierender Aminosäuren optimiert wird und dadurch mehr Proteine gebildet werden können.

In anderen Versuchen konnte über einen Anstieg an Methionin bzw. Lysin im Plasma gezeigt werden, dass die pansengeschützten Aminosäuren aufgenommen werden. Dabei handelt es sich um Verlaufskontrollen nach der Fütterung (Graulet et al. 2005; Toledo et al. 2017). In dem in dieser Arbeit durchgeführten Versuch erfolgte die Blutentnahme morgens vor der Durchführung des OPU. Graulet et al. (2005) konnte darstellen, dass die Konzentration von Methionin im Plasma vier Stunden nach Fütterung von HMBi einen Peak erreicht und anschließend wieder auf Basalniveau abfällt.

Eine unzureichende Bioverfügbarkeit der pansengeschützten Aminosäuren muss auch immer in Betracht gezogen werden. Diese variiert beispielsweise bei pansengeschützten Lysin-Produkten

sehr stark je nach Produktart (Whitehouse et al. 2017). Mit Lipiden ummanteltes Lysin führte laut einigen Studien zu einem Anstieg des Lysingehaltes im Plasma, wobei wiederum bei anderen kein Anstieg beobachtet wurde (Reiners et al. 2017). Die Ursachen hierfür können vielfältig sein. Neben einer schlechteren Bioverfügbarkeit als angenommen, kann die Bioverfügbarkeit auch durch den Mischprozess sowie eine verlängerte Kontaktzeit mit der Trockenmischration beeinträchtigt werden (Ji et al. 2016; Reiners et al. 2017). HMBi hingegen gilt als zuverlässiges Supplement und führt wie schon beschrieben zu deutlichen Anstiegen des Plasmaspiegels von Methionin (Graulet et al. 2005). Allgemein deuten die Unterschiede in den Aminosäurekonzentrationen im Plasma darauf hin, dass über die Supplementation von Methionin und Lysin das Aminosäureprofil der Ration optimiert wurde.

5.5 MessengerRNA-Expressionsmuster

Über das Messenger RNA-Expressionsmuster wurde das Transkriptionsmuster entwicklungsrelevanter Gene bestimmt, die Aufschluss über die Qualität der Embryonen bringen und gleichzeitig für die Studie gewählte Parameter beleuchten.

Keine Unterschiede zeigten sich bei der Expression von Interferon tau, was ein Indikator dafür ist, dass die Embryonen ähnliche Qualitäten aufweisen, da das daraus resultierende Protein vor allem der maternalen Erkennung der Trächtigkeit dient (Hernandez-Ledezma et al. 1993; Kubisch et al. 1998). Eine schwächere Expression des Heat shock Proteins 1 (HSPA1A) bei der RPAA-Gruppe in Blastozysten von Tag sieben und Tag acht könnte jedoch ein Indiz dafür sein, dass die Supplementation von Methionin und Lysin den oxidativen Stress (Pajares and Markham 2011) für Embryonen reduziert. HSPA1A ist auch ein sensibler Indikator für Umweltstress (Wrenzycki et al. 1998, 1999; Russell et al. 2006) und kann dadurch induziert werden. Durch Fütterung von pansengeschütztem Lysin bei Milchkühen konnte ebenso eine verminderte Expression von Genen festgestellt werden, die mit oxidativem Stress assoziiert werden. Hierbei wurden jedoch Zellen der Plazenta analysiert (Guadagnin et al. 2023).

Die Untersuchungen der Methioninadenosyltransferasen MAT2A und MAT2B ergaben Tendenzen zu einer geringeren Expression bei Embryonen der RPAA-Gruppe. Nur bei MAT2B von sieben Tage alten Embryonen sind die Unterschiede signifikant zur CON-Gruppe, was jedoch darauf hinweist, dass die Synthese von S-Adosylmethionin (McFadden et al. 2020) über eine Supplementation von Methionin und Lysin beeinträchtigt wurde. S-Adosylmethionin ist der

wichtigste Methyldonor (Pajares and Markham 2011) und könnte somit auch zu einer geringeren globalen Methylierung der DNA bei Embryonen der RPAA-Gruppe führen.

Ebenso war die Expression der DNA-Methyltransferase 1A (DNMT1A) in Blastozysten von Tag sieben der CON-Gruppe signifikant höher als in denen der RPAA-Gruppe. DNMT1 ist allen voran für den Erhalt von Methylierungsmustern nach der DNA-Replikation zuständig (Wrenzycki et al. 2001b; Grohmann et al. 2005; Li and Zhang 2014). Eine geringere Expression von DNMT1 könnte damit zusammenhängen, dass weniger DNMT1 benötigt wird, da der globale Methylierungsstatus bei den entsprechenden Embryonen geringer ist. Acosta et al. (2016) zeigte, dass Embryonen von Kühen, die bis zum 30. Tag nach der Kalbung pansengeschütztes Methionin und anschließend die Kontrollration erhielten, eine geringere DNA-Methylierung aufwiesen als Embryonen von Kühen, die ausschließlich die Kontrollration erhielten. Eine geringere DNA-Methylierung kann durch aktive oder passive Demethylierung erfolgen. Aktive DNA-Demethylierung umfasst die Umwandlung von Methylcytosin zu Hydroxymethylcytosin und den anschließenden Basenaustausch mit unmethyliertem Cytosin. Die passive Demethylierung wird auch als Replikations-abhängige Verdünnung bezeichnet, da die Übertragung der Methylierungsmuster fehlschlägt, wie in diesem Fall durch eine reduzierte Expression von DNMT1 (Jeffries 2018).

Bonilla et al. (2010) zeigten, dass extrazelluläres Methionin keinen Effekt auf die DNA-Methylierung von In-vitro-kultivierten Embryonen hat. Sie gehen davon aus, dass die Vorräte an Methionin in den Oozyten ausreichend sind. Insgesamt spricht dies dafür, dass die Supplementation von Methionin langfristige Folgen für die Methylierung haben kann und sich nicht unbedingt akut beeinflussen lässt.

Die Expression von DNMT3A war bei Embryonen der RPAA-Gruppe signifikant verringert in Blastozysten von Tag sieben und Tag acht. Da DNMT3A hauptsächlich für De-novo-Methylierungen zuständig ist (Okano et al. 1998), ist es wahrscheinlich, dass diese bei den Embryonen der RPAA-Gruppe geringer ausfällt. Dies könnte ebenso zu einer geringeren globalen Methylierung der DNA im Vergleich zu Embryonen der CON-Gruppe führen. Dadurch, dass in-vivo generierte Embryonen geringere DNMT-Transkriptionsgehalte enthalten als in-vitro generierte (Wrenzycki et al. 2001b), können geringere DNMT-Transkriptionsgehalte insgesamt als positiv betrachtet werden.

Allgemein lässt sich erkennen, dass die Blastozysten der RPAA-Gruppe eine geringere Expression von allen untersuchten Genen aufweist, bis auf IFNT in Blastozysten von Tag acht, welches fast identisch zur Kontrollgruppe ist. Ähnliches beobachteten Peñagaricano et al. (2013) bei den Embryonen von Milchkühen, die mit pansengeschütztem Methionin gefüttert wurden. Mittels RNA-Sequenzierung untersuchten sie 10.662 Gene und von diesen Genen zeigten 276 einen signifikanten

Effekt. Zweiundsiebzig Prozent wiesen eine verminderte Expression auf. Zudem wurden von den 30 signifikantesten Genen nur zwei Gene durch Methioninsupplementation stärker exprimiert. Wieso es zu einer verminderten Expression dieser Gene kommt, ist nicht geklärt. Die Methylierung der DNA nimmt durch Methionin ab (Acosta et al. 2016), was durch die verminderte Produktion von DNMTs unterstützt wird, obwohl Methionin als Methyl donor gilt (Van den Veyver 2002; Peñagaricano et al. 2013; Li and Zhang 2014). Meist wird vermehrte Methylierung mit einer verringerten Genexpression assoziiert, wobei auch das Gegenteil der Fall sein kann (Barlow 1997; Van den Veyver 2002).

Eine Methioninsupplementierung kann eine Hypermethylierung der DNA in bestimmten Genomregionen hervorrufen. Aufgrund des zirkulären Charakters des Methioninzyklus' kann ein Methioninüberschuss die DNA-Methylierung beeinträchtigen, indem die Remethylierung von Homocystein gehemmt wird (Waterland 2006). Unter bestimmten Umständen kann eine Supplementierung mit Methionin aber auch zu einer Hypomethylierung führen, indem die Remethylierung von Homocystein gehemmt wird (Waterland 2006).

Es ist jedoch plausibel, dass diätetisches Methionin auch die epigenetische Genregulation auf der Ebene der Histon-Methylierung beeinflussen kann (Waterland 2006). Durch posttranslationale Modifikationen an Histonen kann die DNA kondensiert oder geöffnet werden (Jeffries 2018). Inwiefern die Versorgung durch Methionin und Lysin eine Rolle bei dieser Regulation spielt, ist nicht bekannt. Jedoch treten die meisten Modifikationen an Lysinresten auf (Lawrence et al. 2016; Jeffries 2018). Zudem gelten Histon-Methylierungen als wichtigste Modifikationen (Zhang et al. 2021), wobei Methionin als Methylquelle dienen kann (Ikeda et al. 2010).

5.6 Multiple-Reaction Monitoring (MRM)

Insgesamt sollten alle Ergebnisse mit Vorsicht betrachtet werden, da keine der ausgewerteten Komponenten eine signifikante ($P \geq 0,05$) False Discovery Rate (FDR) aufweist, welche bei dieser großen Anzahl an Tests beachtet werden muss (Benjamini and Hochberg 1995; Green and Diggle 2007).

5.6.1 Lipidom

5.6.1.1 Unreife Oozyten

Unter den signifikanten Analyten bei unreifen Oozyten finden sich neun Triacylglyceride (TAG) und ein Phosphatidylcholin (PC 38:3), welche allesamt einen höheren Gehalt in Oozyten der CON aufweisen. Fünf von ihnen enthalten zudem die Fettsäuren 18:1, zwei 16:0 und jeweils eine 18:0 und 16:1. Im Fettsäuremuster der Milch von Kühen konnten Rulquin et al. (2006) z.B. beobachten, dass sich der Anteil an 18:0 Fettsäuren durch pansengeschütztes Methionin erhöht. Eine mögliche Erklärung für die Veränderungen bei unreifen Oozyten könnte sein, dass durch Methionin vermehrt 18:0 Fettsäuren zirkulieren und dadurch andere Fettsäuren wie z.B. 18:1 vermindert eingelagert werden, sich der Anteil an eingelagerten 18:0 Fettsäuren allerdings nicht signifikant ändert. Stearinsäure (18:0) gehört zu den langkettigen Fettsäuren (13 bis 21 C-Atome). Stearinsäure (18:0) ist mit Laurinsäure (12:0), Myristinsäure (14:0) und Palmitinsäure (16:0), die in der Natur am häufigsten vorkommende gesättigte Fettsäure. Gehalte an kürzeren Fettsäuren wie Palmitinsäure werden selten durch Diäten beeinflusst, da diese in großen Mengen endogen synthetisiert werden können (Flock and Kris-Etherton 2013). Durch Stearoyl-CoA-Desaturasen können jedoch auch Oleoyl-CoA (18:1 omega-9 (n-9)) bzw. Palmitoleoyl-CoA (16:1 n-7) gebildet werden. Sie fügen eine Doppelbindung am neunten Kohlenstoffatom in Stearoyl-CoA und Palmitoyl-CoA ein. Dies könnte das Vorhandensein von Ölsäure (18:1 n-9) erklären, welche in allen Geweben vorkommt und in TAGs fast die Hälfte der gesamten Fettsäuren ausmacht (Flock and Kris-Etherton 2013). Ein erhöhter Gehalt von Ölsäuren kann ebenfalls bei Kühen beobachtet werden, die sich in einer negativen Energiebilanz befinden. Durch die vermehrte Freisetzung von NEFAs ins Blut wird die Aktivität der Desaturasen gesteigert, um die ungesättigten Fettsäuren zu entgiften. Dies kann im Blut sowie in Oozyten beobachtet werden (Furukawa et al. 2022). Da die Fettsäuren in Triglyceriden gebunden sind, könnten die Veränderungen darauf hinweisen, dass es sich hierbei um kein akutes Geschehen handelt, sondern die Kühe vielleicht in den Tagen oder Wochen zuvor unter einer Ketose litten. Durch eine vermehrte Bildung von VLDLs kann Methionin das Risiko einer Fettleber verringern und somit Ketosen abmildern (Abbasi et al. 2017).

Rulquin et al. (2006) beobachtete zudem, dass durch HMBi- Supplementation der Gehalt an ungeraden Fettsäuren in der Milch zunimmt. Lipide mit einer ungeraden Anzahl an Kohlenstoffatomen wurden allerdings nicht untersucht, da diese in Oozyten und Embryonen nicht vorkommen (de Lima et al. 2018).

Da neun TAG-Reste einen signifikant höheren Anteil in der CON-Gruppe zeigen, besteht die Vermutung, dass unreife Oozyten aus dieser Gruppe mehr TAG enthalten. Acosta et al. (2016) konnte für Embryonen von Kühen, die mit pansengeschütztem Methionin gefüttert wurden, einen höheren Lipidgehalt nachweisen. Deshalb stellt sich die Frage, ob die Lipidanreicherung schon im Oozytenstadium stattfindet. Allerdings weist der relative Anteil aller TAG-Reste zusammengenommen keinen signifikanten Effekt auf. Über die MRM-Analyse lässt sich allerdings keine Aussage über die Gesamtmenge an Lipiden treffen, da eine quantitative Analyse nur mit internem Standard (IS) möglich gewesen wäre (Holčapek et al. 2018). Der IS hätte ein Analogon des Analyten sein müssen (Wang et al. 2017), was in diesem Fall nicht praktikabel war, da es sich um eine Vielzahl unterschiedlicher Analyten handelte. Eine relative Quantifizierung ist trotzdem möglich, indem man beispielsweise die einzelnen Spektren durch den Gesamtionenstrom (TIC) teilt (Franco et al. 2018; de Lima et al. 2018).

Die CON-Gruppe weist zudem einen höheren Gehalt an Phosphatidylcholin (38:3) auf, welches zu den Glycerophospholipiden gehört und wie andere Phosphatidylcholine ein Bestandteil der Lipiddoppelschicht ist. Wieso der Gehalt von PC (38:3) in der CON-Gruppe erhöht ist, ist unklar.

5.6.1.2 Reife Oozyten

PCp (36:5), PC (36:0) bzw. PCp (38:6), PCo (36:0) und TAG (60:4) mit der Fettsäure (18:1) weisen einen signifikanten p-Wert mit erhöhtem Gehalt in der CON-Gruppe auf. Der erhöhte Gehalt an TAG (60:4) mit der Fettsäure (18:1) ist eine Veränderung wie auch schon bei den unreifen Oozyten beschrieben. Möglicherweise kam es bereits zu einer Anpassung des Lipidmusters (Martin und Parton 2006) durch die Reifung oder das Reifungsmedium, weshalb nur noch eine Komponente signifikant ist. Reife Oozyten unterscheiden sich von unreifen Oozyten in ihrem Lipidom (de Lima et al. 2018)

Die weiteren signifikanten Komponenten gehören zu der Gruppe der Etherlipide. PCp steht für den Alkenyl-Ether- und PCo für den Alkyl-Ether-Substituenten von PC an der Ester-Carbonyl-Gruppe (Jiménez-Rojo und Riezman 2019). Beide teilen sich den ersten Syntheseschritt. Erstgenannte Alkenyl-Ether werden auch Plasmalogene genannt und sind die am besten untersuchten Etherlipide. Etherlipide werden eher vernachlässigt, obwohl sie etwa 20 % des Phospholipidgehaltes von Metazoen ausmachen und ihre Bedeutung durch die Schwere der Erbkrankheiten deutlich wird, bei denen die Etherlipidsynthese unterbrochen oder beeinträchtigt wird (Jiménez-Rojo und Riezman 2019). Sie sind Hauptbestandteile biologischer Membranen, wobei ihre molekularen Funktionen noch nicht vollständig geklärt sind (Jiménez-Rojo und Riezman 2019). Sie sollen beispielsweise zur

Bildung von Lipidtröpfchen beitragen und antioxidative Funktionen übernehmen (Jiménez-Rojo and Riezman 2019; Hossain et al. 2020). Über die molekularen Unterschiede können sie sich im Schmelzpunkt, der Zusammenlagerung in Membranen und der Interaktion mit anderen Lipiden unterscheiden. Zudem gilt die Vinylether-Bindung bei Alkenyl-Ethern als sehr reaktiv (Jiménez-Rojo und Riezman 2019).

Dennoch ist die Funktion der Plasmalogene während der Eizellreifung und der Embryonalentwicklung nach wie vor unbekannt. Darüber hinaus könnte sich die Zusammensetzung der Membranphospholipide je nach Reifungsstadium oder auch der Herkunft der Eizelle unterscheiden (Prates et al. 2014).

5.6.1.3 Expandierte Blastozysten

Die Gehalte von PC (34:2) und PC (34:1) sind signifikant höher bei RPAA-Gruppe. O-Behenoylcarnitin hingegen weist bei der CON-Gruppe einen höheren Gehalt auf. PC (34:1) kommt in großen Anteilen bei Oozyten und Embryonen vor und gilt als Hauptbestandteil der Zellmembran (Ferreira et al. 2010, 2015). Ähnliches gilt vermutlich auch für PC (34:2). Ein höherer relativer Anteil könnte ein Hinweis dafür sein, dass die Zellzahl bei der RPAA-Gruppe höher war. Ein Unterschied ist dabei nicht verwunderlich, da die Embryonen zwar dasselbe Entwicklungsstadium aufweisen, aber die Anzahl der Zellen variieren kann. Eine Aussage über die Qualität lässt sich darüber nicht treffen. In dieser Arbeit wurden die Zellzahlen der einzelnen Blastozysten nicht bestimmt. Die Zellzahl könnte durch die Messung eines Gentranskriptes, dessen Häufigkeit nicht durch die Behandlung beeinflusst wird, bestimmt werden. Hierfür könnten sich beispielsweise Houskeeping-Gen eignen.

O-Behenoylcarnitin gehört zu den Acylcarnitinen und ist der Behensäure (22:0) -ester von Carnitin. Der körpereigene Carnitinpool wird aus L-Carnitin, kurz-, mittel- und langkettigen Acylcarnitinen gebildet (Reuter und Evans 2012). O-Behenoylcarnitin ist ein sehr langkettiges Acylcarnitin ($C \geq 22$), welches zunächst mittels unvollständiger β -Oxidation in Peroxisomen zu kurz- und mittelkettigen Acylcarnitinen umgewandelt werden muss (Reuter und Evans 2012). Anschließend können die kurz- und mittelkettigen Acylcarnitine aus dem Zytoplasma in die Mitochondrien für die vollständige β -Oxidation transportiert werden (Reuter und Evans 2012). Peroxisomen wirken sich zudem auf den Stoffwechsel reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) aus und sind dadurch wichtig für die Balance des zellulären Redox-Gleichgewichtes (Islinger et al. 2018).

Sowohl der Anstieg der β -Oxidation als auch die Anhäufung von Fettsäuren und ihren Metaboliten, insbesondere langkettigen Acyl-CoAs und Acylcarnitinen, sind mit einer erhöhten ROS-Produktion

und nachfolgendem oxidativen Stress verbunden. Diese Fettsäurebedingte ROS-Produktion wird mit mitochondrialer Dysfunktion in Verbindung gebracht (Dambrova et al. 2021).

Insgesamt ist damit eine verringerte Konzentration von O-Behenoylcarnitin in den Embryonen der Versuchsgruppe als positiv zu bewerten. Diese Veränderung weist daraufhin, dass die Supplementation von Methionin und Lysin dazu beitragen könnte, den oxidativen Stress zu reduzieren.

Acosta et al. (2016) stellten fest, dass Embryonen von Kühen, denen Methionin supplementiert wurde, einen höheren Lipidgehalt aufwiesen. Dies konnte nach der IVP nicht nachgewiesen werden, durch beispielsweise einen erhöhten Gehalt an TAGs oder anderen Veränderungen. Eine quantitative Bestimmung des gesamten Lipidgehaltes war allerdings mit der MRM-Analyse nicht möglich. Des Weiteren konnten Stella et al. (2024) einen höheren Gehalt an mehrfach ungesättigten Lipiden, insbesondere von TAGs und PCs, feststellen. Sie vermuten eine vermehrte Bildung von Desaturasen, durch eine erhöhte Verfügbarkeit an Methionin zu Beginn der Laktation. Hierfür gab es in dieser Arbeit keine Hinweise.

Allgemein konnten bei expandierten Blastozysten nur wenige Unterschiede im Lipidmuster festgestellt werden. Vermutlich liegt dies an den identischen Kultivierungsbedingungen, worüber sich die jeweiligen Gruppen einander angeglichen haben. Grundsätzlich sind alle Zellen (u.a. auch Embryonen) in der Lage, Lipide aufzunehmen bzw. abzugeben und sich dem jeweiligen Fettsäurespiegel anzupassen (Martin und Parton 2006).

5.6.2 Metabolom

Bei der Analyse des Metaboloms traten nur bei unreifen Oozyten Unterschiede auf. Dies könnte daran liegen, dass das Metabolom sehr dynamisch ist und ständigen Veränderungen unterliegt, welche sich über weite Konzentrationsbereiche erstrecken können (Lombard-Banek et al. 2017). Durch große Unterschiede zwischen individuellen Proben können andere Unterschiede verschleiert werden. Zudem ist es möglich, dass sich die unterschiedlichen Gruppen an Oozyten und Embryonen durch die identischen Medien und Kultivierungsbedingungen einander angeglichen haben. Dies liegt daran, dass Metaboliten als Endprodukte von Zellregulationsprozessen stark von den Umweltbedingungen abhängig sind (Singh und Sinclair 2007).

Unreife Oozyten weisen einen erhöhten Gehalt an Laurinsäure, Thymidin, D-Erythrose-4-phosphat und Acetylcarnitin in der RPAA-Gruppe auf.

Laurinsäure ist eine mittellange, zwölf Kohlenstoffatome enthaltende Fettsäure, der zahlreiche positive Effekte zugeschrieben werden (Tham et al. 2020). Alves et al. (2017) beschrieb beispielsweise, dass Laurinsäure den Blutdruck und den oxidativen Stress bei normotensiven und hypertensiven Ratten senkt. Des Weiteren weist Laurinsäure auch antibakterielle und antivirale Eigenschaften auf (Lieberman et al. 2006). Studien in Bezug auf Embryonen sind leider nicht bekannt.

In der Theorie lassen sich die Ergebnisse von Versuchen mit anderen antioxidative Substanzen, wie beispielsweise Glutathion, auf Komponenten wie Laurinsäure, übertragen, wobei Methionin oder Lysin in diesem Fall zu einer Erhöhung von Laurinsäure führte. Vor allem Methionin hat einen großen Einfluss auf das Redox-Gleichgewicht über Methioninsulfoxid (MetO), Homocystein oder auch als Vorläufer für die Synthese von Glutathion (Lobley 1992; Martínez et al. 2017; Aledo 2019). In einem In-vitro Versuch enthielten Embryonen, die ohne Methionin kultiviert wurden, mehr Glutathion als Embryonen, die mit Methionin kultiviert wurden (Bonilla et al. 2010) Dies könnte daran liegen, dass die Synthese reduziert ist oder Glutathion vermehrt verbraucht wird (Bonilla et al. 2010). Es kam jedoch zu keiner dosisabhängigen Abnahme des Glutathiongehaltes, was Bonilla et al. (2010) damit erklären, dass die Produktion freier Methioninradikale schon bei sehr geringen Konzentrationen gesättigt sein könnte. Die Zellfunktion wurde dadurch allerdings nicht eingeschränkt, da die Apoptoserate keine Unterschiede aufwies (Bonilla et al. 2010). In vivo kommt es allerdings nicht zu einem kompletten Fehlen von Methionin bei einer geringeren Versorgung der Versuchstiere. Deswegen war ein ähnlicher Effekt nicht zu erwarten.

Die Konzentration von Thymidin erweist sich bei unreifen Oozyten der RPAA-Gruppe als erhöht. Thymidin ist ein Pyrimidin-Desoxynucleosid und besteht aus der Nucleobase Thymin, die an Desoxyribose gebunden ist. Dabei handelt es sich um das DNA-Nucleosid „T“, das sich in doppelsträngiger DNA mit Desoxyadenosin („A“) paart. Es kann auch als DNA-Synthese-Inhibitor agieren, indem es Zellen zwischen der G1- und S-Phase vor der DNA-Replikation blockiert (Chen and Deng 2018). Die Purin- und Thymidinsynthese wird über den One-carbon Metabolismus reguliert, welcher hauptsächlich aus dem Folat- und der Methioninzyklus besteht (Lionaki et al. 2022).

D-Erythrose-4-phosphat ist ein Phosphorsäureester der Erythrose und Teil des Pentosephosphatwegs (Williams et al. 1980). Außerdem können einige Bakterien und Pflanzen daraus aromatische Aminosäuren wie Tyrosin, Phenylalanin und Tryptophan synthetisieren (Williams et al. 1980). Ein direkter Zusammenhang zu der Supplementation von Methionin und Lysin ist nicht bekannt, sowie der Einfluss einer erhöhten Konzentration in Embryonen oder Eizellen von Säugetieren.

Methionin und Lysin dienen als direkte Vorläufer von Carnitin (Carlson et al. 2007). Dadurch könnte es über die Supplementation von Methionin und Lysin zu einer erhöhten Synthese von Carnitin kommen, was den erhöhten Gehalt an Acetylcarnitin in unreifen Oozyten erklären würde. Acetylcarnitin ist der Essigsäureester von Carnitin, der den Transport von Acetyl-CoA in die Mitochondrien erleichtert und somit die Oxidation von Fettsäuren beschleunigt (Farrell et al. 1986; Chiechio et al. 2017). Zudem ist Acetylcarnitin das vorherrschende Acylcarnitin in den meisten Geweben (Farrell et al. 1986).

5.7 Ausblick

In Zukunft bedarf es noch weiteren Untersuchungen über die Einflüsse von Methionin und Lysin auf Oozyten und Embryonen. Die Rolle von Methionin und/oder Lysin während der Oozytenreifung *in vitro* ist beispielsweise noch unklar, welche Konzentrationen in dieser Phase der Entwicklung optimal wären bzw. ein Mangel vorliegt. Außerdem fehlen noch Untersuchungen zu Lysin bezüglich eines Effekts nach Supplementation des Reifungsmediums.

In Bezug auf die Lipidanalyse konnte zwar dargestellt werden, dass sich die Lipidzusammensetzungen nur in wenigen Komponenten unterscheidet, es wäre jedoch noch zu klären, ob es quantitative Unterschiede bei den Oozyten und den IVP-Embryonen gibt. Außerdem sollte die Qualität der Embryonen mit weiterführenden Untersuchungen getestet werden. Dies könnte beispielsweise mit einer Lebend-Tot-Färbung untersucht werden oder im Optimalfall durch Transfers auf Empfängertiere über die Bestimmung der Anwachsrate. In diesem Zusammenhang wäre auch interessant ob Qualitätsunterschiede der Embryonen nach einer Kryokonservierung festzustellen sind.

Ein weiterhin spannendes Thema bleibt die Genexpression. Hierbei ist noch nicht geklärt, ob es auch Veränderungen auf Oozyten-Ebene gibt oder ob bei Embryonen auch noch weitere Gene durch Methionin und Lysin beeinflusst werden. Mittels RNA-Sequenzierung könnte das globale Transkriptom überprüft werden. Zudem sollte die DNA-Methylierung der Embryonen weitergehend untersucht werden.

Einflüsse einer pansengeschützten Methionin- und Lysin-Supplementation der Futtermittelration auf die Entwicklungskompetenz boviner Kumulus-Oozyten-Komplexe (gewonnen mittels OPU von Milchkühen)

Als Bausteine von Proteinen sind Aminosäuren wichtige Nahrungsbestandteile und von großer Bedeutung für die Reproduktionsleistung von Milchkühen. Ziel der Arbeit war es, darzustellen, inwieweit sich die Supplementation pansengeschützten Methionins und Lysins auf die Entwicklungskompetenz boviner Kumulus-Oozyten-Komplexe (KOK) auswirkt, da sie als die am stärksten limitierenden Aminosäuren für Milchkühe gelten.

Für den Versuch wurden 30 pluripare Holstein-Kühe in zwei Gruppen unterteilt, wobei 14 von ihnen post partum eine Supplementation der Futtermittelration mit pansengeschütztem Methionin und Lysin erhielten. Ab dem 40. Tag post partum erfolgte die KOK-Gewinnung mittels Ovum Pick-Up (OPU) achtmal im wöchentlichen Abstand. Vor dem OPU wurden Blutproben zur Bestimmung der Plasma-Aminosäurekonzentration genommen. Begleitende Milchuntersuchungen dienten der Leistungskontrolle der Kühe.

Bei dem durchgeführten OPU ergaben sich Wiederfindungsraten von $61,3 \pm 29,4$ % für die Versuchsgruppe (RPAA) und $62,6 \pm 33,5$ % für die Kontrollgruppe (CON). Die gewonnenen Oozyten von RPAA (n=240) und CON (n=299) wurden zu einem großen Teil der In-vitro Produktion zugeführt. Hierbei erwiesen sich die Teilungsraten (RPAA: $84,1 \pm 5,9$ %; CON: $81,9 \pm 8,6$ %) und die Entwicklungsraten (Tag 7: $18,3 \pm 4,4$ % vs. $15,4 \pm 8,9$ %) beider Gruppen als ähnlich.

Der Milchproteingehalt (RPAA $3,15 \pm 0,25$ %; CON $3,05 \pm 0,22$ %; $p = 3,3 \times 10^{-5}$) und der Milchfettgehalt (RPAA $4,18 \pm 0,5$ %; CON $4,01 \pm 0,5$ %; $p = 0,001$) von Kühen der RPAA-Gruppe zeigten eine geringfügige Erhöhung im Vergleich zu den Kühen der CON-Gruppe. Bezüglich der Milchmenge und des Milhharnstoffgehaltes wurden keine Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt.

Insgesamt sanken die Aminosäurekonzentrationen im Plasma durch die Supplementation pansengeschützten Methionins und Lysins ($p = 0,005$). Dieser Effekt spiegelte sich vor allem bei den essenziellen Aminosäuren wider ($p = 0,04$), wobei auch die nicht-essenziellen Aminosäuren eine Tendenz dazu zeigten. Zudem war der Gehalt von Threonin, Glutamin und Valin bei RPAA signifikant niedriger.

Zusammenfassung

Bei der RT-qPCR konnte eine signifikant geringere Expression von HSPA1A, DNMT1 und MAT2B bei expandierten Blastozysten der RPAA-Gruppe von Tag 7 im Vergleich zu denen der CON-Gruppe nachgewiesen werden.

Die Lipidanalyse ergab vor allem bei unreifen Oozyten Unterschiede, die sich als Veränderungen des Fettsäuremusters der eingelagerten Triacylglyceride (TAGs) darstellten. Insbesondere ließ sich ein erhöhter Gehalt an Ölsäure (18:1) in unreifen Oozyten von Kühen, die die Kontrollration erhielten, nachweisen. In reifen Oozyten zeigten sich diese Unterschiede lediglich bei einer Komponente (TAG (60:4) FA 18:1), es fanden sich allerdings größere Mengen an Etherlipiden in den reifen Oozyten der CON-Gruppe. Expandierte Blastozysten wiesen einen höheren Gehalt der Phosphatidylcholine (34:1) und (34:2) in der RPAA-Gruppe auf. O-Behenoylcarnitin kam hingegen vermehrt in Embryonen der CON-Gruppe vor.

Die Metabolomanalyse deckte lediglich Unterschiede bei den unreifen Oozyten auf. Diese stellten sich als erhöhte Gehalte an Laurinsäure, Thymidin, Erythrosephosphat und Acetylcarnitin in Oozyten der RPAA-Gruppe dar.

Abschließend kann festgehalten werden, dass die Supplementation pansengeschützten Methionins und Lysins keinen signifikanten Einfluss auf die Entwicklungsraten von Oozyten in der In-vitro Produktion hat, jedoch vermutlich zu einer Reduktion der DNA-Methylierung und des oxidativen Stresses von Oozyten und Embryonen führt und die Qualität verbessert.

7 SUMMARY

Effects of rumen-protected dietary methionine and lysine supplementation on the developmental competence of bovine cumulus-oocyte-complexes collected from dairy cows via OPU

Amino acids are important dietary constituents as they are a vital component of proteins and relevant for reproductive success in dairy cows. The aim of this thesis was to determine to what extent supplementation of rumen-protected methionine and lysine affects the developmental competence of bovine cumulus oocyte complexes (COC), as methionine and lysine are considered being the most limiting amino acids for dairy cows.

Thirty pluriparous Holstein cows were grouped three weeks before their expected calving date receiving identical diets. After calving, they were randomly allocated to two groups fed a total mixed ration supplemented with (N=14 cows; RPAA) or without (N=16 cows; CON) rumen-protected lysine and methionine. Starting from 40 days post-partum onwards, animals from both groups were assigned to an ovum pick-up (OPU) session once a week for at least 8 weeks. Prior to OPU, blood samples were collected for determination of amino acid concentration in plasma. Furthermore, milk samples were taken during the period of OPU for monitoring performances.

The calculated recovery rate based on the number of aspirated follicles and collected COC was similar for both groups ($61.3 \pm 29.4\%$ vs. $62.6 \pm 33.5\%$; $p > 0.05$). Collected COC from RPAA ($n=240$) and CON ($n=299$) were submitted to a standard in vitro production (IVP) protocol. Cleavage and developmental rates also showed similar results for both groups (RPAA: $84.1 \pm 5.9\%$, CON: $81.9 \pm 8.6\%$; day 7: RPAA: $18.3 \pm 4.4\%$, CON: $15.4 \pm 8.9\%$; $p > 0.05$).

Milk protein content (RPAA $3.15 \pm 0.25\%$; CON $3.05 \pm 0.22\%$; $p = 3.3 \times 10^{-5}$) and milk fat content (RPAA $4.18 \pm 0.5\%$; CON $4.01 \pm 0.5\%$; $p = 0.001$) of cows in the RPAA group showed a slight increase compared to those in the CON group. No differences were observed between the groups in terms of milk yield and milk urea content.

Amino acid concentration in plasma decreased with supplementation of rumen-protected methionine and lysine ($p = 0.005$). This effect was reflected mainly in essential amino acids ($p=0.04$), although non-essential amino acids also showed a tendency to do so. In addition, the levels of threonine, glutamine, and valine were significantly lower in RPAA.

Summary

RT-qPCR revealed significantly lower expression of HSPA1A, DNMT1 and MAT2B in expanded blastocysts of RPAA at day 7 compared to the CON group.

Lipid analysis revealed differences, especially in immature oocytes, which appeared as changes in the fatty acid pattern of stored triacylglycerides (TAGs). An increased content of oleic acid (18:1) was detected in immature oocytes from cows receiving the control ration. Mature oocytes differed in one component only (TAG (60:4) FA 18:1), but greater amounts of ether lipids were found in mature oocytes of the CON group. Expanded blastocysts contained higher levels of phosphatidylcholine (34:1) and (34:2) in the RPAA group. In contrast, O-behenoylcarnitine was more abundant in embryos of the CON group.

Metabolomic analysis revealed differences solely between immature oocytes. These presented as increased levels of lauric acid, thymidine, erythrose phosphate and acetylcarnitine in oocytes of the RPAA group.

In conclusion, supplementation of rumen-protected methionine and lysine had no significant effect on development rates of oocytes in in vitro production, whereas it probably led to a reduction in DNA methylation and oxidative stress of oocytes and embryos and improves the quality.

8 VERZEICHNISSE

8.1 Abkürzungsverzeichnis

AAA	Aminosäurenanalysator
ACN	Acetonnirtil
ANOVA	Analysis of variance (Varianzanalyse)
BSA	bovines Serumalbumin
cDNA	complementary Desoxyribonucleic acid
CON	Control \triangleq Kontrollgruppe
DMI	Trockenmasseaufnahme (dry matter intake)
DNA	Desoxyribonucleic acid
dNTPs	Deoxynukleosidtriphosphate
ESI	Elektrospray-Ionisation
et al.	et alli (und andere)
FAF	Fatty Acid Free (ohne Fettsäuren)
FBS	Fetal Bovine Serum (fetales Rinderserum)
FDR	False discovery rate
fg	Femtogramm
GfE	Gesellschaft für Ernährungsphysiologie
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl) -1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HHE	Hypotaurin, Heparin und Epinephrin
HMB	2- Hydroxy 4- methylbuttersäure
HMBi	Isopropylester von 2- Hydroxy 4- methylbuttersäure
HPLC	high performance liquid chromatographie
HSP	Heat shock protein
IFN τ	Interferon tau
IVC	In-vitro-Kultivierung
IVF	In-vitro-Fertilisation
IVM	In-vitro-Maturation
IVP	In-vitro-Produktion
KOK	Kumulus Oozyten Komplex
Lys	Lysin

Verzeichnisse

M	Molar/e
Met	Methionin
MetO	Methioninsulfoxid
M-MuLV	Moloney Murine Leukemia Virus
MOET	Multiple Ovulation Embryo Transfer
MP	metabolisierbares Protein
MPC	Magnetic Particle Concentrator
MRM	Multiple Reaction Monitoring
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
MUN	milk urea nitrogen
<i>m/z</i>	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
NBCS	newborn calf serum
NEFA	(engl.: non-esterified-fatty acid)
NEL	Netto-Energie-Laktation
nXP	nutzbares Rohprotein
OPU	Ovum Pick-Up
PBS	Phosphat Bufferd Saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion (engl.: Polymerase Chain Reaction)
PCA	Principal component analysis
PTFE	Polytetrafluorethylen
PUN	plasma urea nitrogen
PVA	Polyvinylalkohol
RNA	Ribonucleic acid (Ribonucleinsäure)
RPAA	Rumen-Protected Amino Acids (Pansengeschützte Aminosäuren) ≙ Versuchsgruppe
RT-qPCR	Reverse Transkriptase quantitative PCR
RUP	Pansenbeständiges Protein (engl.: Rumen-undegradable protein)
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler
SOF	Synthetic oviduct fluid
TALP	Tyrode's Albumin Laktat Pyruvat
TCM	Tissue Culture Medium
TIC	total ion current

Verzeichnisse

VLDL	very low-density lipoprotein
\bar{x}	arithmetischer Mittelwert
XP	Rohprotein

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Verstoffwechslung von HBMI-Produkt (von Natalie Ritz)	8
Abbildung 2: Darstellung von DNA, Histonen und deren epigenetische Modifikationen (von Natalie Ritz).....	13
Abbildung 3: Aufbau von Kemin LysiGEM, einem ummantelten Lysinpräparat.....	14
Abbildung 4: Anzahl boviner Embryonen von 2003 bis 2022 (Viana 2023).....	17
Abbildung 5: Vier Basisfunktionen eines Triple-Quadrupols	27
Abbildung 6: Graphische Darstellung der MS/MS-Scan-Modi.....	28
Abbildung 7: Versuchsschema mit acht OPU-Sitzungen	35
Abbildung 8: Sondenträger ¹ mit Ultraschallsonde ² , Metallführstab ³ und aufgesetzter Kanüle ⁴	36
Abbildung 9: Metallstab ¹ , Adapter ³ mit aufgesetztem PTFE-Schlauch ² und Punktionskanüle ⁴	37
Abbildung 10: Falconröhrchen ¹ , Silikongummistopfen ² , Schlauch ³ und Kanüle mit Heidelberger Verlängerung ⁴	37
Abbildung 11: Rollbarer Tisch mit technischer Ausrüstung: Ultraschallgerät ¹ , Absaugpumpe ² mit dazugehörigem Pedal ³ und Wärmeblock ⁴	38
Abbildung 12: Gewinnung der KOKs mittels OPU	39
Abbildung 13: Ultraschallbild während des OPU.....	40
Abbildung 14: Gewinnung der KOK mittels OPU unter Praxisbedingungen.....	40
Abbildung 15: Mikroskop ¹ mit aufliegendem Heiztisch ² und Steuergeräte mit eingebauter Heizplatte ³	41
Abbildung 16: Expandierte Blastozyste	43
Abbildung 17: Teilungs- und Entwicklungsraten	56
Abbildung 18: Milchleistung	57
Abbildung 19: Milchproteingehalt.....	58
Abbildung 20: Milchfettgehalt.....	58

Verzeichnisse

Abbildung 21: Milchwahnstoffgehalt.....	59
Abbildung 22: mRNA-Gehalte der expandierten Blastozysten von Tag 7 (P a:b ≤0,05)	62
Abbildung 23: mRNA-Gehalte der expandierten Blastozysten von Tag 8 (P a:b ≤0,05)	63
Abbildung 24: PCA der unreifen Oozyten (M1)	64
Abbildung 25: Heatmap der unreifen Oozyten (M1).....	64
Abbildung 26: PCA von reifen Oozyten (M1).....	65
Abbildung 27: Heatmap der reifen Oozyten (M1)	66
Abbildung 28: PCA von Blastozysten (M1)	66
Abbildung 29: Heatmap der Blastozysten (M1).....	67
Abbildung 30: PCA von unreifen Oozyten (Met 1)	68
Abbildung 31: Relative Konzentrationen von Laurinsäure	69
Abbildung 32: PCA der unreifen Oozyten (Met 2)	69
Abbildung 33: Heatmap der unreifen Oozyten (Met 2).....	70

8.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Futtermittelzusammensetzung.....	35
Tabelle 2: Verwendete Primer.....	50
Tabelle 3: Ansätze für die Reverse Transkriptase.....	51
Tabelle 4: Eingesetzte Embryonenäquivalente	53
Tabelle 5: Zusammensetzung des Reaktionsgemisches für RT-qPCR.....	53
Tabelle 6: Wiederfindungsraten	55
Tabelle 7: Aminosäurekonzentrationen im Plasma.....	60
Tabelle 8: t-Test der unreifen Oozyten (M1)	65
Tabelle 9: t-Test der reifen Oozyten (M1)	66
Tabelle 10: t-Test von Blastozysten (M1)	67
Tabelle 11: t-Test der unreifen Oozyten (Met 1).....	69
Tabelle 12: t-Test von unreifen Oozyten (Met 2)	70
Tabelle 13: PBS-Stocklösung.....	93
Tabelle 14: PBS-Gebrauchslösung	93
Tabelle 15: Zusätze für die PBS-Gebrauchslösung (OPU)	93
Tabelle 16: Zusätze für die PBS-Gebrauchslösung (Labor)	93

Verzeichnisse

Tabelle 17: TCM199-Gebrauchslösung.....	94
Tabelle 18: TCMair-Gebrauchslösung.....	94
Tabelle 19: Fert.-TALP-Stocklösung	95
Tabelle 20: Gentamycin-Lösung	95
Tabelle 21: Natrium-Pyruvat-Lösung.....	95
Tabelle 22: Fert.-TALP-Gebrauchslösung.....	95
Tabelle 23: Epinephrin-Lösung	96
Tabelle 24: Hypotaurin-Lösung.....	96
Tabelle 25: Heparin-Lösung	96
Tabelle 26: HHE-Stocklösung.....	96
Tabelle 27: HHE-Gebrauchslösung	96
Tabelle 28: Fertilisationsmedium	96
Tabelle 29: Spermfilter-Gebrauchslösung	97
Tabelle 30: SOF-Stocklösung A	97
Tabelle 31: SOF-Stocklösung B	97
Tabelle 32: SOF-Stocklösung C	97
Tabelle 33: SOF-Stocklösung D	98
Tabelle 34: Glutamin-Stocklösung.....	98
Tabelle 35: SOFaa-Kulturmedium.....	98
Tabelle 36: Chemikalien für die Amminosäurebestimmung	99
Tabelle 37: Lysis/Binding Buffer	100
Tabelle 38: Washing Buffer A	100
Tabelle 39: Washing Buffer B	100
Tabelle 40: Zusammensetzung des Master-Mixes	101
Tabelle 41: Verwendete Geräte	101
Tabelle 42: Labormaterial.....	102
Tabelle 43: Daten der RT-qPCR für expandierte Blastozysten von Tag 7	104
Tabelle 44: Daten der RT-qPCR für expandierte Blastozysten von Tag 8	104

9 ANHANG

9.1 Medien für das OPU und die IVP

Tabelle 13: PBS-Stocklösung

Substrat	Hersteller	Produkt-Nr.	g/500mL
Natrium-Pyruvat	Sigma-Aldrich	P3662	1,80
Streptomycinsulfat	Sigma-Aldrich	S6501	2,50
D-Glukose	Riedel-de-Haen	16301	50,00
CaCl ₂ x H ₂ O	Sigma-Aldrich	C7902	6,65
Penicillin G	Sigma-Aldrich	PENK	3,00

Tabelle 14: PBS-Gebrauchslösung

Substrat	Hersteller	Produkt-Nr.	1 L Gebrauchslösung
Dulbecco's phosphate buffered saline	Sigma-Aldrich	D5773	9,65 g
PBS-Stocklösung			10 mL
Aqua bidest			Ad 1,0 L

Tabelle 15: Zusätze für die PBS-Gebrauchslösung (OPU)

Substrat	Hersteller	Produkt-Nr.	Menge
Heparin	Sigma-Aldrich	H3149	11,2 mg
Fetal Bovine Serum	gibco	10500-064	10 mL

Tabelle 16: Zusätze für die PBS-Gebrauchslösung (Labor)

Substrat	Hersteller	Produkt-Nr.	Menge
Heparin	Sigma-Aldrich	H3149	11,2 mg
Bovines Serum Albumin (Fraktion V)	Sigma-Aldrich	A9647	1,0 g

Anhang

Tabelle 17: TCM199-Gebrauchslösung

Substrat	Hersteller	Produkt-Nr.	Menge
TCM199	Sigma-Aldrich	M2520	1,51 g
Gentamycinsulfat	Sigma-Aldrich	G3632	0,005 g
Natrium-Pyruvat	Sigma-Aldrich	P3662	0,0022 g
NaHCO ₃	Sigma-Aldrich	S4019	0,22 g
H ₂ O	Fresenius	Ampuwa®	Ad 100 mL
BSA (FAF)*	Sigma-Aldrich	A7030	0,1 g

pH-Wert durch Rühren auf 7,4 einstellen

*nach Einstellung des pH-Wertes dazugeben

Tabelle 18: TCMair-Gebrauchslösung

Substrat	Hersteller	Produkt-Nr.	Menge (g/100 mL)
TCM199	Sigma-Aldrich	M2520	1,51
Gentamycinsulfat	Sigma-Aldrich	G3632	0,005
Natrium-Pyruvat	Sigma-Aldrich	P3662	0,0022
NaHCO ₃	Sigma-Aldrich	S4019	0,035
H ₂ O	Fresenius	Ampuwa®	Ad 100 mL
BSA (FAF)*	Sigma-Aldrich	A7030	0,1

pH-Wert durch Zugabe von 1 M NaOH auf 7,2 einstellen

*nach Einstellung des pH-Wertes dazugeben

Anhang

Tabelle 19: Fert.-TALP-Stocklösung

Substrat	Hersteller	Produkt-Nr.	Konzentration (mM)	Menge (g/100 mL)
NaCl	Sigma-Aldrich	S5886	114,0	0,6658
KCl	Sigma-Aldrich	P5405	3,2	0,0239
NaHCO ₃	Sigma-Aldrich	S4019	25,0	0,2100
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	Sigma-Aldrich	S9638	0,3	0,0041
CaCl ₂ x 2H ₂ O	Sigma-Aldrich	C7902	2,0	0,0294
MgCl ₂	Sigma-Aldrich	M8266	0,5	0,0048
Phenolrot	Sigma-Aldrich	P5530	0,01 µg/mL	0,0010
Penicillamine	Sigma-Aldrich	P4875	20,0	0,0003
Na-Lactat (60 %)	Sigma-Aldrich	L4263	10,0	0,1860
H ₂ O	Fresenius	Ampuwa®		Ad 100 mL

Tabelle 20: Gentamycin-Lösung

Substrat	Hersteller	Produkt-Nr.	Menge
Gentamycinsulfat	Sigma-Aldrich	G3632	50 mg
H ₂ O	Fresenius	Ampuwa®	Ad 1,0 mL

Tabelle 21: Natrium-Pyruvat-Lösung

Substrat	Hersteller	Produkt-Nr.	Menge
Natrium-Pyruvat	Sigma-Aldrich	P3662	2 mg
Fert.-TALP-Stocklösung			1,0 mL

Tabelle 22: Fert.-TALP-Gebrauchslösung

Substrat	Hersteller	Produkt-Nr.	Menge
Fert.-TALP-Stocklösung			10 mL
BSA (Fraktion V)	Sigma-Aldrich	A9647	60 mg
Gentamycin-Lösung			1,0 µL
Natrium-Pyruvat-Lösung			140 µL

Tabelle 23: Epinephrin-Lösung

Substrat	Hersteller	Produkt-Nr.	Menge
Epinephrin	Sigma-Aldrich	E4250	1,83 mg
Natrium-Lactat (60 %)	Sigma-Aldrich	L4263	165,0 mg
Natriummetabisulfit	Sigma-Aldrich	71932	50,0 mg
H ₂ O	Fresenius	Ampuwa®	50,0 mL

Tabelle 24: Hypotaurin-Lösung

Substrat	Hersteller	Produkt-Nr.	Menge
Hypotaurin	Sigma-Aldrich	H1384	1,09 mg
H ₂ O	Fresenius	Ampuwa®	10,0 mL

Tabelle 25: Heparin-Lösung

Substrat	Hersteller	Produkt-Nr.	Menge
Heparin	Sigma-Aldrich	H3149	2,82 mg
H ₂ O	Fresenius	Ampuwa®	10,0 mL

Tabelle 26: HHE-Stocklösung

Substrat	Hersteller	Produkt-Nr.	Menge
Epinephrin-Lösung			4,0 mL
Hypotaurin-Lösung			10,0 mL
H ₂ O	Fresenius	Ampuwa®	26,0 mL

Tabelle 27: HHE-Gebrauchslösung

Substrat	Menge
HHE-Stocklösung	80,0 µL
Heparin-Lösung	40,0 µL

Tabelle 28: Fertilisationsmedium

Substrat	Menge
Fert.-TALP-Gebrauchslösung	2,0 mL
HHE-Gebrauchslösung	120,0 µL

Anhang

Tabelle 29: Spermfilter-Gebrauchslösung

Substrat	Hersteller	Produkt-Nr.	Menge
Spermfilter®	Gynotec	SPF100-0050	675 µL
Fert.-TALP- Gebrauchslösung			75 µL

Tabelle 30: SOF-Stocklösung A

Substrat	Hersteller	Produkt-Nr.	Konzentration (mM)	Menge
NaCl	Sigma-Aldrich	S5886	108,0	3,145 g
KCl	Sigma-Aldrich	P5405	7,2	0,267 g
KH ₂ PO ₄	Sigma-Aldrich	P5655	1,2	0,081 g
MgSO ₄	Sigma-Aldrich	M2643	1,5	0,091 g
H ₂ O	Sigma-Aldrich	W1503		49,2 mL
Natrium-Lactat*	Sigma-Aldrich	L4263	4,2	0,3 mL

*als letzte Reagenz hinzufügen

Tabelle 31: SOF-Stocklösung B

Substrat	Hersteller	Produkt-Nr.	Konzentration (mM)	Menge
NaHCO ₃	Sigma-Aldrich	S4019	25,0	1,05 g
Phenolrot	Sigma-Aldrich	P5530	1 mg/ 100 mL	0,005 mL
H ₂ O	Sigma-Aldrich	W1503		50,0 mL

Tabelle 32: SOF-Stocklösung C

Substrat	Hersteller	Produkt-Nr.	Konzentration (mM)	Menge
Natrium-Pyruvat	Sigma-Aldrich	P3662	0,73	0,04 g
H ₂ O	Sigma-Aldrich	W1503		5,0 mL

Anhang

Tabelle 33: SOF-Stocklösung D

Substrat	Hersteller	Produkt-Nr.	Konzentration (mM)	Menge
CaCl ₂ x 2H ₂ O	Sigma-Aldrich	C7902	1,78	0,131 mL
H ₂ O	Sigma-Aldrich	W1503		5,0 mL

Tabelle 34: Glutamin-Stocklösung

Substrat	Hersteller	Produkt-Nr.	Menge
Glutamin	Sigma-Aldrich	G6392	0,292 g
H ₂ O	Sigma-Aldrich	W1503	10,0 mL

Tabelle 35: SOFaa-Kulturmedium

Substrat	Hersteller	Produkt-Nr.	Konzentration (mM)	Menge
Myoinositol	Sigma-Aldrich	I7508	2,77	0,05 g
Tri-Natrium-Citrat	Sigma-Aldrich	S4641	0,34	0,01 g
Gentamycin	Sigma-Aldrich	P5655	50 µg/mL	0,005
H ₂ O	Sigma-Aldrich	W1503		78,0 mL
Glutamin-Stocklösung			0,2	100 µL
Stocklösung A				10,0 mL
Stocklösung B				10,0 mL
Stocklösung C				1,0 mL
Stocklösung D				1,0 mL
BME	Sigma-Aldrich	B6766	30 µL/mL	3,0 mL
MEM	Sigma-Aldrich	M7145	10 µL/mL	1,0 mL

9.2 Chemikalien für die Aminosäurenbestimmung im Plasma

Tabelle 36: Chemikalien für die Amminosäurebestimmung

Chemikalie	Art. Nr.	Firma	Sitz
Aminosäure-Standard-Lösung	A-9906	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Lithiumcitratpuffer A	80-2038-15	Laborbedarf Onken GmbH	Gründau, Deutschland
Lithiumcitratpuffer B	80-2038-16	Laborbedarf Onken GmbH	Gründau, Deutschland
Lithiumcitratpuffer C	80-2099-83	Laborbedarf Onken GmbH	Gründau, Deutschland
Lithiumcitratpuffer DII	80-2097-18	Laborbedarf Onken GmbH	Gründau, Deutschland
Lithiumcitratpuffer	80-2037-69	Laborbedarf Onken GmbH	Gründau, Deutschland
Norleucin	N6877	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
NaOH	80-2038-20	Laborbedarf Onken GmbH	Gründau, Deutschland
Ninhydrin	80-6000-13	Laborbedarf Onken GmbH	Gründau, Deutschland
Probenverdünnungspuffer (pH = 2,2)	80-2083-10	Laborbedarf Onken GmbH	Gründau, Deutschland
Sulfosalicylsäure	5965-83-3	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland

9.3 Medien für die RT-qPCR

Tabelle 37: Lysis/Binding Buffer

	Konzentration
Tris-HCl (pH 7,5)	100 mM
LiCl	500 mM
EDTA	10 mM
LiDS	1 %
Dithiothreitol (DTT)	5 mM

Tabelle 38: Washing Buffer A

	Konzentration
Tris-HCl (pH 7,5)	100 mM
LiCl	0,15 M
EDTA	1 mM
LiDS	0,1 %

Tabelle 39: Washing Buffer B

	Konzentration
Tris-HCl (pH 7,5)	10 mM
LiCl	0,15 M
EDTA	1 mM

Anhang

Tabelle 40: Zusammensetzung des Master-Mixes

Komponente	Firma	Produkt-Nr.	Enkonzentration	Volumen
MgCl₂ (50mM)	Invitrogen	18067-017	5 mM	2 µL
10 x PCR Puffer	Invitrogen	18067-017	1 x	2 µL
dNTPs (10 mM)	Eurogentec/Invitrogen	NU-0010- 50/18427013	1 mM	2 µL
Hexamer Primer (50 µM)	Invitrogen	N8080127	2,5 µM	1 µL
RNase-Inhibitor (20 U/µL)	Applied-Biosystems	N8080119	20 U	1 µL
M-MuLV-Reverse- Transkriptase (200 U/µL)	Invitrogen	28025-013	50 U	0,25 µL

9.4 Labormaterial und verwendete Geräte

Tabelle 41: Verwendete Geräte

Gerät	Firma	Sitz
Absaugpumpe, Aspirator 3	Labotect Labor-Technik- Göttingen GmbH	Rosdorf, Deutschland
Aminosäurenanalysator Biochrom 30+	Biochrom Ltd.	Cambridge, UK
Beheizbarer Tisch	Gynemed	Lensahn, Deutschland
Brutschrank, Heracell 150i	Thermo Fischer Scientific	Waltham, USA
Evaporator, MicroDancer Infrared Evaporation System	Zinsser Analytic	Frankfurt am Main, Deutschland
Heiztisch, HT200	Minitüb	Tiefenbach, Deutschland
Heiztisch	Medax GmbH und Co.KG	Neumünster, Deutschland
Mikro-Autosampller G1377A	Agilent Technologies	San Jose, CA, USA

Anhang

Mikrokonvex Sonde, GE 8C- RS, 3,5-10 MHz	GE Healthcare GmbH	Solingen, Deutschland
Mikrozentrifuge Fresco 21	Fischer Scientific GmbH	Schwerte, Deutschland
Stereomikroskope, SZX7	Olympus	Hamburg, Deutschland
Stereotisch/Heiztisch 180x180 mm	Minitüb	Tiefenbach, Deutschland
Thermocycler, Personal Cycler	Biometra, Analytik Jena AG	Jena, Deutschland
Thermoschüttler, TS-100	PEQLAB, VWR™	Radnor, USA
Triple-Quadrupole Massenspektrometer, QQQ6410	Agilent Technologies	San Jose, CA, USA
Thermocycler, CFX96 Real.Time System	Bio-Rad Laboratories	CA, USA
Ultraschallgerät, Logiq e	GE Healthcare GmbH	Solingen, Deutschland
Vortex, Reax top	Heidolph Instruments GmbH und Co.KG	Schwalbach, Deutschland
Wärmeschrank, UN 30	Memmert	Schwabach, Deutschland
Zentrifuge, Mikro 22 R	Hettich AG	Bäch, Schweiz
Zentrifuge, Minispin® plus	Eppendorf	Hamburg, Deutschland

Tabelle 42: Labormaterial

Labormaterial	Firma	Sitz
Falconröhrchen (50 mL)	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Heidelberger Verlängerungen	B. Braun Melsungen AG	Melsungen, Deutschland
Mikroliter-Probengefäß aus Kunststoff (Art. Nr. 6.021.233)	Laborbedarf Onken GmbH	Gründau, Deutschland
Mikropipetten, Blaubrand® intraMARK, 20 µL	Brand	Wertheim, Deutschland
Kanüle, kurzer Anschliff, 0,9 x 70 mm	Terumo Europe N.V.	Leuven, Belgien

Anhang

Kanüle, langer Anschliff, 1,2 x 40 mm	B. Braun, Melsungen AG	Melsungen, Deutschland
Magnetic Particle Concentrator	invitrogen, Thermo Fischer Scientific	Waltham, USA
Petrischale (ø35/60/94 mm)	Greiner Bio one GmbH	Kretschmünster, Österreich
Pipettierhelfer, micro-classic	Brand	Wertheim, Deutschland
Reagiergefäß (0,5/1,5/2 mL), SafeSeal micro tube	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Schlauch, PTFE, Innendurchmesser: 2 mm	Carl Roth GmbH+Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Septum-Deckel (Art. Nr. 6.021.233)	Laborbedarf Onken GmbH	Gründau, Deutschland
Sieb (Maschenweite 75 µm)	Retsch	Haan, Deutschland
Silikongummistopfen	Carl Roth GmbH+Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Stripper, EZ-Grip	Research Instruments Ltd	Falmouth, UK
Stripper-Spitzen, EZ-TIP, 135 µm	Research Instruments Ltd	Cornwall, UK
Thoma-Zählkammer	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Zentrifugationsfilter (Centrifuge tube filters, Costar® Spin-X®)	Corning Inc.	Corning, NY, USA

9.5 Daten der durchgeführten Untersuchungen

9.5.1 Daten der RT-qPCR

Tabelle 43: Daten der RT-qPCR für expandierte Blastozysten von Tag 7

	Tag 7								
	RPAA ●			CON ●			Kontrolle ●		
	n	MW	SEM	n	MW	SEM	n	MW	SEM
MAT2A	5	0,977	0,199	4	1,589	0,255	4	0,759	0,256
MAT2B	5	0,589	0,0916	4	1,488	0,268	4	0,408	0,111
IFNT	5	0,138	0,0462	4	0,162	0,0732	4	0,0901	0,028
HSPA1A	5	0,0601	0,00618	4	0,287	0,0906	4	0,321	0,05
DNMT1	5	0,223	0,0508	4	0,538	0,127	4	0,0889	0,0134
DNMT3A	5	0,389	0,0778	4	0,55	0,17	4	0,906	0,105

Tabelle 44: Daten der RT-qPCR für expandierte Blastozysten von Tag 8

	Tag 8								
	RPAA ●			CON ●			Kontrolle ●		
	n	MW	SEM	n	MW	SEM	n	MW	SEM
MAT2A	5	0,463	0,0239	4	0,852	0,269	4	0,951	0,212
MAT2B	5	0,286	0,0484	4	0,619	0,131	4	0,505	0,157
IFNT	5	0,353	0,266	4	0,304	0,174	4	0,224	0,0976
HSPA1A	5	0,0582	0,0161	4	0,161	0,0392	4	0,199	0,0409
DNMT1	5	0,0512	0,0234	4	0,0726	0,0315	4	0,0825	0,0243
DNMT3A	5	0,676	0,168	4	1,234	0,132	4	0,446	0,12

Anhang

9.6 Untersuchte Komponenten in der Massenspektrometrie

9.6.1 Komponenten M1

Name des untersuchten Lipids	MRM	Name des untersuchten Lipids	MRM
Nicht zugeordnet	244.1 -> 83.096	TAG(48:1)_FA 16:0	822.8 -> 549.8
(2E)-hexenedioylcarnitine, O-octanoylcarnitine	288.1 -> 85.1	TAG(48:1)_FA 16:1	822.8 -> 551.8
Decanoylcarnitine	316.2 -> 85.1	TAG(48:0)_FA 18:0	824.8 -> 523.8
O-(11-carboxyundecanoyl)carnitine	374.2 -> 60.1	TAG(48:0)_FA 18:2	824.8 -> 527.796
2-Hydroxymyristoylcarnitine, 3-hydroxytetradecanoylcarnitine	388.3 -> 60.1	TAG(48:0)_FA 16:0	824.8 -> 551.8
(7Z,10Z)-hexadecadienoylcarnitine	396.3 -> 85.1	PC (40:5)	836.6 -> 184.1
Palmitoylcarnitine, (5Z)-13-carboxytridec-5-enoylcarnitine	400.3 -> 60.1	PCp(42:6)	846.6 -> 184.1
O-(13-carboxytridecanoyl)carnitine	402.3 -> 60.1	TAG(50:4)_FA 18:1	846.8 -> 547.8
3-hydroxypalmitoleoylcarnitine, Heptadecanoyl carnitine	414.3 -> 60.1	TAG(50:4)_FA 18:2	846.8 -> 549.8
Stearidonyl carnitine	420.3 -> 60.1	TAG(50:4)_FA 16:0	846.8 -> 573.8
Linoelaidyl carnitine, O-linoleoylcarnitine, 9,12-Hexadecadienylcarnitine	424.3 -> 85.1	TAG(50:4)_FA 16:1	846.8 -> 575.8
O-oleoylcarnitine, Elaidic carnitine	426.4 -> 60.1	PCo(42:6)	848.6 -> 184.1
Stearoylcarnitine, hexadecanedioic acid mono-L-carnitine ester	428.4 -> 60.1	TAG(50:3)_FA 18:1	848.8 -> 549.8
(9Z,12Z,15Z)-3-hydroxyoctadecatrienoylcarnitine	438.3 -> 85.1	TAG(50:3)_FA 18:2	848.8 -> 551.8
3-hydroxylinoleoylcarnitine,	440.3 -> 85.1	TAG(50:3)_FA 16:0	848.8 -> 575.8
(9Z)-3-hydroxyoctadecenoylcarnitine	442.3 -> 60.1	TAG(50:3)_FA 16:1	848.8 -> 577.8
12-Hydroxy-12-octadecanoylcarnitine, 3-hydroxyoctadecanoylcarnitine	444.4 -> 60.1	TAG(50:2)_FA 18:0	850.8 -> 549.8
O-arachidonoylcarnitine	448.3 -> 85.1	TAG(50:2)_FA 18:1	850.8 -> 551.8
(11Z)-eicosenoylecarnitine	454.4 -> 85.1	TAG(50:2)_FA 16:0	850.8 -> 577.8
Arachidyl carnitine, O-[(9Z)-17-carboxyheptadec-9-enoyl]carnitine	456.4 -> 60.1	TAG(50:2)_FA 16:1	850.8 -> 579.8
O-(17-carboxyheptadecanoyl)carnitine	458.3 -> 60.1	TAG(50:1)_FA 18:0	852.8 -> 551.8
3-hydroxyarachidonoylcarnitine	464.3 -> 60.1	TAG(50:1)_FA 18:1	852.8 -> 553.8
Docosa-4,7,10,13,16-pentaenoyl carnitine, Clupanodonyl carnitine	474.4 -> 60.1	TAG(50:0)_FA 16:0	852.8 -> 579.8
(7Z,10Z,13Z,16Z)-docosatetraenoylcarnitine	476.4 -> 60.1	TAG(52:5)_FA 20:4	870.8 -> 549.796
O-behenoylcarnitine	484.4 -> 85.1	TAG(52:4)_FA 20:4	872.8 -> 551.8
SM (d18:1/14:0)	675.5 -> 184.1	TAG(52:4)_FA 18:1	872.8 -> 573.8
SM (d16:1/18:1)	701.6 -> 184.1	TAG(52:4)_FA 18:2	872.8 -> 575.8
PC (30:2)	702.5 -> 184.1	TAG(52:4)_FA 16:0	872.8 -> 599.8
SM (d18:1/16:0)	703.6 -> 184.1	TAG(52:3)_FA 18:1	874.8 -> 575.8
PC (30:1)	704.5 -> 184.1	TAG(52:3)_FA 18:2	874.8 -> 577.8
SM (d18:0/16:0)	705.6 -> 184.1	TAG(52:3)_FA 16:0	874.8 -> 601.8
PC (30:0)	706.5 -> 184.1	TAG(52:3)_FA 16:1	874.8 -> 603.8

Anhang

Cholesteryl nitrolinoleate	711.5696 -> 369.1	TAG(52:2)_FA 18:0	876.8 -> 575.8
PCo(32:3)	714.5 -> 184.1	TAG(52:2)_FA 18:1	876.8 -> 577.8
PCo(32:2)	716.6 -> 184.1	TAG(52:2)_FA 18:2	876.8 -> 579.8
PCo(32:1)	718.6 -> 184.1	TAG(52:2)_FA 16:0	876.8 -> 603.8
PC (32:3)	728.5 -> 184.1	TAG(52:2)_FA 16:1	876.8 -> 605.8
SM (d18:1/18:1)9Z))	729.6 -> 184.1	TAG(52:1)_FA 18:0	878.8 -> 577.8
PC (32:2)	730.5 -> 184.1	TAG(52:1)_FA 18:1	878.8 -> 579.8
SM (d18:1/18:0)	731.6 -> 184.1	TAG(52:1)_FA 16:0	878.8 -> 605.8
SM (d18:0/18:0)	733.6 -> 184.1	TAG(52:0)_FA 18:0	880.8 -> 579.8
PC (32:0)	734.6 -> 184.1	TAG(52:0)_FA 18:1	880.8 -> 581.8
PCo(34:3)	742.6 -> 184.1	TAG(52:0)_FA 16:0	880.8 -> 607.8
PCo(34:2)	744.6 -> 184.1	TAG(54:8)_FA 18:0	892.7 -> 591.696
PCo(34:1)	746.6 -> 184.1	TAG(54:8)_FA 18:1	892.7 -> 593.7
PCo(34:0)	748.6 -> 184.1	TAG(54:5)_FA 20:4	898.8 -> 577.8
PC (34:5)	752.5 -> 184.1	TAG(54:5)_FA 18:1	898.8 -> 599.8
PC (34:4)	754.5 -> 184.1	TAG(54:5)_FA 18:2	898.8 -> 601.8
PC (34:3)	756.6 -> 184.1	TAG(54:5)_FA 16:0	898.8 -> 625.8
SM (d16:1/22:1)	757.6 -> 184.1	TAG(54:4)_FA 20:4	900.8 -> 579.8
PC (34:2)	758.6 -> 184.1	TAG(54:4)_FA 18:1	900.8 -> 601.8
SM (d18:1/20:0)	759.6 -> 184.1	TAG(54:4)_FA 18:2	900.8 -> 603.8
PC (34:1)	760.6 -> 184.1	TAG(54:4)_FA 16:0	900.8 -> 627.8
SM (d18:0/20:0)	761.6 -> 184.1	TAG(54:3)_FA 18:0	902.8 -> 601.8
PC (34:0)	762.6 -> 184.1	TAG(54:3)_FA 18:1	902.8 -> 603.8
PCp(36:5)	764.6 -> 184.1	TAG(54:3)_FA 18:2	902.8 -> 605.8
PCo(36:5)	766.6 -> 184.1	TAG(54:3)_FA 16:0	902.8 -> 629.8
PCo(36:4)	768.6 -> 184.1	TAG(54:2)_FA 18:0	904.8 -> 603.8
PCo(36:3)	770.6 -> 184.1	TAG(54:2)_FA 18:1	904.8 -> 605.8
PCo(36:2)	772.6 -> 184.1	TAG(54:2)_FA 18:2	904.8 -> 607.8
PC (36:8)	774.5 -> 184.1	TAG(54:2)_FA 16:0	904.8 -> 631.8
PCo(36:1)	774.6 -> 184.1	TAG(54:1)_FA 18:0	906.8 -> 605.8
PCo(36:0)	776.6 -> 184.1	TAG(54:1)_FA 18:1	906.8 -> 607.8
PC (36:5)	780.6 -> 184.1	TAG(54:1)_FA 16:0	906.8 -> 633.8
PC (36:4)	782.6 -> 184.1	TAG(54:0)_FA 18:0	908.9 -> 607.896
SM (d18:2/22:1)	783.6 -> 184.1	TAG(56:8)_FA 18:1	920.8 -> 621.8
PC (36:3)	784.6 -> 184.1	TAG(56:8)_FA 16:1	920.8 -> 649.796
SM (d16:1/24:1)	785.6 -> 184.1	TAG(56:6)_FA 20:4	924.8 -> 603.8
PC (36:2)	786.6 -> 184.1	TAG(56:6)_FA 18:1	924.8 -> 625.8
SM (d16:1/24:0)	787.7 -> 184.1	TAG(56:5)_FA 18:1	926.8 -> 627.796
PC (36:1)	788.6 -> 184.1	TAG(56:5)_FA 18:2	926.8 -> 629.8
SM (d18:0/22:0)	789.7 -> 184.1	TAG(56:5)_FA 16:0	926.8 -> 653.8
PC (36:0); PCp(38:6)	790.6 -> 184.1	TAG(56:4)_FA 16:0	928.8 -> 655.8
PCo(38:6)	792.6 -> 184.1	TAG(56:3)_FA 18:1	930.8 -> 631.796
PCo(38:5)	794.6 -> 184.1	TAG(56:3)_FA 18:2	930.8 -> 633.8
PCo(38:4)	796.6 -> 184.1	TAG(56:1)_FA 20:0	934.9 -> 605.896
PC (38:7)	804.6 -> 184.1	TAG(56:1)_FA 18:2	934.9 -> 637.896
PCo(38:0)	804.7 -> 184.1	TAG(56:0)_FA 18:1	936.9 -> 637.896

Anhang

PC (38:6)	806.6 -> 184.1	TAG(56:0)_FA 18:2	936.9 -> 639.896
PC (38:5)	808.6 -> 184.1	TAG(58:8)_FA 20:0	948.8 -> 619.796
PC (38:4)	810.6 -> 184.1	TAG(58:7)_FA 20:0	950.8 -> 621.8
SM (d18:2/24:1)	811.7 -> 184.1	TAG(58:6)_FA 18:1	952.8 -> 653.8
PC (38:3)	812.6 -> 184.1	TAG(58:5)_FA 18:1	954.8 -> 655.8
SM (d18:1/24:1)15Z))	813.7 -> 184.1	TAG(58:3)_FA 18:1	958.9 -> 659.896
PC (38:2)	814.6 -> 184.1	TAG(58:2)_FA 18:1	960.9 -> 661.9
SM (d18:1/24:0)	815.7 -> 184.1	TAG(58:2)_FA 18:2	960.9 -> 663.9
PC (38:1)	816.6 -> 184.1	TAG(58:1)_FA 18:1	962.9 -> 663.9
SM (d18:0/24:0)	817.7 -> 184.1	TAG(58:0)_FA 16:1	964.9 -> 693.9
PCp(40:6)	818.6 -> 184.1	TAG(60:9)_FA 18:1	974.9 -> 675.896
PC (38:0)	818.7 -> 184.1	TAG(60:7)_FA 18:1	978.9 -> 679.896
PCo(40:6)	820.6 -> 184.1	TAG(60:4)_FA 20:4	984.9 -> 663.9
TAG(48:2)_FA 18:1	820.8 -> 521.8	TAG(60:4)_FA 18:1	984.9 -> 685.896
TAG(48:2)_FA 18:2	820.8 -> 523.8	TAG(60:2)_FA 20:0	988.9 -> 659.896
TAG(48:2)_FA 16:0	820.8 -> 547.8	TAG(60:2)_FA 18:1	988.9 -> 689.896
TAG(48:2)_FA 16:1	820.8 -> 549.8	TAG(60:0)_FA 20:0	992.9 -> 663.9
TAG(48:1)_FA 18:1	822.8 -> 523.8		

9.6.2 Komponenten M2

Namen des untersuchten Lipids	MRM	Namen des untersuchten Lipids	MRM
C12:1	197.2 -> 197.2	22:4 Cholesteryl ester, 20:3 Stigmasteryl ester	718.6158 -> 369.1
C12:0	199.2 -> 199.2	ecdysone palmitate, 22:3 Cholesteryl ester, 20:2 Stigmasteryl ester, 20:3 Sitosteryl ester	720.5435 -> 369.1
C14:1	225.2 -> 225.2	PE (34:0)	720.5539 -> 579.5539
C14:0	227.3 -> 227.3	Cholesteryl 11-hydroperoxy-eicosatetraenoate, 22:2 Cholesteryl ester, 20:1 Stigmasteryl ester, 20:2 Sitosteryl ester	722.5744 -> 369.1
C16:1	253.3 -> 253.3	PEo (36:5)	724.5277 -> 583.5277
C16:0	255.3 -> 255.3	22:1 Cholesteryl ester, 20:0 Stigmasteryl ester, 20:1 Sitosteryl ester	724.6628 -> 369.1
C18:4	275.3 -> 275.3	22:0 Cholesteryl ester, 20:0 Sitosteryl ester	726.6784 -> 369.1
C18:3	277.3 -> 277.3	PEo (36:3)	728.559 -> 587.559
C18:2	279.3 -> 279.3	PEo (36:2)	730.5746 -> 589.5746
C18:1	281.3 -> 281.3	PE (36:8)	732.46 -> 591.46
C18:0	283.3 -> 283.3	PS (32:2)	732.4811 -> 547.4811
C20:5	301.3 -> 301.3	22:3 Campesteryl ester	734.6471 -> 369.1
C20:4	303.3 -> 303.3	22:2 Campesteryl ester	736.6628 -> 369.1
C20:3	305.3 -> 305.3	PE (36:5)	738.507 -> 597.507
C20:1	309.3 -> 309.3	22:1 Campesteryl ester	738.6784 -> 369.1

Anhang

C20:0	311.3 -> 311.3	PG (32:0)	740.5172 -> 551.5172
C22:6	327.3 -> 327.3	PE (36:4)	740.5226 -> 599.5226
C22:5	329.3 -> 329.3	22:0 Campesteryl ester	740.6941 -> 369.1
C22:4	331.3 -> 331.3	PE (36:3)	742.5383 -> 601.5383
C22:1	337.3 -> 337.3	PE (36:2)	744.5539 -> 603.5539
C22:0	339.3 -> 339.3	PE (36:1)	746.5696 -> 605.5696
C24:5	353.3 -> 353.3	22:3 Stigmasteryl ester	746.6471 -> 369.1
C24:6	355.3 -> 355.3	PEp (36:6)	748.5277 -> 607.5277
C24:1	365.3 -> 365.3	22:2 Stigmasteryl ester, 22:3 Sitosteryl ester	748.6628 -> 369.1
C24:0	367.3 -> 367.3	PEo (38:6)	750.5433 -> 609.5433
C26:1	393.3 -> 393.3	22:1 Stigmasteryl ester, 22:2 Sitosteryl ester	750.6784 -> 369.1
C26:0	395.3 -> 395.3	PEo (38:5)	752.559 -> 611.559
C28:0	423.4 -> 423.4	24:1 Cholesteryl ester, 22:0 Stigmasteryl ester, 22:1 Sitosteryl ester	752.6941 -> 369.1
C30:0	451.4 -> 451.4	PEo (38:4)	754.5746 -> 613.5746
PS (14:1)	468.2358 -> 283.2358	22:0 Sitosteryl ester	754.7097 -> 369.1
C32:0	479.4 -> 479.4	PE (38:9)	758.4757 -> 617.4757
PE (18:1)	480.3086 -> 339.3086	PG (34:2)	764.5172 -> 575.5172
PSp (16:0)	482.2879 -> 297.2879	PE (38:6)	764.5226 -> 623.5226
PE (18:0)	482.3242 -> 341.3242	PG (34:1)	766.5328 -> 577.5328
PSo (16:0)	484.3035 -> 299.3035	PE (38:5)	766.5383 -> 625.5383
PE (20:4)	502.2929 -> 361.2929	PG (34:0)	768.5485 -> 579.5485
C34:0	507.5 -> 507.5	PE (38:4)	768.5539 -> 627.5539
PE (20:1)	508.3399 -> 367.3399	PE (38:3)	770.5696 -> 629.5696
PSo (18:0)	512.3348 -> 327.3348	PE (38:2)	772.5852 -> 631.5852
PG (16:0)	516.2668 -> 327.2668	PEp (40:7)	774.5433 -> 633.5433
PG (18:0)	530.3188 -> 341.3188	PS (36:8)	776.4498 -> 591.4498
PE (22:4)	530.3242 -> 389.3242	PG (36:8)	780.4546 -> 591.4546
PSo (20:0)	540.3661 -> 355.3661	PEo (40:5)	780.5903 -> 639.5903
PGp (20:0)	542.3552 -> 353.3552	PG (36:4)	788.5172 -> 599.5172
PGo (20:0)	544.3709 -> 355.3709	PS (36:2)	788.5437 -> 603.5437
LPG (20:0)	558.3501 -> 369.3501	PG (36:3)	790.5328 -> 601.5328
PI (14:1)	560.2566 -> 283.2566	PE (40:7)	790.5383 -> 649.5383
PG (20:0)	572.3294 -> 383.3294	PS (36:1)	790.5594 -> 605.5594
PG (22:6)	574.2875 -> 385.2875	PG (36:2)	792.5485 -> 603.5485
PG (22:0)	586.3814 -> 397.3814	PE (40:6)	792.5539 -> 651.5539
12:0 Cholesteryl ester	586.5219 -> 369.1	PG (36:1)	794.5641 -> 605.5641
14:1 Cholesteryl ester	612.5376 -> 369.1	PE (40:5)	794.5696 -> 653.5696
14:0 Cholesteryl ester	614.5532 -> 369.1	PGp (38:6)	796.5223 -> 607.5223
15:1 Cholesteryl ester	626.5532 -> 369.1	PE (40:4)	796.5852 -> 655.5852
PG (24:0)	628.392 -> 439.392	PS (38:7)	806.4968 -> 621.4968
15:0 Cholesteryl ester	628.5689 -> 369.1	PS (38:4)	812.5437 -> 627.5437
PI (20:5)	636.2879 -> 359.2879	PG (38:4)	816.5485 -> 627.5485
16:3 Cholesteryl ester	636.5376 -> 369.1	PS (38:2)	816.575 -> 631.575

Anhang

16:2 Cholesteryl ester, zymosteryl palmitoleate	638.5532 -> 369.1	PG (38:3)	818.5641 -> 629.5641
16:1 Cholesteryl ester	640.5689 -> 369.1	PS (38:1)	818.5907 -> 633.5907
16:0 Cholesteryl ester	642.5845 -> 369.1	PSp (40:6)	820.5488 -> 635.5488
16:3 Campesteryl ester	650.5532 -> 369.1	PS (40:4)	840.575 -> 655.575
16:2 Campesteryl ester	652.5689 -> 369.1	PSp (42:6)	848.5801 -> 663.5801
17:1 Cholesteryl ester; 16:1 Campesteryl ester	654.5845 -> 369.1	PI (34:2)	852.5332 -> 575.5332
PG (26:0)	656.4233 -> 467.4233	PG (40:0)	852.6424 -> 663.6424
16:0 Campesteryl ester	656.6002 -> 369.1	PI (34:1)	854.5489 -> 577.5489
16:3 Stigmasteryl ester	662.5532 -> 369.1	PI (36:4)	876.5332 -> 599.5332
18:3 Cholesteryl ester, 16:2 Stigmasteryl ester, 16:3 Sitosteryl ester	664.5689 -> 369.1	PI (36:3)	878.5489 -> 601.5489
18:2 Cholesteryl ester, zymosteryl oleate, 16:1 Stigmasteryl ester, 16:2 Sitosteryl ester	666.5845 -> 369.1	PI (36:2)	880.5645 -> 603.5645
18:1 Cholesteryl ester, 16:0 Stigmasteryl ester, 16:1 Sitosteryl ester	668.6002 -> 369.1	PI (36:1)	882.5802 -> 605.5802
18:0 Cholesteryl ester, 16:0 Sitosteryl ester	670.6158 -> 369.1	PlO (38:2), Plp (38:1)	894.6166 -> 617.6166
PS (28:1)	678.4342 -> 493.4342	PI (38:7)	898.5176 -> 621.5176
18:3 Campesteryl ester	678.5845 -> 369.1	PI (38:5)	902.5489 -> 625.5489
PS (28:0)	680.4498 -> 495.4498	PI (38:4)	904.5645 -> 627.5645
lanosteryl palmitoleate, 18:2 Campesteryl ester	680.6002 -> 369.1	PI (38:3)	906.5802 -> 629.5802
18:1 Campesteryl ester	682.6158 -> 369.1	PI (38:2)	908.5958 -> 631.5958
18:0 Campesteryl ester	684.6315 -> 369.1	PlO (40:4), Plp (40:3)	918.6166 -> 641.6166
20:5 Cholesteryl ester	688.5689 -> 369.1	PlO (40:3), Plp (40:2)	920.6322 -> 643.6322
PE (32:1)	690.507 -> 549.507	PI (40:6)	928.5645 -> 651.5645
20:4 Cholesteryl ester, 18:3 Stigmasteryl ester	690.5845 -> 369.1	PI (40:5)	930.5802 -> 653.5802
20:3 Cholesteryl ester, 18:2 Stigmasteryl ester, 18:3 Sitosteryl ester	692.6002 -> 369.1	PI (40:4)	932.5958 -> 655.5958
20:2 Cholesteryl ester, 18:1 Stigmasteryl ester, 18:2 Sitosteryl ester	694.6158 -> 369.1	Plp (42:6)	940.6009 -> 663.6009
20:1 Cholesteryl ester, 18:0 Stigmasteryl ester, 18:1 Sitosteryl ester	696.6315 -> 369.1		
20:0 Cholesteryl ester, 18:0 Sitosteryl ester	698.6471 -> 369.1		
PEo (34:2)	702.5433 -> 561.5433		
PS (30:2)	704.4498 -> 519.4498		
PEo (34:1)	704.559 -> 563.559		
20:3 Campesteryl ester	706.6158 -> 369.1		
lanosteryl oleate, 20:2 Campesteryl ester	708.6315 -> 369.1		
20:1 Campesteryl ester	710.6471 -> 369.1		
Cholesteryl nitrolinoleate	711.5696 -> 369.1		
20:0 Campesteryl ester	712.6628 -> 369.1		
22:6 Cholesteryl ester	714.5845 -> 369.1		
PE (34:2)	716.5226 -> 575.5226		

Anhang

22:5 Cholesteryl ester	716.6002 -> 369.1
PE (34:1)	718.5383 -> 577.5383

9.6.3 Komponenten Met1

Name des untersuchten Metaboliten	MRM	Name des untersuchten Metaboliten	MRM
2_L-2-Aminobutyric acid	104.1 -> 41	4_Pantothenic acid	220.1 -> 184.1
1_L-2-Aminobutyric acid	104.1 -> 58.1	6_Pantothenic acid	220.1 -> 70
11_Cytosine	112.1 -> 69	5_Pantothenic acid	220.1 -> 90.1
10_Cytosine	112.1 -> 94	5_Palmitic acid	255.2 -> 71.1
9_Cytosine	112.1 -> 95	4_Palmitic acid	257.2 -> 55.1
6_Uracil	113 -> 43	3_Palmitic acid	257.2 -> 57.1
5_Uracil	113 -> 70	6_Inosine	269.1 -> 110
4_Uracil	113 -> 96	5_Inosine	269.1 -> 119
3_L-Threonine	120.1 -> 102.1	4_Inosine	269.1 -> 137
5_L-Threonine	120.1 -> 57	3_Margaric acid	271.3 -> 55.1
4_DL-Homoserine; 4_L-Threonine	120.1 -> 74.1	2_Margaric acid	271.3 -> 57.1
3_Taurine	126 -> 108	1_Margaric acid	271.3 -> 71.1
5_Taurine	126 -> 64	5_Elaidic acid	283.3 -> 57.1
4_Taurine	126 -> 65	4_Elaidic acid	283.3 -> 67.1
3_Thymine	127.1 -> 110	3_Elaidic acid	283.3 -> 69.1
5_Thymine	127.1 -> 54	6_Guanosine	284.1 -> 110
4_Thymine	127.1 -> 56.1	5_Guanosine	284.1 -> 135
4_Creatine	132.1 -> 87.1	4_Guanosine	284.1 -> 152.2
3_Creatine	132.1 -> 90.1	6_Argininosuccinic acid	291.1 -> 116.1
4_Ribulose	133 -> 132.1	5_Argininosuccinic acid	291.1 -> 246.1
6_Ribulose	133 -> 58.1	7_Argininosuccinic acid	291.1 -> 70.1
5_Ribulose	133 -> 85	3_5'-CMP	324.1 -> 112.1
1_Ornithine	133.1 -> 116.1	5_5'-CMP	324.1 -> 95
2_Ornithine	133.1 -> 70.1	4_5'-CMP	324.1 -> 97
3_Adenine	136.1 -> 119	4_UMP	325 -> 113
4_Adenine	136.1 -> 92	3_UMP	325 -> 213
9_Hypoxanthine	137 -> 110	5_UMP	325 -> 97
8_Hypoxanthine	137 -> 119	5_cAMP	330.1 -> 119
10_Hypoxanthine	137 -> 94	4_cAMP	330.1 -> 136.1
3_Anthranilic acid	138.1 -> 120	3_cAMP	330.1 -> 268.3
5_Anthranilic acid	138.1 -> 65	5_D-Lactose	341.1 -> 97
4_Anthranilic acid	138.1 -> 92	3_Thiamine monophosphat	345.1 -> 122.1
4_O-Phosphoethanolamine	142 -> 42	2_Thiamine monophosphat	345.1 -> 126
3_O-Phosphoethanolamine	142 -> 44.1	1_Thiamine monophosphat	345.1 -> 224
4_meso-Erythritol	145 -> 104	4_D-Lactose	361 -> 343
6_meso-Erythritol	145 -> 58.1	3_D-Lactose	361 -> 352
5_meso-Erythritol	145 -> 84.1	5_Sucrose	365.1 -> 185
6_Oxoglutaric acid; 8_Oxoglutaric acid	147 -> 105.9	4_Sucrose	365.1 -> 203.1

Anhang

7_Oxoglutaric acid; 9_Oxoglutaric acid	147 -> 65	4_Maltose	365.1 -> 305.1
1_L-Lysine	147.1 -> 130.1	5_CDP	404 -> 112
6_Glutamine; 3_L-Lysine	147.1 -> 56.1	4_CDP	404 -> 208.1
2_L-Lysine	147.1 -> 84.1	6_CDP	404 -> 97
3_Ribose	151 -> 74	4_UDP	405 -> 96.9
2_Guanine	152 -> 109.9	5_ADG	428 -> 136.1
4_Pyroglytamic acid; 1_Acetaminophen (paracetamol)	152 -> 110	4_ADG	428 -> 348.1
1_Guanine	152 -> 135	6_ADG	428 -> 97
3_Pyroglytamic acid	152 -> 151.1	2_GDG	444 -> 135
5_Pyroglytamic acid	152 -> 70	1_GDG	444 -> 152.1
4_Xanthine	153 -> 110	3_GDG	444 -> 97
3_Xanthine	153 -> 136	1_FMNI	455.1 -> 213
5_Xanthine	153 -> 55	3_FMNI	455.1 -> 79
4_L-Arabitol	153.1 -> 117.1	2_FMNI	455.1 -> 97
6_L-Arabitol; 6_Xylitol	153.1 -> 57	4_CTP	483.9 -> 111.9
5_Xylitol	153.1 -> 61	5_ATP	508 -> 136.1
5_L-Arabitol	153.1 -> 69	4_ATP	508 -> 410
4_Xylitol	153.1 -> 73	6_ATP	508 -> 97
5_Allantoin	159 -> 116	6_ADG-Rib	560.1 -> 136.1
4_Allantoin	159.1 -> 61	5_ADG-Rib	560.1 -> 348.1
4_2-Amino adipic acid	162.1 -> 144.1	4_ADG-Rib	560.1 -> 542.1
6_2-Amino adipic acid	162.1 -> 55	4_ADG-Glu	589.1 -> 135.9
5_2-Amino adipic acid	162.1 -> 98.1	3_ADG-Glu	589.1 -> 428.1
6_D-Galactose	163.1 -> 61	6_NAD	664.1 -> 136.1
6_D-Glucose; 5_D-Galactose	163.1 -> 73	5_NAD	664.1 -> 348.1
5_D-Glucose	163.1 -> 85	4_NAD	664.1 -> 428
4_D-Galactose	163.1 -> 91	5_NADH	666.1 -> 514
4_D-Glucose	163.1 -> 97	4_NADH	666.1 -> 649.1
4_DL-3	167 -> 111	6_NADH	666.1 -> 91
6_DL-3	167 -> 65	6_NADP	744.1 -> 136.1
5_DL-3	167 -> 85	5_NADP	744.1 -> 508
5_Phosphoenol pyruvate; 8_phosphoenol pyruvate	169 -> 105	4_NADP	744.1 -> 604
4_Phosphoenol pyruvate; 7_phosphoenol pyruvate	169 -> 123	6_NADPH	746.1 -> 136.1
3_Phosphoenol pyruvate; 6_phosphoenol pyruvate	169 -> 151	5_NADPH	746.1 -> 302
5_Aconitic acid	175 -> 111	4_NADPH	746.1 -> 320.1
4_Aconitic acid	175 -> 139	3_Glycine	76 -> 30
6_Aconitic acid	175 -> 69	2_Glycine	76 -> 47
4_Shikimic acid	175.1 -> 129	1_Glycine	76 -> 48
5_Shikimic acid	175.1 -> 88	5_FAD	786.2 -> 136.1
4_Citrulline	176.1 -> 113.1	4_FAD	786.2 -> 348.1
3_Citrulline	176.1 -> 159.1	6_FAD	786.2 -> 437.1
5_Citrulline	176.1 -> 70.1	3_Alanine	90 -> 45
4_2-isopropylmalate; 5_2-Isopropylmalic acid	177.1 -> 131.1	2_Alanine	90 -> 72

Anhang

6_2-isopropylmalate; 7_2-Isopropylmalic acid	177.1 -> 71	5_Lauric acid	201.2 -> 55.1
5_2-isopropylmalate; 6_2-Isopropylmalic acid	177.1 -> 95	4_Lauric acid	201.2 -> 57.1
3_D-Galactose	181.1 -> 61	3_Lauric acid	201.2 -> 89.1
2_D-Galactose	181.1 -> 85	4_myo-Inositol	203.1 -> 100.1
6_L-Tyrosine	182.1 -> 136.1	6_myo-Inositol	203.1 -> 95.1
5_L-Tyrosine	182.1 -> 147	5_myo-Inositol	203.1 -> 98.1
4_L-Tyrosine	182.1 -> 165.1	5_L-Tryptophan	205.1 -> 146.1
4_D-Mannitol; 4_D-Sorbitol; 4_Dulcitol (i.e. Galactitol)	183.1 -> 129.1	4_L-Tryptophan	205.1 -> 188.1
6_D-Sorbitol	183.1 -> 55.1	9_Kynurenine	209.1 -> 146.1
6_Dulcitol (i.e. Galactitol)	183.1 -> 57	8_Kynurenine	209.1 -> 192.1
5_Dulcitol (i.e. Galactitol)	183.1 -> 61	10_Kynurenine	209.1 -> 94.1
6_D-Mannitol	183.1 -> 69		
5_D-Sorbitol	183.1 -> 85		
5_D-Mannitol	183.1 -> 98		

9.6.4 Komponenten Met 2

Name des untersuchten Metaboliten	MRM	Name des untersuchten Metaboliten	MRM
4_D(-)-hydroxy butyric acid	105.1 -> 45	5_D-Erythrose 4-phosphate	201 -> 81
3_D(-)-hydroxy butyric acid	105.1 -> 77	4_D-Erythrose 4-phosphate	201 -> 85
5_L-Serine	106.1 -> 42	3_D-Erythrose 4-phosphate	201 -> 99
4_L-Serine	106.1 -> 60	1_Acetylcarnitine	204.1 -> 145.1
3_L-Serine	106.1 -> 64	Acetyl-carnitine; 3_Acetylcarnitine	204.1 -> 60.1
5_Hypotaurine	110 -> 30	2_Acetylcarnitine	204.1 -> 85
4_Hypotaurine	110 -> 45.1	12_Kynurenine	209.1 -> 146
8_Cytosine; 3_Hypotaurine	110 -> 65	11_Kynurenine	209.1 -> 192
5_Creatinine	114.1 -> 43	14_Kynurenine	209.1 -> 93.9
4_Creatinine	114.1 -> 44.1	13_Kynurenine	209.1 -> 94
3_Creatinine	114.1 -> 86.1	1_Propionylcarnitine	218.1 -> 159.1
3_L-Proline	116.1 -> 42	Propionylcarnitine; 3_Propionylcarnitine	218.1 -> 60.1
2_L-Proline	116.1 -> 43.1	2_Propionylcarnitine	218.1 -> 85
1_L-Proline	116.1 -> 70.1	6_D-Ribulose 5-phosphate	231 -> 71
5_fumaric acid	117 -> 114.9	5_D-Ribulose 5-phosphate	231 -> 81
2_Valine	118.1 -> 55.1	4_D-Ribulose 5-phosphate	231 -> 99
1_Valine	118.1 -> 72.1	5_L-Cystine	241 -> 120
3_Succinic acid	119 -> 101	4_L-Cystine	241 -> 122
5_Succinic acid	119 -> 45	6_L-Cystine	241 -> 74
4_Succinic acid	119 -> 73	4_Thymidine	243.1 -> 117.1
5_DL-Homoserine	120.1 -> 56	3_Thymidine	243.1 -> 127
4_DL-Homoserine; 4_L-Threonine	120.1 -> 74.1	5_Thymidine	243.1 -> 99
3_L-Leucine	132.1 -> 43.1	4_Cytidine	244.1 -> 112.1
3_L-Isoleucine	132.1 -> 44	5_Cytidine	244.1 -> 95

Anhang

2_L-Leucine	132.1 -> 44.1	5_Uridine	245.1 -> 113
3_4-Hydroxy-L-proline	132.1 -> 68	4_D-Biotin	245.1 -> 123
2_L-Isoleucine	132.1 -> 69.1	4_Uridine	245.1 -> 133
2_4-Hydroxy-L-proline	132.1 -> 86	6_Uridine	245.1 -> 57
1_L-Isoleucine; 1_L-Leucine	132.1 -> 86.1	6_D-Biotin	245.1 -> 79.1
3_Oxaloacetate	133 -> 105	5_D-Biotin	245.1 -> 97
4_Oxaloacetate	133 -> 45.1	3_Hydroxybupropion	256.1 -> 131.1
6_Aspargine	133.1 -> 46	2_Hydroxybupropion	256.1 -> 139
5_Aspargine	133.1 -> 74	1_Hydroxybupropion	256.1 -> 238.1
4_Aspargine	133.1 -> 87.1	1_Hexanoylcarnitine	260.2 -> 201.1
6_L-Aspartic Acid	134 -> 43	3_Hexanoylcarnitine	260.2 -> 60.1
5_L-Aspartic Acid	134 -> 46	2_Hexanoylcarnitine	260.2 -> 85
4_L-Aspartic Acid	134 -> 70	4_D-Fructose 6-phosphate	261 -> 109
5_Malic acid	135 -> 43	3_D-Fructose 6-phosphate	261 -> 207
4_Malic acid	135 -> 45	5_D-Fructose 6-phosphate	261 -> 81
3_Malic acid	135 -> 99	5_Atenolol	267.2 -> 145.1
3_Homocysteine	136 -> 56.1	4_Atenolol	267.2 -> 225.1
2_Homocysteine	136 -> 90	6_Atenolol	267.2 -> 56.1
3_6-Hydroxynicotinic acid	140 -> 122	6_Stearic acid	285.3 -> 57.1
5_6-Hydroxynicotinic acid	140 -> 78	5_Stearic acid	285.3 -> 71.1
4_6-Hydroxynicotinic acid	140 -> 94	4_Stearic acid	285.3 -> 89.1
3_Caprylic acid	145.1 -> 43.1	5_Sphingosine	300.3 -> 252.3
2_Caprylic acid	145.1 -> 57.1	4_Sphingosine	300.3 -> 282.3
1_Caprylic acid	145.1 -> 89.1	6_Sphingosine	300.3 -> 56.1
3_Spermidine	146.2 -> 64	6_Ranitidine	315.2 -> 102
2_Spermidine	146.2 -> 72.1	1_progesterone	315.2 -> 109.1
1_Spermidine	146.2 -> 84.1	5_Ranitidine	315.2 -> 176
6_Oxoglutaric acid; 8_Oxoglutaric acid	147 -> 105.9	4_Ranitidine	315.2 -> 270.1
7_Oxoglutaric acid; 9_Oxoglutaric acid	147 -> 65	3_progesterone	315.2 -> 81.1
4_Glutamine	147.1 -> 130	2_progesterone	315.2 -> 97.1
6_Glutamine; 3_L-Lysine	147.1 -> 56.1	3_Citalopram	325.2 -> 109
5_Glutamine	147.1 -> 64	2_Citalopram	325.2 -> 234.1
3_Glutamic acid; 3_L-Glutamate	148.1 -> 130.1	1_Citalopram	325.2 -> 262.1
5_Glutamic acid; 5_L-Glutamate	148.1 -> 56.1	2_Testosterone propionate	345.2 -> 109.1
4_Glutamic acid; 4_L-Glutamate	148.1 -> 84	1_Testosterone propionate	345.2 -> 271.2
4_Methionine	150.1 -> 102.1	3_Testosterone propionate	345.2 -> 97.1
3_Methionine	150.1 -> 104.1	5_hydrocortisone	363.2 -> 105.1
5_Methionine	150.1 -> 56.1	4_hydrocortisone	363.2 -> 271.2
4_Histidine	156.1 -> 110.1	3_hydrocortisone	363.2 -> 297.2
6_Histidine	156.1 -> 93	2_Cholesterol	369.4 -> 147.1
5_Histidine	156.1 -> 95.1	1_Cholesterol	369.4 -> 161.1
1_Nonanoic acid	159.1 -> 103.1	3_Cholesterol	369.4 -> 95.1
3_Nonanoic acid	159.1 -> 69.1	2_Trazodone	372.2 -> 148.1
2_Nonanoic acid	159.1 -> 89.1	1_Trazodone	372.2 -> 176.1
1_L-Carnitine	162.1 -> 102.1	5_(+)-alpha-Tocopherol	431.4 -> 165.1
3_L-Carnitine	162.1 -> 57	4_(+)-alpha-Tocopherol	431.4 -> 430.4

Anhang

2_L-Carnitine	162.1 -> 60.1	6_(+)-alpha-Tocopherol	431.4 -> 69.1
6_L-Phenylalanine	166.1 -> 103.1	6_Folic acid	442.1 -> 120
5_L-Phenylalanine	166.1 -> 120.1	5_Folic acid	442.1 -> 295.1
4_L-Phenylalanine	166.1 -> 131	4_Folic acid	442.1 -> 313.1
5_Phosphoenol pyruvate; 8_phosphoenol pyruvate	169 -> 105	1_Retiny l palmitate	525.5 -> 269.2
4_Phosphoenol pyruvate; 7_phosphoenol pyruvate	169 -> 123	3_Retiny l palmitate	525.5 -> 81.1
3_Phosphoenol pyruvate; 6_phosphoenol pyruvate	169 -> 151	2_Retiny l palmitate	525.5 -> 95.1
4_Diphenylamine	170.1 -> 92.1	3_Carotene	536.4 -> 161.1
3_Diphenylamine	170.1 -> 93.1	2_Lycopene	536.4 -> 375.3
5_Glyceraldehyde 3-phosphate	171 -> 73	2_Carotene; 1_Lycopene	536.4 -> 444.4
4_Glyceraldehyde 3-phosphate	171 -> 81	1_Carotene	536.4 -> 445.4
3_Glyceraldehyde 3-phosphate	171 -> 99	3_Lycopene	536.4 -> 69.1
3_gabapentin	172.1 -> 137.1	3_Cryptoxanthin	552.4 -> 119.1
2_gabapentin	173.1 -> 154.1	2_Cryptoxanthin	552.4 -> 460.4
1_gabapentin	174.1 -> 93.1	1_Cryptoxanthin	552.4 -> 551.4
4_Arginine	175.1 -> 116.1	3_Zeaxanthin	569.4 -> 119.1
5_Theanine	175.1 -> 129.1	2_Zeaxanthin	569.4 -> 395.1
4_Theanine	175.1 -> 158.1	1_Zeaxanthin	569.4 -> 568.4
6_Arginine	175.1 -> 60.1	5_Bilirubin	585.3 -> 299.1
5_Arginine	175.1 -> 70.1	4_Bilirubin	585.3 -> 300.1
6_Theanine	175.1 -> 84	6_Bilirubin	585.3 -> 584.3
4_3-Indoleacetic Acid	176.1 -> 103	3_Pyruvate	89 -> 61
3_3-Indoleacetic Acid	176.1 -> 130	2_Pyruvate	89 -> 62
4_2-isopropylmalate; 5_2-Isopropylmalic acid	177.1 -> 131.1	4_Glycerol	93.1 -> 45
6_2-isopropylmalate; 7_2-Isopropylmalic acid	177.1 -> 71	3_Glycerol	93.1 -> 57
5_2-isopropylmalate; 6_2-Isopropylmalic acid	177.1 -> 95		
6_Allantoin	187 -> 187		
6_Citric acid	193 -> 111		
5_Citric acid	193 -> 129		
4_Citric acid	193 -> 139		
5_Caffeine	195.1 -> 110.1		
4_Caffeine	195.1 -> 138.1		

9.6.5 Komponenten Met3

Lipid Name	MRM	Lipid Name	MRM
3_Glyceric acid	105 -> 57	2_Pantothenic acid	218.1 -> 88
2_Glyceric acid	105 -> 59	1_Palmitoleic acid	253.2 -> 71
1_Glyceric acid	105 -> 75	2_Palmitic acid	255.2 -> 54
2_L-Threonine	118.1 -> 56	1_Palmitic acid	255.2 -> 80
1_L-Threonine	118.1 -> 74	2_Inosine	267.1 -> 108

Anhang

3_meso-Erythritol	121.1 -> 59	1_Inosine	267.1 -> 135
2_meso-Erythritol	121.1 -> 71	3_Inosine	267.1 -> 80
1_meso-Erythritol	121.1 -> 89	2_Elaidic acid	281.2 -> 71
2_Taurine	124 -> 65	1_Elaidic acid	281.2 -> 96
1_Taurine	124 -> 80	3_Guanosine	282.1 -> 108
2_Thymine	125 -> 80	2_Guanosine	282.1 -> 133
1_Thymine	125 -> 81	1_Guanosine	282.1 -> 150
1_Creatine	130.1 -> 112	3_Argininosuccinic acid; 4_Argininosuccinic acid	289.1 -> 132
2_Creatine	130.1 -> 88	2_Argininosuccinic acid	289.1 -> 227.1
1_Adenine	134 -> 106.9	1_Argininosuccinic acid	289.1 -> 271.1
2_Adenine	134 -> 92	2_5'-CMP	322 -> 79
7_Hypoxanthine	135 -> 65	1_5'-CMP	322 -> 97
6_Hypoxanthine	135 -> 92	2_UMP	323 -> 79
2_Anthranilic acid	136 -> 65	1_UMP	323 -> 97
1_Anthranilic acid	136 -> 92.1	1_cAMP	328 -> 134
2_O-Phosphoethanolamine	140 -> 63	2_cAMP	328 -> 79
1_O-Phosphoethanolamine	140 -> 79	2_D-Lactose	341.1 -> 101
1_Oxoglutaric acid	145 -> 100.9	2_Sucrose	341.1 -> 119
2_Oxoglutaric acid	145 -> 57.2	1_D-Lactose	341.1 -> 143
3_Ribulose	149 -> 41	2_Maltose	341.1 -> 161
3_D-(-)-Arabinose; 3_L-(+)-Arabinose	149 -> 43	1_Maltose; 1_Sucrose	341.1 -> 179.1
2_D-(-)-Arabinose; 3_D-(+)-Xylose; 2_L-(+)-Arabinose; 2_Ribose; 2_Ribulose	149 -> 59	3_Maltose	341.1 -> 53
1_D-(-)-Arabinose; 2_D-(+)-Xylose; 1_L-(+)-Arabinose; 1_Ribose; 1_Ribulose	149 -> 71	3_Sucrose	341.1 -> 89
1_D-(+)-Xylose	149 -> 77	2_Thiamine monophosphat	343.1 -> 222
1_Xanthine	151 -> 108	1_Thiamine monophosphat	343.1 -> 245.1
2_Xanthine	151 -> 80	3_Thiamine monophosphat	343.1 -> 97
1_Ribitol	151.1 -> 101	2_CDP	402 -> 110
3_L-Arabitol; 3_Ribitol	151.1 -> 55	1_CDP	402 -> 158.9
2_L-Arabitol; 3_Xylitol	151.1 -> 59	3_CDP	402 -> 79
1_L-Arabitol; 2_Ribitol; 2_Xylitol	151.1 -> 71	2_UDP	402.9 -> 111
1_Xylitol	151.1 -> 89	1_UDP	402.9 -> 158.9
2_Allantoin	157 -> 113.8	3_UDP	402.9 -> 79
1_Allantoin	157 -> 114	2_ADP	426 -> 134
3_Allantoin	157 -> 97	1_ADP	426 -> 158.9
1_2-Aminoadipic acid	160.1 -> 116.1	3_ADP	426 -> 79
2_Uric acid	167 -> 123.9	3_GDP	442 -> 150
1_Uric acid	167 -> 124	2_GDP	442 -> 158.9
5_Uric acid	167 -> 42	1_GDP	442 -> 344
4_Uric acid	167 -> 69	3_CTP	481.9 -> 102
1_Phosphoenol pyruvate; 2_phosphoenol pyruvate	167 -> 79	2_CTP	481.9 -> 383
3_Uric acid	167 -> 96	1_CTP	482 -> 159
2_Aconitic acid; 1_Shikimic acid	173 -> 111	2_UTP	483 -> 158.9
1_Aconitic acid	173 -> 129	1_UTP	483 -> 385
3_Aconitic acid	173 -> 85	3_UTP	483 -> 79

Anhang

2_2-isopropylmalate; Isopropylmalic acid	3_2-	175.1 -> 113.1	2_Raffinose	503.2 -> 119
1_2-isopropylmalate; Isopropylmalic acid	2_2-	175.1 -> 115	1_Raffinose	503.2 -> 179.1
1_2-Isopropylmalic acid		175.1 -> 150	3_Raffinose	503.2 -> 89
3_2-isopropylmalate; Isopropylmalic acid	4_2-	175.1 -> 85.1	2_ATP	506 -> 158.9
1_myo-Inositol		179.1 -> 161	1_ATP	506 -> 408
3_D-Glucose; 2_D-(+)-Mannose; 3_D-(+)-Mannose; 3_D-Fructose		179.1 -> 59	3_ATP	506 -> 79
2_D-Glucose; 2_D-Fructose		179.1 -> 71	3_GTP	522 -> 158.9
3_myo-Inositol		179.1 -> 87	2_GTP	522 -> 176.9
1_D-Glucose; 1_D-(+)-Mannose; 1_D-Fructose		179.1 -> 89	1_GTP	522 -> 424
1_D-Galactose		179.1 -> 91	1_ADG-Rib	558.1 -> 366.1
2_myo-Inositol		179.1 -> 99	3_ADG-Rib	558.1 -> 79
2_L-Tyrosine		180.1 -> 119	2_ADG-Rib	558.1 -> 97
1_L-Tyrosine		180.1 -> 163	3_UDP-Glu	565 -> 323
3_L-Tyrosine		180.1 -> 72	5_UDP-Glu	565 -> 79
1_Dulcitol (i.e. Galactitol)		181.1 -> 101	4_UDP-Glu	565 -> 97
1_D-Mannitol		181.1 -> 163.1	2_ADG-Glu	588.1 -> 241
3_Dulcitol (i.e. Galactitol)		181.1 -> 55	1_ADG-Glu	588.1 -> 346.1
3_D-Sorbitol		181.1 -> 59	3_NAD	662.1 -> 328
3_D-Mannitol; 2_D-Sorbitol; 2_Dulcitol (i.e. Galactitol)		181.1 -> 71	2_NAD	662.1 -> 408
1_D-Sorbitol		181.1 -> 73	1_NAD	662.1 -> 540.1
2_D-Mannitol		181.1 -> 89	2_NADH	664.1 -> 158.9
3_DL-3		183 -> 136	1_NADH	664.1 -> 408
2_DL-3		183 -> 137	3_NADH	664.1 -> 79
1_DL-3		183 -> 139	3_NADP	742.1 -> 273
1_Quinic acid		191.1 -> 127.6	2_NADP	742.1 -> 408
4_Quinic acid; 7_Quinic acid		191.1 -> 59	1_NADP	742.1 -> 620
3_Quinic acid; 6_Quinic acid		191.1 -> 85	3_NADPH	744.1 -> 158.9
2_Quinic acid; 5_Quinic acid		191.1 -> 93	2_NADPH	744.1 -> 397
3_L-Tryptophan		203.1 -> 116.1	1_NADPH	744.1 -> 408
2_L-Tryptophan		203.1 -> 142.1	2_FAD	784.1 -> 346.1
1_L-Tryptophan		203.1 -> 159.1	1_FAD	784.1 -> 784
3_Kynurenine		207.1 -> 118.1	3_FAD	784.1 -> 97
2_Kynurenine; 4_Kynurenine		207.1 -> 144	2_Acetyl CoA	850.1 -> 408
1_Kynurenine		207.1 -> 190.1	1_Acetyl CoA	850.1 -> 419
1_Pantothenic acid		218.1 -> 146.1	3_Acetyl CoA	850.1 -> 766.1
3_Pantothenic acid		218.1 -> 71.1	1_Alanine	88 -> 42

9.6.6 Komponenten Met4

Lipid Name	MRM	Lipid Name	MRM
2_D(-)-hydroxy butyric acid	103 -> 41	1_3-Indoleacetic Acid	174.1 -> 130

Anhang

_2-hydroxy-butanoic acid	103 -> 57.1	1_Citrulline	174.1 -> 131.1
1_D(-)-hydroxy butyric acid	103 -> 59	2_Citrulline	174.1 -> 83.1
2_L-Serine	104 -> 42	2_2-isopropylmalate; 3_2-Isopropylmalic acid	175.1 -> 113.1
1_L-Serine	104 -> 74	1_2-isopropylmalate; 2_2-Isopropylmalic acid	175.1 -> 115
2_Hypotaurine	108 -> 64	3_2-isopropylmalate; 4_2-Isopropylmalic acid	175.1 -> 85.1
1_Hypotaurine	108 -> 65	1_Citric acid; 1_Isocitrate	191 -> 111
1_Hypotaurine	108 -> 81.8	3_Citric acid	191 -> 57
8_Cytosine; 3_Hypotaurine	110 -> 65	3_Isocitrate	191 -> 73
7_Cytosine	110 -> 67	2_Isocitrate	191 -> 85
6_Cytosine	110 -> 87	2_Citric acid	191 -> 87
3_Uracil	111 -> 40	4_Quinic acid; 7_Quinic acid	191.1 -> 59
2_Uracil	111 -> 42	3_Quinic acid; 6_Quinic acid	191.1 -> 85
1_Uracil	111 -> 67	2_Quinic acid; 5_Quinic acid	191.1 -> 93
2_Creatinine	112.1 -> 41	2_Caffeine	193.1 -> 177
1_Creatinine	112.1 -> 68	1_Caffeine	193.1 -> 178
1_ketoisovaleric acid	115 -> 114	3_Caffeine	193.1 -> 79
4_Fumaric acid	115 -> 27	2_D-Erythrose 4-phosphate	199 -> 79
3_Fumaric acid	115 -> 45	1_D-Erythrose 4-phosphate	199 -> 97
3_ketoisovaleric acid	115 -> 69	1_Lauric acid	199.2 -> 176.6
2_ketoisovaleric acid	115 -> 70	2_Lauric acid	199.2 -> 80
2_fumaric acid	115 -> 71	6_Kynurenine	207.1 -> 124.3
1_Fumaric acid	115 -> 85	5_Kynurenine	207.1 -> 143.9
2_Succinic acid	117 -> 73	2_Kynurenine; 4_Kynurenine	207.1 -> 144
1_Succinic acid	117 -> 99	7_Kynurenine	207.1 -> 92
1_DL-Homoserine	118.1 -> 100	1_D-Ribulose 5-phosphate	229 -> 139
3_DL-Homoserine	118.1 -> 55	1_D-Xylulose 5-phosphate	229 -> 161
2_DL-Homoserine	118.1 -> 72	3_D-Ribulose 5-phosphate; 3_D-Xylulose 5-phosphate	229 -> 79
2_Pyroglutamic acid	128 -> 52	2_D-Ribulose 5-phosphate; 2_D-Xylulose 5-phosphate	229 -> 97
1_Pyroglutamic acid	128 -> 82	2_Thymidine	241.1 -> 125
1_4-Hydroxy-L-proline	130.1 -> 98.3	1_Thymidine	241.1 -> 151.1
2_Asparagine	131 -> 113	2_Cytidine	242.1 -> 109
1_Asparagine	131 -> 114	1_Cytidine	242.1 -> 110
3_Asparagine	131 -> 42	3_Cytidine	242.1 -> 65
2_Oxaloacetate	131 -> 59	2_Uridine	243.1 -> 110
1_Oxaloacetate	131 -> 87	3_D-Biotin	243.1 -> 122.1
1_L-Aspartic Acid	132 -> 115	1_Uridine	243.1 -> 152
3_L-Aspartic Acid	132 -> 71	2_D-Biotin	243.1 -> 166.1
2_L-Aspartic Acid	132 -> 88	1_D-Biotin	243.1 -> 200.1
1_Malic acid	133 -> 115	3_Uridine	243.1 -> 82
2_Malic acid	133 -> 71	2_D-Fructose 6-phosphate; 5_Cyclophosphamide	259 -> 79
1_Homocysteine	134 -> 33	1_D-Fructose 6-phosphate	259 -> 97
2_6-Hydroxynicotinic acid	138 -> 42	1_Atenolol	265.2 -> 150.1
1_6-Hydroxynicotinic acid	138 -> 94	3_Atenolol	265.2 -> 69

Anhang

3_Oxoglutaric acid	145 -> 101	2_Atenolol	265.2 -> 97
5_Oxoglutaric acid	145 -> 57	1_Stearic acid	283.3 -> 265.3
4_Oxoglutaric acid	145 -> 73	3_Stearic acid	283.3 -> 71
1_adipic acid	145.1 -> 101.1	2_Stearic acid	283.3 -> 81
1_Glutamine	145.1 -> 127.1	2_Sphingosine	298.3 -> 239.2
3_Glutamine	145.1 -> 42	1_Sphingosine	298.3 -> 268.3
2_Glutamine	145.1 -> 74	3_Sphingosine	298.3 -> 58
3_adipic acid	145.1 -> 81	3_Ranitidine	349.1 -> 142.1
2_adipic acid	145.1 -> 83.1	2_Ranitidine	349.1 -> 170.1
2_Glutamic acid	146 -> 102.1	1_Ranitidine	349.1 -> 313.1
1_Glutamic acid	146 -> 128	2_hydrocortisone	361.2 -> 297.1
2_L-Glutamate	146.1 -> 102.1	1_hydrocortisone	361.2 -> 331.2
1_L-Glutamate	146.1 -> 128	3_(+)-alpha-Tocopherol	429.4 -> 135.1
1_Methionine	148 -> 100	2_(+)-alpha-Tocopherol	429.4 -> 163.1
2_Methionine	148 -> 47	1_(+)-alpha-Tocopherol	429.4 -> 414.4
1_Histidine	154.1 -> 137	3_Folic acid	440.1 -> 175
3_Histidine	154.1 -> 80	2_Folic acid	440.1 -> 311.1
2_Histidine	154.1 -> 93	1_Folic acid	440.1 -> 396.1
1_L-Dihydroorotic acid	157 -> 113	3_Bilirubin	583.3 -> 241.1
2_L-Dihydroorotic acid	157 -> 70	2_Bilirubin	583.3 -> 253.1
2_2-Aminoadipic acid	160.1 -> 142.1	1_Bilirubin	583.3 -> 285.1
3_2-Aminoadipic acid	160.1 -> 98.1	2_Glycolic acid	75 -> 49
2_L-Phenylalanine	164.1 -> 103.1	1_Glycolic acid	75 -> 73
1_L-Phenylalanine	164.1 -> 147	2_Succinyl-CoA	866 -> 408
3_L-Phenylalanine	164.1 -> 72	1_Succinyl-CoA	866 -> 426
2_L(-)-3-Phenyllactic acid	165.1 -> 103.1	3_Succinyl-CoA	866 -> 519.1
1_L(-)-3-Phenyllactic acid	165.1 -> 147	1_Pyruvate	87 -> 43
3_L(-)-3-Phenyllactic acid	165.1 -> 73	3_Lactic acid	89 -> 41
1_Phosphoenol pyruvate; 2_phosphoenol pyruvate	167 -> 79	2_Lactic acid	89 -> 43
1_Diphenylamine	168.1 -> 166.1	1_Lactic acid	89 -> 45
2_Diphenylamine	168.1 -> 92.1	2_Glycerol	91 -> 43
2_Dihydroxyacetone phosphate; 2_Glyceraldehyde 3-phosphate	169 -> 79	1_Glycerol	91 -> 59
1_Dihydroxyacetone phosphate; 1_Glyceraldehyde 3-phosphate	169 -> 97		
2_Aconitic acid; 1_Shikimic acid	173 -> 111		
3_Shikimic acid	173 -> 73		
2_Shikimic acid	173 -> 93		
3_Arginine	173.1 -> 112.1		
2_Arginine	173.1 -> 131.1		
1_Theanine	173.1 -> 155.1		
1_Arginine	173.1 -> 156.1		
3_Theanine	173.1 -> 74		
2_Theanine	173.1 -> 84		
2_3-Indoleacetic Acid	174.1 -> 128		

10 LITERATURVERZEICHNIS

- Abbasi IHR, Abbasi F, Soomro RN, et al (2017) Considering choline as methionine precursor, lipoproteins transporter, hepatic promoter and antioxidant agent in dairy cows. *AMB Express* 7:214. <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0513-z>
- Acosta DAV, Denicol AC, Tribulo P, et al (2016) Effects of rumen-protected methionine and choline supplementation on the preimplantation embryo in Holstein cows. *Theriogenology* 85:1669–1679. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.01.024>
- Acosta DAV, Rivelli MI, Skenandore C, et al (2017) Effects of rumen-protected methionine and choline supplementation on steroidogenic potential of the first postpartum dominant follicle and expression of immune mediators in Holstein cows. *Theriogenology* 96:1–9. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.03.022>
- Aledo JC (2019) Methionine in proteins: The Cinderella of the proteinogenic amino acids. *Protein Sci* 28:1785–1796. <https://doi.org/10.1002/pro.3698>
- Almquist HJ (1954) Utilization of amino acids by chicks. *Arch Biochem Biophys* 52:197–202. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(54\)90103-4](https://doi.org/10.1016/0003-9861(54)90103-4)
- Alves NFB, de Queiroz TM, de Almeida Travassos R, et al (2017) Acute Treatment with Lauric Acid Reduces Blood Pressure and Oxidative Stress in Spontaneously Hypertensive Rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 120:348–353. <https://doi.org/10.1111/bcpt.12700>
- Ardalan M, Rezayazdi K, Dehghan-Banadaky M (2010) Effect of rumen-protected choline and methionine on physiological and metabolic disorders and reproductive indices of dairy cows: Rumen-protected methionine and choline for Holsteins. *J Anim Physiol Anim Nutr* 94:e259–e265. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2009.00966.x>
- Armentano LE, Bertics SJ, Ducharme GA (1997) Response of Lactating Cows to Methionine or Methionine Plus Lysine Added to High Protein Diets Based on Alfalfa and Heated Soybeans. *J Dairy Sci* 80:1194–1199. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(97\)76047-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(97)76047-8)
- Arriola Apelo SI, Bell AL, Estes K, et al (2014) Effects of reduced dietary protein and supplemental rumen-protected essential amino acids on the nitrogen efficiency of dairy cows. *J Dairy Sci* 97:5688–5699. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7833>
- Ashworth CJ, Toma LM, Hunter MG (2009) Nutritional effects on oocyte and embryo development in mammals: implications for reproductive efficiency and environmental sustainability. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 364:3351–3361. <https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0184>
- Barlow DP (1997) Competition- a common motif for the imprinting mechanism? *EMBO J* 16:6899–6905. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.23.6899>
- Belasco IJ (1972) Stability of Methionine Hydroxy Analog in Rumen Fluid and Its Conversion in Vitro to Methionine by Calf Liver and Kidney. *J Dairy Sci* 55:353–357. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(72\)85496-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(72)85496-1)

- Benjamini Y, Hochberg Y (1995) Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J R Stat Soc Ser B Methodol* 57:289–300. <https://doi.org/10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x>
- Bird AP, Wolffe AP (1999) Methylation-Induced Repression— Belts, Braces, and Chromatin. *Cell* 99:451–454. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81532-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81532-9)
- Black AL, Kleiber Max, Smith AH (1952) CARBONATE AND FATTY ACIDS AS PRECURSORS OF AMINO ACIDS IN CASEIN. *J Biol Chem* 197:365–370. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)55685-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)55685-4)
- Bligh EG, Dyer WJ (1959) A RAPID METHOD OF TOTAL LIPID EXTRACTION AND PURIFICATION. 7
- Blum JW, Bruckmaier RM, Jans F (1999) Rumen-Protected Methionine Fed to Dairy Cows: Bioavailability and Effects on Plasma Amino Acid Pattern and Plasma Metabolite and Insulin Concentrations. *J Dairy Sci* 82:1991–1998. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(99\)75435-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(99)75435-4)
- Bols PEJ, Van Soom A, Ysebaert MT, et al (1996) Effects of aspiration vacuum and needle diameter on cumulus oocyte complex morphology and developmental capacity of bovine oocytes. *Theriogenology* 45:1001–1014. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(96\)00028-3](https://doi.org/10.1016/0093-691X(96)00028-3)
- Bols PEJ, Ysebaert MT, Van Soom A, de Kruif A (1997) Effects of needle tip bevel and aspiration procedure on the morphology and developmental capacity of bovine compact cumulus oocyte complexes. *Theriogenology* 47:1221–1236. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(97\)00102-7](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(97)00102-7)
- Bonilla L, Luchini D, Devillard E, Hansen PJ (2010) Methionine requirements for the preimplantation bovine embryo. *J Reprod Dev* 56:527–532
- Broderick GA, Kowalczyk T, Satter LD (1970) Milk Production Response to Supplementation with Encapsulated Methionine per Os or Casein per Abomasum,. *J Dairy Sci* 53:1714–1721. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(70\)86468-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(70)86468-2)
- Bungartz L, Lucas-Hahn A, Rath D, Niemann H (1995) Collection of oocytes from cattle via follicular aspiration aided by ultrasound with or without gonadotropin pretreatment and in different reproductive stages. *Theriogenology* 43:667–675. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(94\)00072-3](https://doi.org/10.1016/0093-691X(94)00072-3)
- Burdge GC, Hanson MA, Slater-Jefferies JL, Lillycrop KA (2007) Epigenetic regulation of transcription: a mechanism for inducing variations in phenotype (fetal programming) by differences in nutrition during early life? *Br J Nutr* 97:1036–1046. <https://doi.org/10.1017/S0007114507682920>
- Butler WR (1998) Review: Effect of Protein Nutrition on Ovarian and Uterine Physiology in Dairy Cattle. *J Dairy Sci* 81:2533–2539. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(98\)70146-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)70146-8)
- Butler WR, Calaman JJ, Beam SW (1996) Plasma and milk urea nitrogen in relation to pregnancy rate in lactating dairy cattle. *J Anim Sci* 74:858. <https://doi.org/10.2527/1996.744858x>
- Carlson DB, Woodworth JC, Drackley JK (2007) Effect of L-Carnitine Infusion and Feed Restriction on Carnitine Status in Lactating Holstein Cows. *J Dairy Sci* 90:2367–2376. <https://doi.org/10.3168/jds.2006-605>

- Chalupa W (1975) Rumen Bypass and Protection of Proteins and Amino Acids. *J Dairy Sci* 58:1198–1218. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(75\)84697-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(75)84697-2)
- Chastant-Maillard S, Quinton H, Lauffenburger J, et al (2003) Consequences of transvaginal follicular puncture on well-being in cows. *Reproduction* 555–563. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1250555>
- Chen G, Deng X (2018) Cell Synchronization by Double Thymidine Block. *BIO-Protoc* 8:. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2994>
- Chen T, Li E (2006) Establishment and Maintenance of DNA Methylation Patterns in Mammals. In: Doerfler W, Böhm P (eds) *DNA Methylation: Basic Mechanisms*. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, pp 179–201
- Chiechio S, Canonico P, Grilli M (2017) l-Acetylcarnitine: A Mechanistically Distinctive and Potentially Rapid-Acting Antidepressant Drug. *Int J Mol Sci* 19:11. <https://doi.org/10.3390/ijms19010011>
- Chong J, Wishart DS, Xia J (2019) Using MetaboAnalyst 4.0 for Comprehensive and Integrative Metabolomics Data Analysis. *Curr Protoc Bioinforma* 68:. <https://doi.org/10.1002/cpbi.86>
- Clark JH (1975) Lactational Responses to Postruminal Administration of Proteins and Amino Acids. *J Dairy Sci* 58:1178–1197. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(75\)84696-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(75)84696-0)
- Clark JH, Klusmeyer TH, Cameron MR (1992) Microbial Protein Synthesis and Flows of Nitrogen Fractions to the Duodenum of Dairy Cows. *J Dairy Sci* 75:2304–2323. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(92\)77992-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(92)77992-2)
- Cordeiro FB, Ferreira CR, Sobreira TJP, et al (2017) Multiple reaction monitoring (MRM)-profiling for biomarker discovery applied to human polycystic ovarian syndrome. *Rapid Commun Mass Spectrom* 31:1462–1470. <https://doi.org/10.1002/rcm.7927>
- Dambrova M, Zuurbier CJ, Borutaite V, et al (2021) Energy substrate metabolism and mitochondrial oxidative stress in cardiac ischemia/reperfusion injury. *Free Radic Biol Med* 165:24–37. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.01.036>
- de Lima CB, Ferreira CR, Milazzotto MP, et al (2018) Comprehensive lipid profiling of early stage oocytes and embryos by MRM profiling. *J Mass Spectrom* 53:1247–1252. <https://doi.org/10.1002/jms.4301>
- De Lima CB, Milazzotto MP, Vireque AA, et al (2024) Impact of Extraction Methods and Transportation Conditions on Lipid Profiles of Bovine Oocytes. *Reprod Sci*. <https://doi.org/10.1007/s43032-024-01524-9>
- De Wit AAC, Cesar MLF, Kruip TAM (2001) Effect of Urea During In Vitro Maturation on Nuclear Maturation and Embryo Development of Bovine Cumulus-Oocyte-Complexes. *J Dairy Sci* 84:1800–1804. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)74618-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)74618-8)
- Deininger S-O, Cornett DS, Paape R, et al (2011) Normalization in MALDI-TOF imaging datasets of proteins: practical considerations. *Anal Bioanal Chem* 401:167–181. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-4929-z>

- Downes A (1961) On the Amino Acids Essential for the Tissues of the Sheep. *Aust J Biol Sci* 14:254. <https://doi.org/10.1071/B19610254>
- Eckert J, Niemann H (1995) In vitro maturation, fertilization and culture to blastocysts of bovine oocytes in protein-free media. *Theriogenology* 43:1211–1225. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(95\)00093-N](https://doi.org/10.1016/0093-691X(95)00093-N)
- Edwards JL, Ealy AD, Monterroso VH, Hansen PJ (1997) Ontogeny of temperature-regulated heat shock protein 70 synthesis in preimplantation bovine embryos. *Mol Reprod Dev* 48:25–33. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199709\)48:1<25::AID-MRD4>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199709)48:1<25::AID-MRD4>3.0.CO;2-R)
- Ejsing CS, Sampaio JL, Surendranath V, et al (2009) Global analysis of the yeast lipidome by quantitative shotgun mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci* 106:2136–2141. <https://doi.org/10.1073/pnas.0811700106>
- Elrod CC, Butler WR (1993) Reduction of fertility and alteration of uterine pH in heifers fed excess ruminally degradable protein¹. *J Anim Sci* 71:694–701. <https://doi.org/10.2527/1993.713694x>
- Elrod CC, Van Amburgh M, Butler WR (1993) Alterations of pH in response to increased dietary protein in cattle are unique to the uterus¹. *J Anim Sci* 71:702–706. <https://doi.org/10.2527/1993.713702x>
- Fahy E, Subramaniam S, Brown HA, et al (2005) A comprehensive classification system for lipids. *J Lipid Res* 46:839–861. <https://doi.org/10.1194/jlr.E400004-JLR200>
- Farrell S, Vogel J, Bieber LL (1986) Entry of acetyl-l-carnitine into biosynthetic pathways. *Biochim Biophys Acta BBA - Lipids Lipid Metab* 876:175–177. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(86\)90332-2](https://doi.org/10.1016/0005-2760(86)90332-2)
- Ferré LB, Kjelland ME, Strøbech LB, et al (2020) Review: Recent advances in bovine in vitro embryo production: reproductive biotechnology history and methods. *Animal* 14:991–1004. <https://doi.org/10.1017/S1751731119002775>
- Ferreira CR, Jarmusch AK, Pirro V, et al (2015) Ambient ionisation mass spectrometry for lipid profiling and structural analysis of mammalian oocytes, preimplantation embryos and stem cells. *Reprod Fertil Dev* 27:621. <https://doi.org/10.1071/RD14310>
- Ferreira CR, Saraiva SA, Catharino RR, et al (2010) Single embryo and oocyte lipid fingerprinting by mass spectrometry. *J Lipid Res* 51:1218–1227. <https://doi.org/10.1194/jlr.D001768>
- Ferreira CR, Yannell KE, Mollenhauer B, et al (2016) Chemical profiling of cerebrospinal fluid by multiple reaction monitoring mass spectrometry. *The Analyst* 141:5252–5255. <https://doi.org/10.1039/C6AN01618A>
- Fisher LJ (1972) RESPONSE OF LACTATING COWS TO THE INTRAVENOUS INFUSION OF AMINO ACIDS. *Can J Anim Sci* 52:377–384. <https://doi.org/10.4141/cjas72-043>
- Fleming AJ, Estes KA, Choi H, et al (2019) Assessing bioavailability of ruminally protected methionine and lysine prototypes. *J Dairy Sci* 102:4014–4024. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14667>

- Flock MR, Kris-Etherton PM (2013) Diverse physiological effects of long-chain saturated fatty acids: implications for cardiovascular disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 16:133–140. <https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e328359e6ac>
- Franco J, Ferreira C, Paschoal Sobreira TJ, et al (2018) Profiling of epidermal lipids in a mouse model of dermatitis: Identification of potential biomarkers. *PLOS ONE* 13:e0196595. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196595>
- Fukuda Y, Ichikawa M, Naito K, Toyoda Y (1990) Birth of Normal Calves Resulting from Bovine Oocytes Matured, Fertilized, and Cultured with Cumulus Cells in Vitro up to the Blastocyst Stage1. *Biol Reprod* 42:114–119. <https://doi.org/10.1095/biolreprod42.1.114>
- Furukawa E, Chen Z, Kubo T, et al (2022) Simultaneous free fatty acid elevations and accelerated desaturation in plasma and oocytes in early postpartum dairy cows under intensive feeding management. *Theriogenology* 193:20–29. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2022.09.006>
- Galli C, Crotti G, Notari C, et al (2001) Embryo production by ovum pick up from live donors. *Theriogenology* 55:1341–1357. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00486-1](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00486-1)
- Galli C, Duchi R, Colleoni S, et al (2014) Ovum pick up, intracytoplasmic sperm injection and somatic cell nuclear transfer in cattle, buffalo and horses: from the research laboratory to clinical practice. *Theriogenology* 81:138–151. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.008>
- Garcia A, Salaheddine M (1998) Effects of repeated ultrasound-guided transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and subsequent follicular development. *Theriogenology* 50:575–585. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(98\)00162-9](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(98)00162-9)
- GfE (ed) (2001) Empfehlungen zur Energie- und Nährstoffversorgung der Milchkühe und Aufzuchttrinder. DLG-Verl, Frankfurt am Main
- Goeman JJ, Solari A (2014) Multiple hypothesis testing in genomics. *Stat Med* 33:1946–1978. <https://doi.org/10.1002/sim.6082>
- Golding MC, Westhusin ME (2003) Analysis of DNA (cytosine 5) methyltransferase mRNA sequence and expression in bovine preimplantation embryos, fetal and adult tissues. *Gene Expr Patterns* 3:551–558. [https://doi.org/10.1016/S1567-133X\(03\)00121-2](https://doi.org/10.1016/S1567-133X(03)00121-2)
- González-Serrano AF, Ferreira CR, Pirro V, et al (2016) Effects of long-term dietary supplementation with conjugated linoleic acid on bovine oocyte lipid profile. *Reprod Fertil Dev* 28:1326. <https://doi.org/10.1071/RD14352>
- Graulet B, Richard C, Robert JC (2005) Methionine Availability in Plasma of Dairy Cows Supplemented with Methionine Hydroxy Analog Isopropyl Ester. *J Dairy Sci* 88:3640–3649. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)73049-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)73049-6)
- Green GH, Diggle PJ (2007) On the Operational Characteristics of the Benjamini and Hochberg False Discovery Rate Procedure. *Stat Appl Genet Mol Biol* 6:. <https://doi.org/10.2202/1544-6115.1302>

- Grohmann M, Spada F, Schermelleh L, et al (2005) Restricted mobility of Dnmt1 in preimplantation embryos: implications for epigenetic reprogramming. *BMC Dev Biol* 5:18. <https://doi.org/10.1186/1471-213X-5-18>
- Gross JH (2013) *Massenspektrometrie*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg
- Guadagnin AR, Fehlberg LK, Thomas B, et al (2023) Feeding rumen-protected lysine prepartum alters placental metabolism at a transcriptional level. *J Dairy Sci* 106:6567–6576. <https://doi.org/10.3168/jds.2022-22390>
- Hammon DS, Wang S, Holyoak GR (2000) Effects of ammonia during different stages of culture on development of in vitro produced bovine embryos. *Anim Reprod Sci* 59:23–30. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00071-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00071-3)
- Han X, Yang K, Yang J, et al (2006) Factors influencing the electrospray intrasource separation and selective ionization of glycerophospholipids. *J Am Soc Mass Spectrom* 17:264–274. <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2005.11.003>
- Harper AE, Benevenga NJ, Wohlhueter RM (1970) Effects of ingestion of disproportionate amounts of amino acids. *Physiol Rev* 50:428–558. <https://doi.org/10.1152/physrev.1970.50.3.428>
- Hayashi S, Yoshida M, Fujiwara T, et al (2011) Single-embryo metabolomics and systematic prediction of developmental stage in zebrafish. *Z Naturforschung C J Biosci* 66:191–198. <https://doi.org/10.1515/znc-2011-3-414>
- Hernandez-Ledezma JJ, Mathialagan N, Villanueva C, et al (1993) Expression of bovine trophoblast interferons by in vitro-derived blastocysts is correlated with their morphological quality and stage of development. 6
- Hernandez-Ledezma JJ, Sikes JD, Murphy CN, et al (1992) Expression of Bovine Trophoblast Interferon in Conceptuses Derived by in Vitro Techniques1. *Biol Reprod* 47:374–380. <https://doi.org/10.1095/biolreprod47.3.374>
- Holčapek M, Liebisch G, Ekroos K (2018) Lipidomic Analysis. *Anal Chem* 90:4249–4257. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b05395>
- Hossain MS, Mawatari S, Fujino T (2020) Biological Functions of Plasmalogens. In: Lizard G (ed) *Peroxisome Biology: Experimental Models, Peroxisomal Disorders and Neurological Diseases*. Springer International Publishing, Cham, pp 171–193
- Huber JT, Emery RS, Bergen WG, et al (1984) Influences of Methionine Hydroxy Analog on Milk and Milk Fat Production, Blood Serum Lipids, and Plasma Amino Acids. *J Dairy Sci* 67:2525–2531. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(84\)81609-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(84)81609-4)
- Hugentobler SA, Diskin MG, Leese HJ, et al (2007) Amino acids in oviduct and uterine fluid and blood plasma during the estrous cycle in the bovine. *Mol Reprod Dev* 74:445–454. <https://doi.org/10.1002/mrd.20607>
- Ikeda S, Namekawa T, Sugimoto M, Kume S (2010) Expression of methylation pathway enzymes in bovine oocytes and preimplantation embryos. *J Exp Zool Part Ecol Genet Physiol* 9999A:n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/jez.581>

- Islinger M, Voelkl A, Fahimi HD, Schrader M (2018) The peroxisome: an update on mysteries 2.0. *Histochem Cell Biol* 150:443–471. <https://doi.org/10.1007/s00418-018-1722-5>
- Jeffries MA (2018) Epigenetic editing: How cutting-edge targeted epigenetic modification might provide novel avenues for autoimmune disease therapy. *Clin Immunol* 196:49–58. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2018.02.001>
- Ji P, Tucker HA, Clark RE, et al (2016) Short communication: Effect of on-farm feeding practices on rumen protected lysine products. *J Dairy Sci* 99:1242–1246. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-9197>
- Jiménez-Rojo N, Riezman H (2019) On the road to unraveling the molecular functions of ether lipids. *FEBS Lett* 593:2378–2389. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13465>
- Johnson-VanWieringen LM, Harrison JH, Davidson D, et al (2007) Effects of Rumen-Undegradable Protein Sources and Supplemental 2-Hydroxy-4-(Methylthio)-Butanoic Acid and Lysine-HCl on Lactation Performance in Dairy Cows. *J Dairy Sci* 90:5176–5188. <https://doi.org/10.3168/jds.2006-741>
- Kawarsky SJ, King WA (2001) Expression and localisation of heat shock protein 70 in cultured bovine oocytes and embryos. *Zygote Camb Engl* 9:39–50. <https://doi.org/10.1017/s0967199401001058>
- King KJ, Bergen WG, Sniffen CJ, et al (1991) An Assessment of Absorbable Lysine Requirements in Lactating Cows. *J Dairy Sci* 74:2530–2539. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78430-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78430-0)
- Kirchgeßner M, Stangl GI, Schwarz FJ, et al (eds) (2014) *Tierernährung: Leitfaden für Studium, Beratung und Praxis*, 14., aktualisierte Aufl. DLG-Verl, Frankfurt am Main
- Koenig KM, Rode LM (2001) Ruminant Degradability, Intestinal Disappearance, and Plasma Methionine Response of Rumen-Protected Methionine in Dairy Cows. *J Dairy Sci* 84:1480–1487. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)70181-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)70181-6)
- Koenig KM, Rode LM, Knight CD, Vázquez-Añón M (2002) Rumen Degradation and Availability of Various Amounts of Liquid Methionine Hydroxy Analog in Lactating Dairy Cows. *J Dairy Sci* 85:930–938. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74151-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74151-9)
- Kowsar R, Izadi F, Sadeghi N, et al (2018) Urea changes oocyte competence and gene expression in resultant bovine embryo *in vitro*. *Zygote* 26:207–219. <https://doi.org/10.1017/S0967199418000102>
- Kubisch HM, Larson MA, Roberts RM (1998) Relationship Between Age of Blastocyst Formation and Interferon- τ Secretion by In Vitro-Derived Bovine Embryos. 7
- Lannett Edwards J, Hansen PJ (1996) Elevated Temperature Increases Heat Shock Protein 70 Synthesis in Bovine Two-Cell Embryos and Compromises Function of Maturing Oocytes1. *Biol Reprod* 55:340–346. <https://doi.org/10.1095/biolreprod55.2.341>
- Lawrence M, Daujat S, Schneider R (2016) Lateral Thinking: How Histone Modifications Regulate Gene Expression. *Trends Genet* 32:42–56. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2015.10.007>

- Leonardi C, Stevenson M, Armentano LE (2003) Effect of Two Levels of Crude Protein and Methionine Supplementation on Performance of Dairy Cows. *J Dairy Sci* 86:4033–4042. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)74014-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)74014-4)
- Leroy JLMR, Opsomer G, Van Soom A, et al (2008) Reduced Fertility in High-yielding Dairy Cows: Are the Oocyte and Embryo in Danger? Part I The Importance of Negative Energy Balance and Altered Corpus Luteum Function to the Reduction of Oocyte and Embryo Quality in High-yielding Dairy Cows*. *Reprod Domest Anim* 43:612–622. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2007.00960.x>
- Levy R (2001) Genetic regulation of preimplantation embryo survival. In: *International Review of Cytology*. Elsevier, pp 1–37
- Li E, Bestor TH, Jaenisch R (1992) Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* 69:915–926. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90611-F](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90611-F)
- Li E, Zhang Y (2014) DNA Methylation in Mammals. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6:a019133–a019133. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019133>
- Li L, Zhu S, Shu W, et al (2020) Characterization of Metabolic Patterns in Mouse Oocytes during Meiotic Maturation. *Mol Cell* 80:525-540.e9. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.09.022>
- Lieberman S, Enig MG, Preuss HG (2006) A Review of Monolaurin and Lauric Acid: *Natural Virucidal and Bactericidal Agents*. *Altern Complement Ther* 12:310–314. <https://doi.org/10.1089/act.2006.12.310>
- Lionaki E, Ploumi C, Tavernarakis N (2022) One-Carbon Metabolism: Pulling the Strings behind Aging and Neurodegeneration. *Cells* 11:214. <https://doi.org/10.3390/cells11020214>
- Lobley GE (1992) Control of the metabolic fate of amino acids in ruminants: a review. *J Anim Sci* 70:3264–3275. <https://doi.org/10.2527/1992.70103264x>
- Lombard-Banek C, Portero EP, Onjiko RM, Nemes P (2017) New-generation mass spectrometry expands the toolbox of cell and developmental biology. *genesis* 55:. <https://doi.org/10.1002/dvg.23012>
- Lundquist RG, Otterby DE, Linn JG (1985) Influence of Three Concentrations of DL-Methionine or Methionine Hydroxy Analog on Milk Yield and Milk Composition. *J Dairy Sci* 68:3350–3354. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(85\)81245-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(85)81245-5)
- Lyko F (2018) The DNA methyltransferase family: a versatile toolkit for epigenetic regulation. *Nat Rev Genet* 19:81–92. <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.80>
- Macario AJ L (2007) Molecular chaperones: Multiple functions, pathologies, and potential applications. *Front Biosci* 12:2588. <https://doi.org/10.2741/2257>
- Mahley RW, Innerarity TL, Rall SC, Weisgraber KH (1984) Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *J Lipid Res* 25:1277–1294. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)34443-6](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)34443-6)

- Martin S, Parton RG (2006) Lipid droplets: a unified view of a dynamic organelle. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:373–378. <https://doi.org/10.1038/nrm1912>
- Martínez Y, Li X, Liu G, et al (2017) The role of methionine on metabolism, oxidative stress, and diseases. *Amino Acids* 49:2091–2098. <https://doi.org/10.1007/s00726-017-2494-2>
- Matthews DE (2020) Review of Lysine Metabolism with a Focus on Humans. *J Nutr* 150:2548S-2555S. <https://doi.org/10.1093/jn/nxaa224>
- McEvoy TG, Thompson H, Dolman DF, et al (2002) Effects of epidural injections and transvaginal aspiration of ovarian follicles in heifers used repeatedly for ultrasound-guided retrieval of ova and embryo production. *Vet Rec* 151:653–658. <https://doi.org/10.1136/vr.151.22.653>
- McFadden JW, Girard CL, Tao S, et al (2020) Symposium review: One-carbon metabolism and methyl donor nutrition in the dairy cow. *J Dairy Sci* 103:5668–5683. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17319>
- Meijer GAL, Van Der Meulen J, Bakker JGM, et al (1995) Free Amino Acids in Plasma and Muscle of High Yielding Dairy Cows in Early Lactation. *J Dairy Sci* 78:1131–1141. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(95\)76730-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(95)76730-3)
- Melendez P, Donovan A, Hernandez J (2000) Milk Urea Nitrogen and Infertility in Florida Holstein Cows. *J Dairy Sci* 83:459–463. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)74903-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)74903-4)
- Merton JS, de Roos APW, Mullaart E, et al (2003) Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology* 59:651–674. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)01246-3](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01246-3)
- Nagashima H, Kashiwazaki N, Ashman RJ, et al (1994) Removal of Cytoplasmic Lipid Enhances the Tolerance of Porcine Embryos to Chilling. *Biol Reprod* 51:618–622. <https://doi.org/10.1095/biolreprod51.4.618>
- Nel-Themaat L, Nagy ZP (2011) A review of the promises and pitfalls of oocyte and embryo metabolomics. *Placenta* 32:S257–S263. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2011.05.011>
- Neuer A, Spandorfer SD, Giraldo P, et al (1999) Heat Shock Protein Expression During Gametogenesis and Embryogenesis. *Infect Dis Obstet Gynecol* 7:10–16. <https://doi.org/10.1155/S1064744999000034>
- Niemann H, Wrenzycki C (2000) Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by in vitro culture conditions: Implications for subsequent development. *Theriogenology* 53:21–34. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00237-X](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00237-X)
- Niemann H, Wrenzycki C (eds) (2018) *Animal Biotechnology 1: Reproductive Biotechnologies*. Springer International Publishing, Cham
- Noftsker S, St-Pierre NR, Sylvester JT (2005) Determination of Rumen Degradability and Ruminant Effects of Three Sources of Methionine in Lactating Cows. *J Dairy Sci* 88:223–237. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)72680-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72680-1)

- NRC (2001) Nutrient Requirements of Dairy Cattle: Seventh Revised Edition, 2001. National Academies Press, Washington, D.C.
- Ocon OM, Hansen PJ (2003) Disruption of Bovine Oocytes and Preimplantation Embryos by Urea and Acidic pH. *J Dairy Sci* 86:1194–1200. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73703-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73703-5)
- Okano M, Xie S, Li E (1998) Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nat Genet* 19:219–220. <https://doi.org/10.1038/890>
- Osorio JS, Trevisi E, Ji P, et al (2014) Biomarkers of inflammation, metabolism, and oxidative stress in blood, liver, and milk reveal a better immunometabolic status in periparturient cows supplemented with Smartamine M or MetaSmart. *J Dairy Sci* 97:7437–7450. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7679>
- Overton TR, Lacount DW, Cicela TM, Clark JH (1996) Evaluation of a Ruminally Protected Methionine Product for Lactating Dairy Cows. *J Dairy Sci* 79:631–638. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(96\)76408-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(96)76408-1)
- Pajares MA, Markham GD (2011) Methionine Adenosyltransferase (S-Adenosylmethionine Synthetase). In: Toone EJ (ed) *Advances in Enzymology - and Related Areas of Molecular Biology*, 1st edn. Wiley, pp 449–521
- Patton RA, McCarthy RD, Griel LC (1970) Observations on Rumen Fluid, Blood Serum, and Milk Lipids of Cows Fed Methionine Hydroxy Analog. *J Dairy Sci* 53:776–780. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(70\)86289-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(70)86289-0)
- Pekala J, Patkowska-Sokola B, Bodkowski R, et al (2011) L-Carnitine - Metabolic Functions and Meaning in Humans Life. *Curr Drug Metab* 12:667–678. <https://doi.org/10.2174/138920011796504536>
- Peñagaricano F, Souza AH, Carvalho PD, et al (2013) Effect of Maternal Methionine Supplementation on the Transcriptome of Bovine Preimplantation Embryos. *PLoS ONE* 8:e72302. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072302>
- Petyim S, Bage R, Forsberg M, et al (2000) The Effect of Repeated Follicular Puncture on Ovarian Function in Dairy Heifers. *J Vet Med Ser A* 47:627–640. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0442.2000.00327.x>
- Petyim S, Bage R, Forsberg M, et al (2001) Effects of Repeated Follicular Punctures on Ovarian Morphology and Endocrine Parameters in Dairy Heifers. *J Vet Med Ser A* 48:449–463. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0442.2001.00375.x>
- Petyim S, Båge R, Madej A, Larsson B (2007) Ovum Pick-up in Dairy Heifers: Does it Affect Animal Well-being? *Reprod Domest Anim* 42:623–632. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2006.00833.x>
- Piepenbrink MS, Overton TR, Clark JH (1996) Response of Cows Fed a Low Crude Protein Diet to Ruminally Protected Methionine and Lysine. *J Dairy Sci* 79:1638–1646. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(96\)76527-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(96)76527-X)

- Pieterse MC, Kappen KA, Kruip ThAM, Taverne MAM (1988) Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology* 30:751–762. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(88\)90310-X](https://doi.org/10.1016/0093-691X(88)90310-X)
- Pieterse MC, Vos PLAM, Kruip ThAM, et al (1991a) Transvaginal ultrasound guided follicular aspiration of bovine oocytes. *Theriogenology* 35:857–862. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(91\)90426-E](https://doi.org/10.1016/0093-691X(91)90426-E)
- Pieterse MC, Vos PLAM, Kruip ThAM, et al (1991b) Characteristics of bovine estrous cycles during repeated transvaginal, ultrasound-guided puncturing of follicles for ovum pick-up. *Theriogenology* 35:401–413. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(91\)90290-T](https://doi.org/10.1016/0093-691X(91)90290-T)
- Pisulewski PM, Rulquin H, Peyraud JL, Verite R (1996) Lactational and Systemic Responses of Dairy Cows to Postruminal Infusions of Increasing Amounts of Methionine. *J Dairy Sci* 79:1781–1791. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(96\)76546-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(96)76546-3)
- Prates EG, Nunes JT, Pereira RM (2014) A Role of Lipid Metabolism during Cumulus-Oocyte Complex Maturation: Impact of Lipid Modulators to Improve Embryo Production. *Mediators Inflamm* 2014:1–11. <https://doi.org/10.1155/2014/692067>
- Pullen DL, Palmquist DL, Emery RS (1989) Effect on Days of Lactation and Methionine Hydroxy Analog on Incorporation of Plasma Fatty Acids into Plasma Triglycerides. *J Dairy Sci* 72:49–58. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(89\)79079-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(89)79079-2)
- Rashid MB, Marey MA, Fukuda K, et al (2022) Intrauterine infusion of low levels of interferon-tau on day-8 post-estrus stimulates the bovine endometrium to secrete apolipoprotein-A1: A possible implication for early embryo tolerance. *Am J Reprod Immunol* 88:e13592. <https://doi.org/10.1111/aji.13592>
- Reiners JN, Held JE, Wright CL, et al (2017) Lysine bioavailability among 2 lipid-coated lysine products after exposure to silage1. *Transl Anim Sci* 1:311–319. <https://doi.org/10.2527/tas2017.0037>
- Reuter SE, Evans AM (2012) Carnitine and Acylcarnitines: Pharmacokinetic, Pharmacological and Clinical Aspects. *Clin Pharmacokinet* 51:553–572. <https://doi.org/10.1007/BF03261931>
- Rhoads ML, Rhoads RP, Gilbert RO, et al (2006) Detrimental effects of high plasma urea nitrogen levels on viability of embryos from lactating dairy cows. *Anim Reprod Sci* 91:1–10. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.02.009>
- Rincón JAA, Pradié J, Remião MH, et al (2019) Effect of high-density lipoprotein on oocyte maturation and bovine embryo development in vitro. *Reprod Domest Anim* 54:445–455. <https://doi.org/10.1111/rda.13373>
- Ritossa F (1962) A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in drosophila. *Experientia* 18:571–573. <https://doi.org/10.1007/BF02172188>
- Roberts RM, Leaman DW, Cross JC (1992) Role of Interferons in Maternal Recognition of Pregnancy in Ruminants. *Exp Biol Med* 200:7–18. <https://doi.org/10.3181/00379727-200-43387A>

- Robinson PH (2010) Impacts of manipulating ration metabolizable lysine and methionine levels on the performance of lactating dairy cows: A systematic review of the literature. *Livest Sci* 127:115–126. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2009.10.003>
- Robinson PH, Chalupa W, Sniffen CJ, et al (2000) Influence of abomasal infusion of high levels of lysine or methionine, or both, on ruminal fermentation, eating behavior, and performance of lactating dairy cows. *J Anim Sci* 78:1067. <https://doi.org/10.2527/2000.7841067x>
- Robinson PH, DePeters EJ, Shinzato I, Sato H (2005) Influence of feeding free lysine to early lactation dairy cows on ruminal lysine escape, rumen fermentation and productivity. *Anim Feed Sci Technol* 118:201–214. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2004.11.005>
- Robinson PH, Swanepoel N, Evans E (2010) Effects of feeding a ruminally protected lysine product, with or without isoleucine, valine and histidine, to lactating dairy cows on their productive performance and plasma amino acid profiles. *Anim Feed Sci Technol* 161:75–84. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2010.07.017>
- Robinson PH, Swanepoel N, Shinzato I, Juchem SO (2011) Productive responses of lactating dairy cattle to supplementing high levels of ruminally protected lysine using a rumen protection technology. *Anim Feed Sci Technol* 168:30–41. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.03.019>
- Rossi F, Maurizio M, Francesco M, et al (2003) Rumen degradation and intestinal digestibility of rumen protected amino acids: comparison between in situ and in vitro data. *Anim Feed Sci Technol* 108:223–229. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(03\)00131-7](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(03)00131-7)
- Rulquin H (1987) Détermination de certains acides aminés limitants chez la vache laitière par la méthode des administrations post-ruminales. *Reprod Nutr Dév* 27:299–300. <https://doi.org/10.1051/rnd:19870259>
- Rulquin H, Graulet B, Delaby L, Robert JC (2006) Effect of Different Forms of Methionine on Lactational Performance of Dairy Cows. *J Dairy Sci* 89:4387–4394. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72485-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72485-7)
- Rulquin H, Kowalczyk J (2003) Development of a method for measuring lysine and methionine bioavailability in rumen-protected products for cattle. *J Anim Feed Sci* 12:465–474. <https://doi.org/10.22358/jafs/67723/2003>
- Russell DF, Baqir S, Bordignon J, Betts DH (2006) The impact of oocyte maturation media on early bovine embryonic development. *Mol Reprod Dev* 73:1255–1270. <https://doi.org/10.1002/mrd.20553>
- Russell DF, Betts DH (2008) Alternative splicing and expression analysis of bovine DNA methyltransferase 1. *Dev Dyn* 237:1051–1059. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21474>
- Sánchez JM, Mathew DJ, Passaro C, et al (2018) Embryonic maternal interaction in cattle and its relationship with fertility. *Reprod Domest Anim* 53:20–27. <https://doi.org/10.1111/rda.13297>
- Santos P, Marques A, Antunes G, et al (2009) Effects of Plasma Urea Nitrogen Levels on the Bovine Oocyte Ability to Develop After *In vitro* Fertilization. *Reprod Domest Anim* 44:783–787. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01075.x>

- Schöneich C (2005) Methionine oxidation by reactive oxygen species: reaction mechanisms and relevance to Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta BBA - Proteins Proteomics* 1703:111–119. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2004.09.009>
- Schuba J, Südekum K-H (2013) Pansengeschützte Aminosäuren in der Milchkuhfütterung unter besonderer Berücksichtigung von Methionin und Lysin. *Übers Tierernährg* 40:113–149
- Schwab CG (1995) Protected proteins and amino acids for ruminants. In: Wallace RJ, Chesson A (eds) *Biotechnology in Animal Feeds and Animal Feeding*. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany, pp 115–141
- Schwab CG, Bozak CK, Whitehouse NL, Mesbah MM (1992) Amino acid limitation and flow to duodenum at four stages of lactation. 1. Sequence of lysine and methionine limitation. *J Dairy Sci* 75:3486–3502. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(92\)78125-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(92)78125-9)
- Schwab CG, Broderick GA (2017) A 100-Year Review: Protein and amino acid nutrition in dairy cows. *J Dairy Sci* 100:10094–10112. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13320>
- Schwab CG, Satter LD, Clay AB (1976) Response of Lactating Dairy Cows to Abomasal Infusion of Amino Acids. *J Dairy Sci* 59:1254–1270. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(76\)84354-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(76)84354-8)
- Shahid Z, Simpson B, Miao KH, Singh G (2021) Genetics, Histone Code. In: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL)
- Sinclair KD, Allegrucci C, Singh R, et al (2007) DNA methylation, insulin resistance, and blood pressure in offspring determined by maternal periconceptional B vitamin and methionine status. *Proc Natl Acad Sci* 104:19351–19356. <https://doi.org/10.1073/pnas.0707258104>
- Sinclair KD, Kuran M, Gebbie FE, et al (2000) Nitrogen metabolism and fertility in cattle: II. Development of oocytes recovered from heifers offered diets differing in their rate of nitrogen release in the rumen. *J Anim Sci* 78:2670. <https://doi.org/10.2527/2000.78102670x>
- Singh R, Sinclair KD (2007) Metabolomics: Approaches to assessing oocyte and embryo quality. *Theriogenology* 68:S56–S62. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.04.007>
- Soares MSP, Oliveira PS, Debom GN, et al (2017) Chronic administration of methionine and/or methionine sulfoxide alters oxidative stress parameters and ALA-D activity in liver and kidney of young rats. *Amino Acids* 49:129–138. <https://doi.org/10.1007/s00726-016-2340-y>
- Sok M, Ouellet DR, Firkins JL, et al (2017) Amino acid composition of rumen bacteria and protozoa in cattle. *J Dairy Sci* 100:5241–5249. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12447>
- Steele W, Allegrucci C, Singh R, et al (2005) Human embryonic stem cell methyl cycle enzyme expression: modelling epigenetic programming in assisted reproduction? *Reprod Biomed Online* 10:755–766. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)61120-0](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)61120-0)
- Stella SL, Guadagnin AR, Velasco-Acosta DA, et al (2024) Rumen-protected methionine supplementation alters lipid profile of preimplantation embryo and endometrial tissue of Holstein cows. *Front Vet Sci* 10:1301986. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1301986>

- St-Pierre NR, Sylvester JT (2005) Effects of 2-Hydroxy-4-(Methylthio) Butanoic Acid (HMB) and Its Isopropyl Ester on Milk Production and Composition by Holstein Cows. *J Dairy Sci* 88:2487–2497. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)72926-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72926-X)
- Strang BD, Bertics SJ, Grummer RR, Armentano LE (1998) Effect of Long-Chain Fatty Acids on Triglyceride Accumulation, Gluconeogenesis, and Ureagenesis in Bovine Hepatocytes. *J Dairy Sci* 81:728–739. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(98\)75629-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75629-2)
- Südekum K-H, Wolfram S, Ader P, Robert J-C (2004) Bioavailability of three ruminally protected methionine sources in cattle. *Anim Feed Sci Technol* 113:17–25. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2003.11.001>
- Sun X-F, Zhang W-H, Chen X-J, et al (2004) Spindle dynamics in living mouse oocytes during meiotic maturation, ageing, cooling and overheating: a study by polarized light microscopy. *Zygote* 12:241–249. <https://doi.org/10.1017/S0967199404002850>
- Tham YY, Choo QC, Muhammad TST, Chew CH (2020) Lauric acid alleviates insulin resistance by improving mitochondrial biogenesis in THP-1 macrophages. *Mol Biol Rep* 47:9595–9607. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-06019-9>
- Toledo MZ, Baez GM, Garcia-Guerra A, et al (2017) Effect of feeding rumen-protected methionine on productive and reproductive performance of dairy cows. *PLOS ONE* 12:e0189117. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189117>
- Třináctý J, Křížová L, Richter M, et al (2009) Effect of rumen-protected methionine, lysine or both on milk production and plasma amino acids of high-yielding dairy cows. *Czech J Anim Sci* 54:239–248. <https://doi.org/10.17221/1730-CJAS>
- Uysal F, Akkoyunlu G, Ozturk S (2015) Dynamic expression of DNA methyltransferases (DNMTs) in oocytes and early embryos. *Biochimie* 116:103–113. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.06.019>
- Van den Veyver IB (2002) GENETIC EFFECTS OF METHYLATION DIETS. *Annu Rev Nutr* 22:255–282. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.22.010402.102932>
- Viana JHM (2023) 2022 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals
- Vik-mo L, Emery RS, Huber JT (1974) Milk Protein Production in Cows Abomasally Infused with Casein or Glucose. *J Dairy Sci* 57:869–877. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(74\)84979-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(74)84979-9)
- Virtanen AI (1966) Milk Production of Cows on Protein-Free Feed. *Science* 153:1603–1614. <https://doi.org/10.1126/science.153.3744.1603>
- Wang M, Wang C, Han X (2017) Selection of internal standards for accurate quantification of complex lipid species in biological extracts by electrospray ionization mass spectrometry-What, how and why?: INTERNAL STANDARDS FOR QUANTIFICATION OF LIPIDS IN LIPIDOMICS. *Mass Spectrom Rev* 36:693–714. <https://doi.org/10.1002/mas.21492>
- Waterland RA (2006) Assessing the Effects of High Methionine Intake on DNA Methylation. *J Nutr* 136:1706S-1710S. <https://doi.org/10.1093/jn/136.6.1706S>

- Weekes TL, Luimes PH, Cant JP (2006) Responses to Amino Acid Imbalances and Deficiencies in Lactating Dairy Cows. *J Dairy Sci* 89:2177–2187. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72288-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72288-3)
- Welch WJ (1992) Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. *Physiol Rev* 72:1063–1081. <https://doi.org/10.1152/physrev.1992.72.4.1063>
- Whitehouse NL, Schwab CG, Brito AF (2017) The plasma free amino acid dose-response technique: A proposed methodology for determining lysine relative bioavailability of rumen-protected lysine supplements. *J Dairy Sci* 100:9585–9601. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12695>
- Williams JF, Blackmore PF, Duke CC, MacLeod JK (1980) Fact, uncertainty and speculation concerning the biochemistry of d-erythrose-4-phosphate and its metabolic roles. *Int J Biochem* 12:339–344. [https://doi.org/10.1016/0020-711X\(80\)90112-3](https://doi.org/10.1016/0020-711X(80)90112-3)
- Wrenzycki C (2018) Gene expression analysis and in vitro production procedures for bovine preimplantation embryos: Past highlights, present concepts and future prospects. *Reprod Domest Anim* 53:14–19. <https://doi.org/10.1111/rda.13260>
- Wrenzycki C, Herrmann D, Carnwath JW, Niemann H (1998) Expression of RNA from developmentally important genes in preimplantation bovine embryos produced in TCM supplemented with BSA. *Reproduction* 112:387–398. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1120387>
- Wrenzycki C, Herrmann D, Carnwath JW, Niemann H (1999) Alterations in the relative abundance of gene transcripts in preimplantation bovine embryos cultured in medium supplemented with either serum or PVA. 11
- Wrenzycki C, Herrmann D, Keskinetepe L, et al (2001a) Effects of culture system and protein supplementation on mRNA expression in pre-implantation bovine embryos. *Hum Reprod* 16:893–901. <https://doi.org/10.1093/humrep/16.5.893>
- Wrenzycki C, Niemann H (2003) Epigenetic reprogramming in early embryonic development: effects of in-vitro production and somatic nuclear transfer. *Reprod Biomed Online* 7:649–656. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)62087-1](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)62087-1)
- Wrenzycki C, Wells D, Herrmann D, et al (2001b) Nuclear Transfer Protocol Affects Messenger RNA Expression Patterns in Cloned Bovine Blastocysts. *Biol Reprod* 65:309–317. <https://doi.org/10.1095/biolreprod65.1.309>
- Wu Z, Bagarolo GI, Thoröe-Boveleth S, Jankowski J (2020) “Lipidomics”: Mass spectrometric and chemometric analyses of lipids. *Adv Drug Deliv Rev* 159:294–307. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.06.009>
- Wu Z, Bernard JK, Eggleston RB, Jenkins TC (2012) Ruminally escape and intestinal digestibility of ruminally protected lysine supplements differing in oleic acid and lysine concentrations. *J Dairy Sci* 95:2680–2684. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-5203>
- Wulff JE, Mitchell MW (2018) A Comparison of Various Normalization Methods for LC/MS Metabolomics Data. *Adv Biosci Biotechnol* 09:339–351. <https://doi.org/10.4236/abb.2018.98022>

Literaturverzeichnis

- Xu S, Harrison JH, Chalupa W, et al (1998) The Effect of Ruminant Bypass Lysine and Methionine on Milk Yield and Composition of Lactating Cows. *J Dairy Sci* 81:1062–1077. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(98\)75668-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75668-1)
- Yang (2010) Effects of Rumen-Protected Methionine on Dairy Performance and Amino Acid Metabolism in Lactating Cows. *Am J Anim Vet Sci* 5:1–7. <https://doi.org/10.3844/ajavsp.2010.1.7>
- Zhang Y, Sun Z, Jia J, et al (2021) Overview of Histone Modification. In: Fang D, Han J (eds) *Histone Mutations and Cancer*. Springer Singapore, Singapore, pp 1–16
- Zhou X, He L, Wan D, et al (2016a) Methionine restriction on lipid metabolism and its possible mechanisms. *Amino Acids* 48:1533–1540. <https://doi.org/10.1007/s00726-016-2247-7>
- Zhou Z, Bulgari O, Vailati-Riboni M, et al (2016b) Rumen-protected methionine compared with rumen-protected choline improves immunometabolic status in dairy cows during the periparturient period. *J Dairy Sci* 99:8956–8969. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-10986>
- Zhu LH, Armentano LE, Bremmer DR, et al (2000) Plasma Concentration of Urea, Ammonia, Glutamine Around Calving, and the Relation of Hepatic Triglyceride, to Plasma Ammonia Removal and Blood Acid-Base Balance. *J Dairy Sci* 83:734–740. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)74935-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)74935-6)

11 Erklärung zur Dissertation:

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten.

Markus Ritz

12 DANKSAGUNG:

Zunächst ein riesiges Dankeschön an Frau Prof. Dr. Christine Wrenzycki für die Überlassung dieses interessanten Themas, die enthusiastische Unterstützung beim Anfertigen der Arbeit und die konstruktive Kritik.

Mein besonderer Dank geht an Andrés Felipe González Serrano (PhD) für die unglaubliche Unterstützung während des gesamten Versuchs, die Einarbeitung und das Herzblut, das er in dieses Projekt eingebracht hat. Ohne ihn wäre das nicht möglich gewesen.

Danke an Dr. Ann-Selina Fries, Dr. Nadja Blad-Stahl, Dr. Patricia Kasper, Sabine Feller und Franziska Kotarski für die Einarbeitung und Unterstützung im IVP-Labor.

Vielen Dank an Birgit Rabenau und Bettina Zimmer für die Durchführung der RT-qPCR.

Ein weiterer Dank geht auch an die Lehr- Versuchsanstalt für Viehhaltung, Hofgut Neumühle für die Bereitstellung, Fütterung und Betreuung der Versuchstiere. Dieses betrifft vor allem Dr. Theresa Scheu und Prof. Dr. Christian Koch.

Für die Untersuchung der Proben mittels Massenspektrometrie möchte ich mich bei Christina Ramires Ferreira (PhD) von dem Binley Bioscience Center der Purdue University bedanken.

Ebenfalls vielen Dank an Dr. Erika Most, Marco Jäger, Nicole Krämer und Prof. Dr. Klaus Eder aus dem Institut für Tierernährung und Ernährungsphysiologie der JLU Gießen für die Bestimmung der Aminosäuregehalte im Plasma.

Bei Dr. Kathrin Büttner möchte ich mich für die Hilfe bei statistischen Fragen bedanken.

Meiner Familie danke ich für die unglaubliche Geduld, das Vertrauen und die Unterstützung während der gesamten Arbeit. Danke, dass Ihr immer für mich da seid!

ISBN: 978-3-86345-755-6



Verlag der DVG Service GmbH

An der Alten Post 2 • 35390 Gießen

Tel.: 0641 984446-0 • Fax: 0641 984446-25

E-Mail: info@dvg.de • Web: www.dvg.de