

Aus dem Institut für Tierernährung und Ernährungsphysiologie  
des Fachbereichs 09 der Justus-Liebig-Universität Gießen

---

**Ursachen von Stress des endoplasmatischen Retikulums und dessen  
Bedeutung bei der Entstehung von Fettleber und Ketose während der  
Frühlaktation der Milchkuh**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Biologie und Chemie

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

**Lena Marie Sandrock, geb. Hof**

(staatlich geprüfte Lebensmittelchemikerin)

aus Dillenburg

Gießen 2020

Diese Dissertation wurde am Institut für Tierernährung und Ernährungsphysiologie am Fachbereich 09 Agrarwissenschaften, Ökotoxikologie und Umweltmanagement der Justus-Liebig-Universität Gießen angefertigt.

Dekan: Prof. Dr. J. Janek

1. Gutachter: Prof. Dr. Klaus Eder

Institut für Tierernährung und Ernährungsphysiologie, Justus-Liebig-Universität Gießen

2. Gutachter: Prof. Dr. Holger Zorn

Institut für Lebensmittelchemie und Lebensmittelbiotechnologie, Justus-Liebig-Universität  
Gießen

## **Erklärung**

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig 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 Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Ich stimme einer eventuellen Überprüfung meiner Dissertation durch eine Antiplagiat-Software zu. 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.

---

Lena Marie Hof

## Danksagung

Zunächst einmal möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Eder recht herzlich für die Überlassung und wissenschaftliche Betreuung des sehr interessanten Forschungsthemas bedanken. Des Weiteren danke ich Herrn Prof. Dr. Zorn für die Übernahme des Zweitgutachtens. Mein weiterer Dank geht an Frau Dr. habil. Denise Geßner für die wissenschaftliche Unterstützung und die anregenden Diskussionen. Ganz besonders möchte ich auch meinen „Laborgenossinnen und dem Genosse“, insbesondere Sandra Meyer und Corinna Brock für den regen Austausch innerhalb und außerhalb des Labors danken. Ein großer Dank geht auch an alle technischen Angestellten am Institut für Tierernährung für die Unterstützung im Laboralltag. Vor allem Frau Christiane Happel danke ich für die gute Zusammenarbeit und das ein oder andere aufmunternde Wort. Ebenfalls danke ich Frau Dr. Erika Most für die Unterstützung bei den HPLC-Analysen und Herrn Prof. Dr. Robert Ringseis sowie Frau Dr. Gaiping Weng für ihr offenes Ohr und den wissenschaftlichen Austausch.

Mein Dank geht auch an Herrn Dr. Koch und die beteiligten Tierärztinnen an der Lehr- und Versuchsstation Neumühle für die Koordination und Durchführung des dieser Arbeit vorausgehenden Tierversuches.

Frau Susanna Ziegler und Herrn Prof. Dr. Jochen Wilhelm danke ich für die Möglichkeit der Nutzung des Bioanalyzers. Weiterhin danke ich Frau Dr. Eva Herzog für die statistische Beratung.

Meinem Bruder danke ich recht herzlich für die Hilfe bei dem einem oder anderen Problem mit der Statistiksoftware R.

Weiterhin danke ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die finanzielle Förderung dieses Forschungsprojektes (Aktenzeichen: GZ: GE 2925/1-1).

Mein besonderer Dank geht an meine Eltern Anette und Jürgen Hof. Ich danke euch für die Unterstützung und den Rückhalt während meines gesamten Studiums. Ohne euch wäre diese Promotion nicht möglich gewesen!

Danke!

## Zusammenfassung

Bei hochleistenden Milchkühen sind Fettleber und Ketose bedeutende Stoffwechselerkrankungen, die sowohl das Tierwohl beeinträchtigen als auch ein ökonomisches Problem darstellen. Die biochemischen Ursachen dieser Erkrankungen sind bislang noch nicht vollständig geklärt. Der Organismus der Milchkuh unterliegt in der peripartalen Phase einer Reihe von Stoffwechselanpassungen, die mit dem Auftreten einer negativen Energiebilanz (NEB) postpartum einhergehen. Obwohl die NEB ein Phänomen ist, das nahezu alle hochleistenden Milchkühe in der Früh lactation betrifft, entwickeln jedoch nur bestimmte Tiere eine Erkrankung. Bei früh lactierenden Milchkühen wurde das Auftreten von Stress des endoplasmatischen Retikulums (ER-Stress) beobachtet. ER-Stress könnte ein Faktor sein, der einen Einfluss auf die individuelle Anpassungskapazität der Leber der Tiere hat und somit in Verbindung mit dem Auftreten von Fettleber und Ketose steht. Über die Ursachen des Auftretens von ER-Stress bei Wiederkäuern ist bislang noch wenig bekannt. Daher sollte die vorliegende Arbeit nähere Erkenntnisse zu den Ursachen des Auftretens von ER-Stress bei früh lactierenden Milchkühen liefern und einen möglichen Zusammenhang zum hepatischen Lipidstoffwechsel untersuchen.

In den Versuch wurden 50 hochleistende Holstein-Kühen in der peripartalen Phase einbezogen. Plasma und Leberbiopate der Tiere wurden in Woche 2 antepartum sowie in den Wochen 1, 4 und 7 postpartum entnommen. Die hepatischen mRNA-Expressionen von ausgewählten Genen relevanter Stoffwechselwege (u. a. Lipidstoffwechsel, Inflammation, *Unfolded protein response*) wurden mittels quantitativer Polymerasekettenreaktion bestimmt. Im Plasma wurden u. a. Parameter des oxidativen Stresses, Proteine ausgewählter Stoffwechselwege sowie die Konzentration an freien Fettsäuren, Triglyceriden (TG) und 3-Hydroxybutansäure (BHBA) analysiert. Über den Versuchszeitraum hinweg wurden außerdem die Futteraufnahme sowie die Milchleistung aufgezeichnet.

Nach der Abkalbung konnte das Auftreten einer negativen Energiebilanz beobachtet werden. In Woche 1 postpartum kam es zu einem deutlichen Anstieg der Konzentration an freien Fettsäuren und BHBA im Plasma, während die hepatische Konzentration an Triglyceriden und Cholesterol ebenfalls signifikant erhöht war. Des Weiteren wiesen die Daten der vorliegenden Studie auf das Vorliegen eines hepatischen Entzündungszustandes und ein erhöhtes Level an oxidativem Stress postpartum hin. Das Auftreten von ER-Stress war bei den untersuchten Tieren insgesamt nur gering ausgeprägt.

Durch Korrelationsanalysen und den Vergleich der Tiere mit hohem, mittlerem und niedrigem ER-Stress-Level konnten dennoch Zusammenhänge zwischen ER-Stress und einem

hepatischen Entzündungsprozess sowie der Induktion des *Fibroblast-growth-factor 21* (FGF21) beobachtet werden. Die Konzentration an freien Fettsäuren im Plasma sowie Parameter des oxidativen Stresses oder des Calciumstoffwechsel zeigten keinen oder nur einen geringen Einfluss auf ER-Stress.

Nach der Abkalbung kam es zu einem starken signifikanten Anstieg der hepatischen *FGF21*-mRNA-Konzentration (Faktor 16). In Woche 1 postpartum war die hepatische mRNA-Konzentration mit Parametern der Inflammation, des oxidativen Stresses und des ER-Stresses korreliert. Die Daten der vorliegenden Studie deuten somit darauf hin, dass FGF21 bei frühlaktierenden Milchkühen eine Rolle bei der Anpassung an Stress (z. B. in Form von ER-Stress, Inflammation und/-oder oxidativem Stress) spielen könnte.

Eine erhöhte hepatische Konzentration an Triglyceriden (TG) trat in der vorliegenden Studie überwiegend gemeinsam mit einer erhöhten Konzentrationen an BHBA im Plasma auf. Beiden Stoffwechsellage lag eine stark ausgeprägte negative Energiebilanz sowie eine erhöhte Konzentration an freien Fettsäuren im Plasma zugrunde. Korrelationsanalysen der Daten aus Woche 1 pp. sowie ein Vergleich zwischen Tieren mit erhöhter hepatischer TG-Konzentration bzw. erhöhter BHBA-Konzentration im Plasma und unauffälligen Tieren, wiesen auf einen Zusammenhang zwischen ER-Stress und diesen Stoffwechsellage hin. Somit ist es wahrscheinlich, dass das Auftreten von ER-Stress in der Frühaktation mit der Entstehung von Fettleber und Ketose assoziiert ist.

Ein Einfluss von ER-Stress oder der Expression des Stresshormons FGF21 auf die Milchleistung konnte nicht beobachtet werden. Eine höhere Milchleistung war jedoch invers mit Parametern der Inflammation sowie positiv mit der Konzentration an Vitaminen sowie der Calcium-Konzentration im Plasma korreliert. Des Weiteren deuten die Ergebnisse der vorliegenden Studie darauf hin, dass der Calciumgehalt im Plasma, der eine wichtige Rolle bei der Milchbildung spielt, durch Inflammation und Lipopolysaccharide negativ beeinflusst wird, während die Phosphat-Konzentration bei Entzündung anstieg.

Insgesamt konnten in dieser Arbeit nähere Erkenntnisse zu den Stoffwechsellage, insbesondere der Rolle von ER-Stress und der Induktion des Stresshormons FGF21, bei frühlaktierenden Milchkühen gewonnen werden. Es wurde gezeigt, dass ER-Stress im Zusammenhang mit einer erhöhten hepatischen Triglyceridkonzentration steht und somit eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Stoffwechsellage wie Fettleber und Ketose spielen könnte. Eine Reduktion des ER-Stresses oder auch der mit ER-Stress im Zusammenhang stehenden hepatischen Inflammation in der Frühaktation könnte ein wichtiger Ansatz zur Reduktion von Stoffwechsellage und der Verbesserung des Tierwohls sein.

## **Abstract**

In high-yielding dairy cows fatty liver and ketosis are important metabolic diseases. Both diseases affect animal welfare and are an economic problem. The biochemical causes of these diseases are not fully understood yet. In the peripartum period the organism of dairy cows undergoes several metabolic adaptations which are associated with the occurrence of a negative energy balance (NEB) after calving. Although NEB is a phenomenon which affects almost all high-yielding dairy cows in early lactation, not all animals develop metabolic diseases. In early lactating dairy cows, the occurrence of endoplasmic reticulum stress (ER stress) was observed. ER stress could be a factor which plays an important role in the individual adaptation of the liver and may be related to the development of fatty liver and ketosis.

So far little is known about the causes of ER stress in ruminants. Therefore, in the present work the sources of ER stress in early lactating dairy cows and a possible link between ER stress and hepatic lipid metabolism were examined.

50 high performance Holstein cows in the peripartal phase were included in the trial. Plasma and liver biopsies of the animals were taken at week 2 antepartum and at week 1, 4 and 7 postpartum. Hepatic mRNA expressions of selected genes representing different metabolic pathways (including lipid metabolism, inflammation, unfolded protein response) were determined by quantitative polymerase chain reaction. Parameters of oxidative stress, proteins of selected metabolic pathways as well as the concentration of free fatty acids, Triglycerides and 3-hydroxybutanoic acid (BHBA) were analysed in the plasma. Additionally, feed intake and milk yield were recorded over the trial period.

After calving the cows were in a negative energy balance. At week 1 postpartum in plasma a marked increase in the concentrations of free fatty acids and BHBA could be observed. Additionally, the hepatic concentrations of triglycerides (TG) and cholesterol were significantly increased. Furthermore, data from the present study indicated the presence of a hepatic inflammation and an elevated level of oxidative stress postpartum.

Besides the overall incidence of ER stress was low in the animals which were studied, correlation analyses and the comparison of animals with high, medium and low levels of ER stress showed associations between ER stress and a hepatic inflammatory process as well as the induction of fibroblast growth factor 21 (FGF21). The concentration of free fatty acids in the plasma as well as parameters of the oxidative stress and parameters of the calcium metabolism had no or only a small influence on ER stress.

After calving there was a significant increase in the hepatic mRNA concentration of FGF21 (factor 16). At week 1 postpartum the hepatic mRNA concentration was correlated with parameters of inflammation, oxidative stress and ER stress. The data from the present study suggest that FGF21 may play a role in the adaptation to stress (e.g. adaptation of ER stress, inflammation and / or oxidative stress) in early lactating dairy cows.

An increased hepatic concentration of triglycerides (TG) in the present study was associated with increased plasma BHBA levels. Hepatic concentrations of TG as well as the BHBA concentration in plasma were associated with a pronounced negative energy balance and an increased concentration of free fatty acids in plasma. Results obtained from correlation analysis of data from week 1 pp. as well as from comparison analysis (comparison of animals with elevated vs. normal hepatic TG and comparison of animals with elevated vs. normal BHBA concentrations) indicated connections between ER stress and elevated TG as well as ER stress and elevated BHBA levels. Thus, the occurrence of ER stress in early lactation is likely to be associated with the development of fatty liver and ketosis.

An influence of ER stress or the expression of the stress hormone FGF21 on the milk yield could not be observed. However, a higher milk yield was inversely correlated with inflammatory-parameters and positively correlated with the concentration of vitamins as well as the calcium concentration in plasma.

Furthermore, the results of the present study indicate that the plasma calcium concentration, which plays an important role during the production of milk, is negatively affected by inflammation and the lipopolysaccharide concentration in plasma. The phosphate concentration is positively correlated to inflammation.

Overall, this work provided more detailed knowledge about the metabolism, especially the role of ER stress and the induction of the stress hormone FGF21, in early lactating dairy cows. It has been shown that ER stress is associated with an increased hepatic triglyceride concentration. Therefore, ER stress could play an important role in the development of metabolic diseases such as fatty liver and ketosis. Reducing ER stress or the hepatic inflammation, which is associated with ER stress, could be an important approach for the prevention of metabolic diseases and improvement of animal welfare.

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	IX
Abkürzungsverzeichnis.....	XIII
1 Einleitung	1
1.1 Stoffwechsellanpassungen während der peripartalen Phase	1
1.1.1 Lipidstoffwechsel	1
1.1.1.1 Ketogenese	4
1.1.2 Inflammation	5
1.1.3 Oxidativer Stress	6
1.1.4 Calcium und Vitamin D Stoffwechsel	7
1.2 Stress des endoplasmatischen Retikulums und Unfolded protein response (UPR)	9
1.2.1 Nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2)	11
1.2.2 Fibroblast growth factor 21 (FGF21)	12
1.3 Fragestellung und Ziel dieser Arbeit	13
2 Material und Methoden	15
2.1 Chemikalien	15
2.2 Geräte und Hilfsmittel	18
2.3 Tierversuch und Probennahme	21
2.4 Genexpressionsanalysen	24
2.4.1 Herstellung von Diethylcarbonat-Wasser (DEPC-Wasser)	24
2.4.2 RNA-Isolation	24
2.4.3 Bestimmung der RNA Qualität und Integrität	24
2.4.4 cDNA-Synthese	25
2.4.5 Quantitative Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)	26
2.4.6 Agarosegelelektrophorese	33
2.5 Western Blot	34
2.5.1 Proteinisolation	35
2.5.2 Bestimmung des Proteingehaltes	35
2.5.3 Gelelektrophorese	36
2.5.4 Western Blot	37
2.6 Bestimmung von Parametern des oxidativen Stresses	38
2.6.1 Trolox-äquivalente antioxidative Kapazität (TEAC)	38
2.6.2 Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen (TBARS)	40
2.6.3 Bestimmung von Proteincarbonylen im Plasma	42
	IX

2.6.4	Bestimmung von Vitaminen mittels HPLC	43
2.6.4.1	Probenaufarbeitung	43
2.6.4.2	Bestimmung von Retinol, $\alpha$ - und $\gamma$ -Tocopherol	44
2.6.4.3	Bestimmung von $\beta$ -Carotin	45
2.7	Bestimmung von Parametern des Fettstoffwechsels	47
2.7.1	Nicht-veresterte, freie Fettsäuren (NEFA)	47
2.7.2	3-Hydroxybutansäure (BHBA)	49
2.7.3	Bestimmung der Triglycerid-Konzentration in Plasma und Leber	51
2.7.3.1	Bestimmung der Triglycerid-Konzentration im Plasma	52
2.7.3.2	Bestimmung der Triglycerid-Konzentration in der Leber	52
2.7.4	Bestimmung von Cholesterol in Plasma und Leber	53
2.7.4.1	Bestimmung der Cholesterol-Konzentration im Plasma	53
2.7.4.2	Bestimmung der Cholesterol-Konzentration in der Leber	54
2.8	Bestimmung von Albumin im Plasma	54
2.9	Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	55
2.9.1	Sandwich-ELISA	56
2.9.2	Kompetitiver ELISA	57
2.10	Bestimmung von Parametern des Calciumstoffwechsels	58
2.10.1	Bestimmung von Calcium mittels Atomabsorptionsspektroskopie (AAS)	58
2.10.2	Bestimmung von Phosphat im Plasma	59
2.11	Statistische Auswertung	60
3	Ergebnisse	61
3.1	Stoffwechselanpassungen während der peripartalen Phase	61
3.1.1	Fettmobilisation	62
3.1.1.1	Freie Fettsäuren (NEFA)	62
3.1.1.2	Triglyceride und Cholesterol im Plasma	62
3.1.2	Auftreten von Inflammation in der Frühlaktation	63
3.1.2.1	Energiebilanz, freie Fettsäuren und Inflammation	65
3.1.2.2	Lipopolysaccharide	65
3.1.3	Oxidativer Stress	66
3.1.3.1	Oxidativer Stress, Energiebilanz und NEFA	67
3.1.3.2	Oxidativer Stress und Inflammation	67
3.1.4	Nrf2-Weg	68
3.1.4.1	Nrf2-Aktivierung, Energiebilanz und freie Fettsäuren	68

3.1.4.2	Nrf2-Aktivierung und Inflammation	69
3.1.4.3	Nrf2-Aktivierung und oxidativer Stress	70
3.1.5	FGF21	70
3.1.5.1	FGF21, Energiebilanz und freie Fettsäuren	71
3.1.5.2	FGF21 und Inflammation	71
3.1.5.3	FGF21 und oxidativer Stress	72
3.1.6	Calcium- und Vitamin D- Stoffwechsel	72
3.1.6.1	Calcium-, Vitamin D- Stoffwechsel, Energiebilanz und freie Fettsäuren,	73
3.1.6.2	Calcium-, Vitamin D Stoffwechsel und oxidativer Stress	73
3.1.6.3	Calcium-, Vitamin D- Stoffwechsel und FGF21	73
3.1.6.4	Calcium-, Vitamin D- Stoffwechsel und Nrf2-Aktivierung	73
3.1.6.5	Calcium-, Vitamin D Stoffwechsel und Inflammation	73
3.2	Auftreten und Ursachen von ER-Stress in der Frühlaktation	75
3.2.1	Energiebilanz und freie Fettsäuren	76
3.2.2	Lipopolysaccharide	77
3.2.3	Inflammation	78
3.2.4	Oxidativer Stress	80
3.2.5	Calcium- und Vitamin D Stoffwechsel	81
3.2.6	UPR und FGF21	82
3.2.7	UPR, FGF21 und Nrf2-Weg	83
3.3	Entstehung von Fettleber und Ketose	85
3.3.1	Entstehung der Fettleber	85
3.3.1.1	Lipidstoffwechsel während der Frühlaktation	85
3.3.1.2	Ursachen für die Entstehung der Fettleber	89
3.3.2	Ketogenese	99
3.3.2.1	Ketonkörperbildung während der Frühlaktation	99
3.3.2.2	Einflussfaktoren auf die Ketogenese	100
3.3.3	Zusammenhang zwischen Fettstoffwechsel und Ketogenese	106
3.4	Einfluss auf die Milchleistung	107
3.4.1	ER-Stress, FGF21, Nrf2-Aktivierung und Milchleistung	108
3.4.2	Energiebilanz, freie Fettsäuren und Milchleistung	108
3.4.3	LPS, Inflammation und Milchleistung	108
3.4.4	Oxidativer Stress und Milchleistung	109
3.4.5	Calcium-, Vitamin D- Stoffwechsel und Milchleistung	109

3.4.6	Fettstoffwechsel, Ketogenese und Milchleistung	110
4	Diskussion	111
4.1	Stoffwechsellanpassungen der Milchkuh während der peripartalen Phase	111
4.1.1	Energiebilanz und Fettmobilisation	111
4.1.2	Inflammation in der Frühlaktation	112
4.1.3	Oxidativer Stress	114
4.1.4	Calcium- und Vitamin D- Stoffwechsel	115
4.2	Auftreten und Ursachen von ER-Stress in der Frühlaktation	118
4.3	FGF21	124
4.4	Nrf2-Weg	126
4.5	Entstehung der Fettleber	128
4.6	Entstehung von Ketose in der Frühlaktation	136
4.7	Einfluss auf die Milchleistung	141
4.8	Einfluss der Parität	145
4.9	Gesundheitszustand der Herde	146
4.10	Schlussfolgerung und Ausblick	147
5	Literatur	148
6	Anhang	165

## Abkürzungsverzeichnis

<i>AAS</i>	Atomabsorptionsspektroskopie
<i>ACACA</i>	Acetyl-CoA-Carboxylase
<i>ACADM</i>	Acyl-CoA-Dehydrogenase
<i>ACAT</i>	Acetyl-CoA-Acetyltransferase
<i>ACOX</i>	Acyl-CoA-Oxidase
<i>ap.</i>	<i>antepartum</i>
<i>ApoB</i>	Apolipoprotein B
<i>APP</i>	Akute-Phase Protein
<i>APS</i>	Ammoniumperoxodisulfat
<i>ATF</i>	aktivierender Transkriptionsfaktor
<i>BAK</i>	BCL2-Antagonist/Killer
<i>BAX</i>	BCL2-assoziiertes X-Protein
<i>BHBA</i>	3-Hydroxybutansäure ( $\beta$ -Hydroxybutansäure)
<i>bp</i>	Basenpaare
<i>BSA</i>	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
<i>CASP</i>	Caspase
<i>CAT</i>	Catalase
<i>CCL</i>	Chemokin-Ligand 2
<i>CoA</i>	Coenzym A
<i>CP</i>	Ceruloplasmin
<i>CPT</i>	Carnitin-Palmitoyltransferase
<i>CRP</i>	C-reaktives Protein
<i>CYP2R1</i>	Cytochrom P450 2R1
<i>DDIT3</i>	DNA-Schadeninduziertes Transkript 3
<i>DEPC</i>	Diethyldicarbonat
<i>DNA</i>	Desoxyribonukleinsäure
<i>DNAJC3</i>	DnaJ (Hsp40) Homolog, Unterfamilie C3
<i>ECM</i>	Energie korrigierte Milchleistung
<i>EDEM</i>	ER-Degradations-Enhancer
<i>eIF2<math>\alpha</math></i>	Eukaryontischer Initiations Faktor
<i>ELISA</i>	Enzyme-linked immunosorbent assay
<i>ER</i>	Endoplasmatisches Retikulum
<i>ERAD</i>	Endoplasmatisches Retikulum assoziierte Degradation
<i>FASN</i>	Fettsäuresynthase
<i>FGF</i>	Fibroblasten Wachstumsfaktor
<i>GPAM</i>	Glycerol-3-phosphat-Acyltransferase, mitochondrial
<i>GPX</i>	Glutathionperoxidase
<i>HERPUD</i>	Homocystein-induzierte, ER-Stress-induzierte, Ubiquitin-ähnliche Domäne
<i>HMGCL</i>	3-Hydroxymethyl-3-Methylglutaryl-CoA-Lyase
<i>HMGCS2</i>	mitochondriale 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoASynthase
<i>HP</i>	Haptoglobin
<i>HPLC</i>	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
<i>HSPA5</i>	Hitzeschockprotein 70 kDa protein 5 (BiP)
<i>IL</i>	Interleukin

<i>IRE1</i>	Inositol-requiring Enzym 1
<i>KEAP</i>	Kelch-like ECH-associated protein
<i>LPS</i>	Lipopolysaccharide
<i>lsmeans</i>	Least square means
<i>mRNA</i>	Messenger Ribonukleinsäure
<i>n.s.</i>	nicht signifikant
<i>MT1A</i>	Metallothionein 1A
<i>MTTP</i>	mikrosomales Triglycerid-Tansferprotein
<i>NAFLD</i>	Nicht -alkoholisch induzierte Fettleber
<i>NEB</i>	negative Energiebilanz
<i>NEFA</i>	nicht-veresterte, freie Fettsäuren
<i>NF-κB</i>	Nuklearfactor kappa B
<i>NQO1</i>	NAD(P)H-Dehydrogenase, Quinon 1
<i>Nrf2</i>	Nuklearfaktor (erythroid-derived 2)-like 2
<i>OD</i>	Optische Dichte
<i>pAK</i>	Primärer Antikörper
<i>PDIA4</i>	Protein-Disulfid-Isomerase-Familie A4
<i>PERK</i>	PKR-like ER Kinase
<i>pp.</i>	<i>postpartum</i>
<i>PPAR</i>	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor
<i>PPRE</i>	Peroxisomen-Proliferator-Response-Element
<i>PTGS2</i>	Prostaglandin-Endoperoxid-Synthase 2
<i>PTH</i>	Parathormon
<i>qPCR</i>	quantitative PCR
<i>RBP</i>	Retinol-bindendes Protein
<i>RIN</i>	RNA-Integritätsnummer
<i>RNA</i>	Ribonukleinsäure
<i>ROS</i>	reaktive Sauerstoffspezies
<i>SAA</i>	Serumamyloid A
<i>SDS-PAGE</i>	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
<i>SE</i>	Standardfehler
<i>SLC27A1</i>	SLC-Transporter für langkettige Fettsäuren
<i>SOD</i>	Superoxiddismutase
<i>SREBP</i>	Sterol-regulatorisches-Element-bindender Transkriptionsfaktor
<i>TBARS</i>	Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen
<i>TCA</i>	Trichloressigsäure
<i>TEAC</i>	Trolox-äquivalente antioxidative Kapazität
<i>TG</i>	Triglyceride
<i>TMR</i>	Totale Mischraktion
<i>TNF</i>	Tumor-Nekrose-Faktor α
<i>TTR</i>	Transthyretin
<i>UGT1A1</i>	UDP-Glucuronosyltransferase 1-Familie
<i>UPR</i>	Unfolded protein response
<i>VLDL</i>	Very low density lipoprotein
<i>XBPIs</i>	X-Box bindendes Protein 1, gespleißte Transkript Variante

# 1 Einleitung

Hepatische Lipidose (Fettleber) und Ketose sind zwei bedeutende Stoffwechselerkrankungen bei hochleistenden Milchkühen, die vor allem in der Frühphase der Laktation auftreten (Ringseis et al. 2015). Beide Erkrankungen haben nicht nur einen großen Einfluss auf die Tiergesundheit und das Tierwohl, sondern stellen auch ein wirtschaftliches Problem dar. Die betroffenen Tiere verursachen Tierarztkosten und fallen durch eine verringerte Milchleistung, eine größere Zwischenkalbezeit und eine kürzere durchschnittliche Lebensdauer auf (Bobe et al. 2004). Die Pathogenese und insbesondere die biochemischen Ursachen dieser Krankheiten sind bisher noch nicht ausreichend geklärt. Zur Prävention dieser Erkrankungen ist daher weitere Forschung nötig.

## 1.1 Stoffwechsellanpassungen während der peripartalen Phase

Die Übergangszeit zwischen der späten Trächtigkeit und der Frühaktation, auch peripartale Phase genannt, schließt bei der Milchkuh den Zeitraum von drei Wochen vor bis drei Wochen nach der Kalbung ein (Grummer 1995). Auf Grund der notwendigen metabolischen und hormonellen Anpassung an die Laktation ist der Organismus während dieses Zeitraums besonders anfällig für Infektionskrankheiten und Stoffwechselstörungen (Drackley 1999). Der Energiebedarf der Milchkuh steigt nach der Abkalbung durch die einsetzende Milchproduktion drastisch an, während die Futteraufnahme, die bereits vor der Abkalbung reduziert ist (Grummer 1995), nicht ausreicht, um diesen erhöhten Bedarf zu decken (Bell 1995). Der Organismus gerät in einen Zustand der negativen Energiebilanz (NEB).

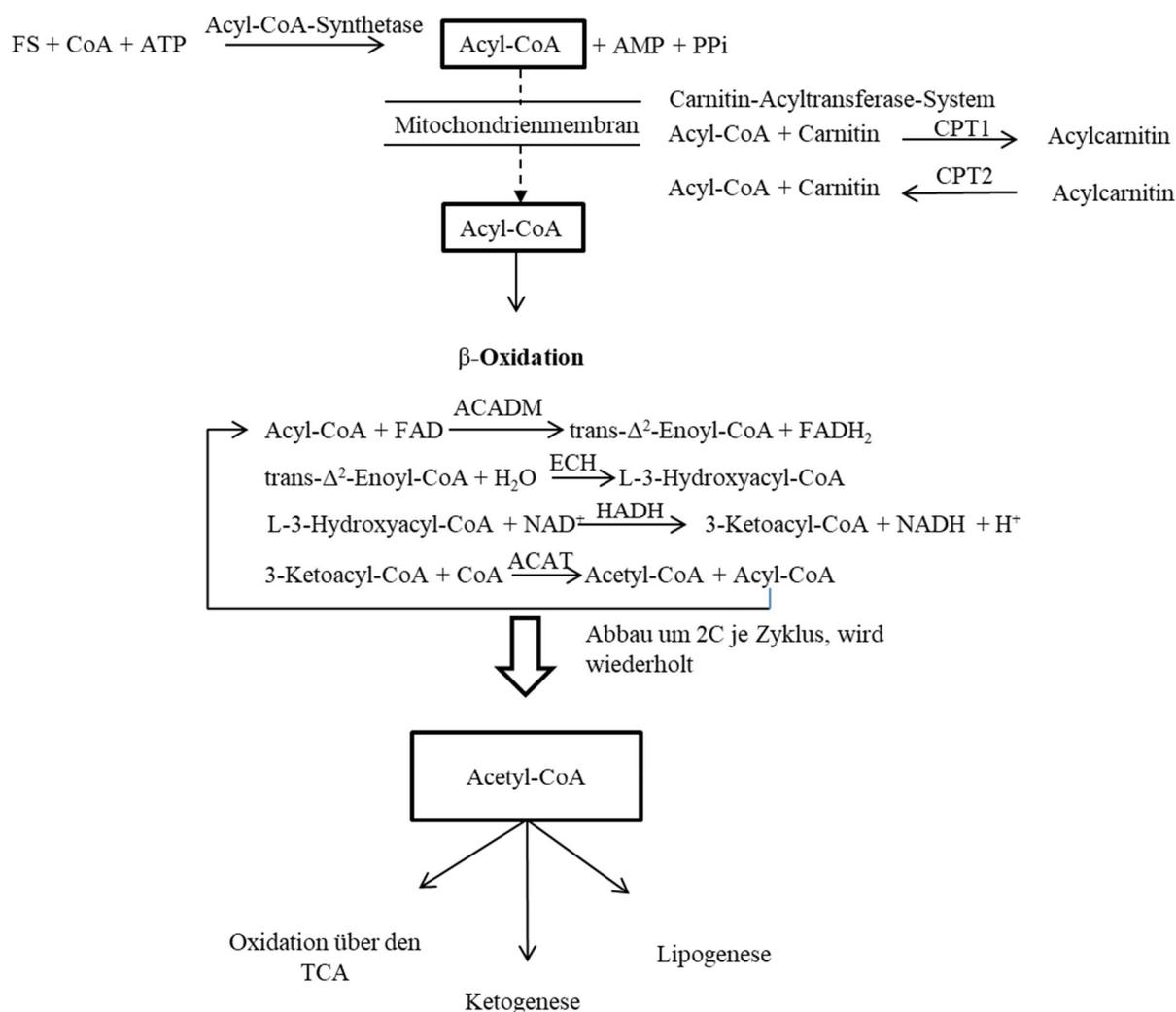
### 1.1.1 Lipidstoffwechsel

Um dem auftretenden Energiedefizit während der Frühaktation entgegenzuwirken, kommt es zu einer hormonellen Aktivierung von Lipasen, welche die hydrolytische Spaltung von Triglyceriden (TG) zu freien Fettsäuren (FS) und Glycerol im Fettgewebe katalysieren. Die Freisetzung von Fettsäuren hat einen starken Anstieg der Konzentration an freien FS im Plasma zur Folge (Drackley 1999). Die freigesetzten FS werden hauptsächlich zur Milchfettsynthese in der Milchdrüse verwendet. Etwa 25% werden jedoch aus dem Plasma in die Leber aufgenommen (Bell 1979; White 2015). Die aufgenommenen FS führen in der Leber zu einer Aktivierung des hepatischen Peroxisomen - Proliferator - aktivierten - Rezeptors  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) (Loor et al. 2005). Nach der Aktivierung des PPAR $\alpha$  durch eine Dimerisierung mit dem 9-*cis* Retinsäurerezeptor (RXR) bindet das PPAR $\alpha$ /RXR Heterodimer an das Peroxisomen-Proliferator-Respons-Element (PPRE) der Zielgene (Rakhshandehroo et al. 2010). PPAR $\alpha$

fungiert als Master-Regulator des hepatischen Lipidstoffwechsels und reguliert beispielsweise Gene der  $\beta$ -Oxidation sowie der Ketogenese (Contreras et al. 2013).

Die Fettsäuren werden in der Leber zunächst an Coenzym A (CoA) gebunden und über das Carnitin-Palmitoyltransferase (*CPT*)-System in die Mitochondrien transportiert (Grantham und Zammit 1988). In den Mitochondrien erfolgt ein Abbau der Fettsäuren zu Acetyl-CoA mittels  $\beta$ -Oxidation, wobei die mitochondrielle Acyl-CoA-Dehydrogenase (*ACADM*) die Oxidation von Acyl-CoA durch Flavin-Adenin-Dinucleotid (FAD) katalysiert (Reddy und Hashimoto 2001) (Abbildung 1.1). Zusätzlich erfolgt ein Teil der  $\beta$ -Oxidation, insbesondere die Oxidation von langkettigen FS ( $< C_{20}$ ) in den Peroxisomen (Reddy und Mannaerts 1994). Hier werden während einer von Acyl-CoA-Oxidase (*ACOX*) katalysierten Reaktion die Elektronen direkt auf Sauerstoff übertragen, sodass Wasserstoffperoxid entsteht (Reddy und Hashimoto 2001).

Die Kapazität des Zitronensäurezyklus zur vollständigen Oxidation von Acetyl-CoA ist abhängig von der Verfügbarkeit von Oxalacetat. In der Frühlaktation wird Oxalacetat verstärkt für die Gluconeogenese benötigt, da große Mengen an Glucose für die Umsetzung zu Laktose zur Verfügung stehen müssen (van Knegsel et al. 2005). Durch das entstandene Defizit an Oxalacetat ist eine vollständige Oxidation des Acetyl-CoA über den Zitronensäurezyklus nicht möglich. Das überschüssige Acetyl-CoA wird verstärkt über die Ketogenese verstoffwechselt (s. 1.1.1.1) oder als Ausgangsprodukt für eine *de novo* Lipogenese verwendet (van Knegsel et al. 2005; White 2015). Der Sterol-regulatorische-Element-bindende Transkriptionsfaktor 1 (*SREBF1*) ist für die Regulation der Fettsäuresynthese verantwortlich. Im inaktiven Zustand ist er über das *SREBP-cleavage-activating-protein* (*SCAP*) an die Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) gebunden. Nach proteolytischer Spaltung kommt es zur Freisetzung des *SREBF1*, der zunächst zum Golgi-Apparat wandert, wo er durch *site-1* und *site-2* Proteasen modifiziert wird und anschließend in den Nucleus transloziert (Horton et al. 2002). Durch die Bindung an Sterol-regulatorische-Elemente (SRE) in der Promotorregion der Zielgene wird die Transkription von Genen der Fettsäuresynthese aktiviert (Shimomura et al. 1997). Zielgen des *SREBF1* ist u. a. die Acetyl-CoA-Carboxylase (*ACACA*), die an der Reaktion von Acetyl-CoA zu Malonyl-CoA beteiligt ist. Die weiteren Schritte der Fettsäuresynthese werden von einem multifunktionellem Enzymkomplex, der Fettsäure-Synthase (*FASN*) katalysiert (Ameer et al. 2014). Die in die Leber eingeschleusten FS sowie die neu synthetisierten FS können anschließend zu TG verestert werden (McArt et al. 2013). Die Glycerol-3-phosphat-Acyltransferase (*GPAM*) katalysiert den ersten Schritt der TG-Synthese. Dabei wird Glycerin-3-Phosphat zu Lysophosphatidat acyliert (Roy et al. 2006).



**Abbildung 1.1 Fettsäureabbau in der Leber (eigene Darstellung)**

Fettsäuren (FS) werden über das Carnitin-Palmitoyltransferase (CPT)-System in die Mitochondrien transportiert. Dort erfolgt ein Abbau der FS zu Acetyl-CoA mittels  $\beta$ -Oxidation, wobei die mitochondrielle Acyl-CoA-Dehydrogenase (ACADM) den 1. Reaktionsschritt katalysiert. Das entstandene Acetyl-CoA wird anschließend entweder über den TCA oxidiert, zu Ketonkörpern abgebaut oder als Substrat für die Lipogenese eingesetzt.

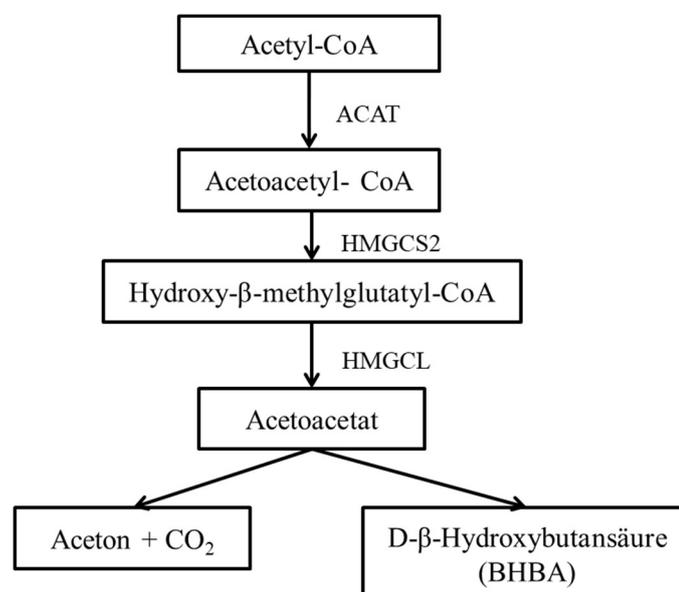
CoA = Coenzym A, AMP = Adenosinmonophosphat, PPi = Diphosphat, FAD = Flavin-Adenin-Dinukleotid, ECA = Enoyl-CoA Hydratase, HADH = Hydroxyacyl-Coenzyme A Dehydrogenase, NADH = Nicotinamidadenindinukleotid, ACAT = Acetyl-CoA-Acetyltransferase, TCA = Zitronensäurezyklus

Die neu gebildeten TG können anschließend zusammen mit Phospholipiden, Cholesterol und Apolipoproteinen (wie ApoB 100) als *very-low density lipoproteins* (VLDL) verpackt und aus der Leber ausgeschleust werden (Bernabucci et al. 2004). Dabei ist das mikrosomale Triglycerid Transfer Protein (MTTP) für den Zusammenbau und die Sekretion der Lipoproteine verantwortlich (Wetterau et al. 1991). Allerdings ist die VLDL-Bildung in der Früh lactation der Milchkuh nur beschränkt möglich, sodass Triglyceride in der Leber akkumulieren (Gruffat et al. 1997).

Eine hohe Akkumulation von Triglyceriden in der Leber kann eine hepatische Lipidose hervorrufen, die eine Verschlechterung des Gesundheitszustandes, verringerte Milchleistung und eine niedrigere Reproduktivität der betroffenen Tiere zur Folge hat (Wensing et al. 1997). Abhängig vom Triglyceridgehalt in der Leber wird zwischen milder (TG-Gehalt 1-5% der Leberfeuchtmasse), moderater (TG-Gehalt 5-10%) und starker Fettleber (TG-Gehalt >10%) unterschieden (Bobe et al. 2004). Während innerhalb der ersten vier Wochen nach der Abkalbung etwa 5-10% der Milchkühe eine starke Fettleber entwickeln, sind sogar 30-40% von einer moderaten Fettleber betroffen (Bobe et al. 2004).

#### 1.1.1.1 Ketogenese

Das bei der  $\beta$ -Oxidation entstehende Acetyl-CoA (s. 1.1.1) wird während der Frühlaktation verstärkt unvollständig zu Ketonkörpern wie z. B. Acetoacetat,  $\beta$ -Hydroxybutansäure (BHBA) und Aceton abgebaut (van Kneysel et al. 2005; White 2015). Dabei katalysiert das Enzym Hydroxymethyl-3-Methylglutaryl-CoA Synthase (*HMGCS2*) die Reaktion von Acetoacetyl-CoA mit Acetyl-CoA zu Hydroxy- $\beta$ -methylglutaryl-CoA, welches durch die 3-Hydroxymethyl-3-Methylglutaryl-CoA-Lyase (*HMGCL*) zu Acetoacetat abgebaut wird (Abbildung 1.2). Der weitere Abbau von Acetoacetat zu  $\beta$ -Hydroxybutansäure wird durch das Enzym  $\beta$ -Hydroxybutansäure-Dehydrogenase katalysiert (Newman und Verdin 2014). Bei *HMGCS2* handelt es sich um ein Zielgen des PPAR $\alpha$  (Hegardt 1999).



**Abbildung 1.2 Ablauf der Ketogenese (eigene Darstellung)**

Die Hydroxymethyl-3-Methylglutaryl-CoA Synthase (*HMGCS2*) katalysiert die Reaktion von Acetoacetyl CoA mit Acetyl CoA zu Hydroxy- $\beta$ -methylglutaryl CoA, welches durch die 3-Hydroxymethyl-3-Methylglutaryl-CoA-Lyase (*HMGCL*) zu Acetoacetat abgebaut wird. Der weitere Abbau von Acetoacetat zu  $\beta$ -Hydroxybutansäure wird durch das Enzym  $\beta$ -Hydroxybutansäure Dehydrogenase katalysiert. *ACAT*: Acetyl-CoA-Acetyltransferase

Die gebildeten Ketonkörper stellen eine Energiequelle für verschiedene Organe wie z. B. Herz, Gehirn, Leber und Milchdrüse dar (White 2015). Eine hohe Konzentration von Ketonkörpern im Blut führt jedoch zu dem Auftreten von Ketose, einer weiteren bedeutenden Stoffwechselerkrankung der Milchkuh. Per Definition wird zwischen klinischer und subklinischer Ketose unterschieden. Bei symptomfreien Tieren wird ab einer  $\beta$ -Hydroxybutyrat (BHBA) - Konzentration von 1,2 mmol/L eine subklinische Ketose diagnostiziert (Raboisson et al. 2014), während Tiere mit klinischen Symptomen wie z. B. verminderter Futteraufnahme, Gewichtsabnahme und verringerter Milchleistung, BHBA Konzentrationen von  $\geq 3,0$  mmol/L aufweisen (Oetzel 2004). Die Erkrankung betrifft gemäß einer amerikanischen Studie in ihrer subklinischen Form über 40% der Milchkühe (McArt et al. 2012). Bei einer Untersuchung mit 732 norwegischen Milchkühen entwickelten ca. 20% eine klinische Ketose (Gillund et al. 2001). Das Auftreten von Ketose ist oft mit dem Auftreten einer Fettleber assoziiert und steht im Zusammenhang mit der Entwicklung weiterer Krankheitsbilder wie Metritis, Mastitis, Plazentaretention und Lahmheit (Raboisson et al. 2014).

### 1.1.2 Inflammation

Während der Früh-laktation entwickeln Milchkühe einen meist subklinisch verlaufenden, entzündungsähnlichen Zustand in der Leber, der als „*inflammatory-like-condition*“ bezeichnet wird (Bionaz et al. 2007). Eine Entzündung (Inflammation) tritt meist in Folge von Gewebeschädigungen oder mikrobiellen Infektionen auf und wird über Pattern-Recognition-Rezeptoren (PRR), wie die Toll-like Rezeptoren (TLR) oder den Nukleotid-bindende-Oligomerisation-Domäne-ähnlichen-Rezeptor, vermittelt (Keestra-Gounder et al. 2016).

In der Leber kommt es während des Entzündungsprozesses zur Aktivierung des Nuklearfaktors kappa B (*light-chain-enhancer of activated B-cells*, NF $\kappa$ B), einem Dimer bestehend aus zwei Proteinen der *Relish*-Familie (v.a. p50/p65) (Sun und Andersson 2002). Im inaktiven Zustand ist NF $\kappa$ B durch die Bindung an Inhibitorproteine (I- $\kappa$ B) im Zytosol lokalisiert (Whiteside und Israel 1997). In Folge einer Aktivierung werden die Inhibitorproteine mittels I- $\kappa$ B Kinase zunächst phosphoryliert und anschließend ubiquitiert. Der durch die Proteolyse der I- $\kappa$ B freigesetzte NF $\kappa$ B transloziert in den Nucleus und aktiviert dort die Transkription einer Vielzahl von Genen (Whiteside und Israel 1997; Sun und Andersson 2002). Zu den Zielproteinen des NF $\kappa$ B zählen u. a. proinflammatorischen Gene, wie der Tumor-Nekrose Faktor  $\alpha$  (TNF) und Interleukin 1 b (Il1b) oder auch akute-Phase-Proteine codierende Gene (Pahl 1999).

Bei der akuten-Phase-Reaktion, die eine unspezifische Immunreaktion darstellt, wird eine Vielzahl von positiven akute-Phase-Proteinen wie Haptoglobin (HP), C-reaktives Protein (CRP) und Serum Amyloid A (SAA) produziert. Die Bildung von negativen akute-Phase-Proteinen, zu denen essenzielle Leberproteine wie z. B. Albumin und das Retinol-bindende Protein (RBP) gehören, wird hingegen vermindert (Carroll et al. 2009).

Als Ursachen für die Entstehung von Inflammation in der Frühlaktation werden mikrobielle Komponenten, insbesondere im Zusammenhang mit dem Auftreten einer subakuten Pansenazidose (Bilal et al. 2016), oxidativer Stress (s.1.1.3) sowie die Freisetzung von proinflammatorischen Cytokinen in Folge der gesteigerten Fettsäuremobilisation aus dem Fettgewebe beschrieben (Khan et al. 2015).

Bei der subakuten Pansenazidose, die hauptsächlich fütterungsbedingt entsteht, sinkt der pH-Wert im Pansen unter 5,6 (Steele et al. 2011). In Folge dessen kommt es zu einer Beeinträchtigung der Mikroorganismenpopulation im Pansen, die mit einer verstärkten Freisetzung von Lipopolysacchariden (LPS), welche die Stoffwechselprodukte gramnegativer Bakterien wie *E. coli* darstellen, einhergeht (Bilal et al. 2016). Die freigesetzten Lipopolysaccharide gelangen über den Blutkreislauf in die Leber und können dort den NF- $\kappa$ B aktivieren. (Kvidera et al. 2017a) postulierten, dass eine Störung der intestinalen Barrierefunktion *postpartum* eine erhöhte Aufnahme von LPS in den Blutkreislauf fördert und somit die Entstehung der Inflammation begünstigt.

Studien belegen, dass Milchkühe mit einer hohen Konzentration an akuten-Phase-Proteinen im Blut eine geringere Futteraufnahme und Milchleistung aufweisen (Yuan et al. 2013; Trevisi et al. 2009). Außerdem wird ein möglicher Zusammenhang zwischen Entzündung und der Entstehung von Fettleber, Ketose und weiteren Stoffwechselerkrankungen wie z. B. Milchfieber beschrieben (Abuajamieh et al. 2016; Yuan et al. 2013; Trevisi et al. 2012; Bradford et al. 2009).

### 1.1.3 Oxidativer Stress

Antioxidantien, zu denen u. a. Vitamin E,  $\beta$ -Carotin sowie Harnsäure und Glutathion zählen, tragen zum Schutz der Zelle vor oxidativen Substanzen wie z. B. radikalen Sauerstoffspezies (ROS) bei. Oxidativer Stress entsteht, wenn das Verhältnis von Oxidantien zu Antioxidantien aus dem Gleichgewicht gerät und kann im Organismus DNA, Proteine und Lipide schädigen (Martindale und Holbrook 2002). In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass oxidativer Stress in der peripartalen Phase bei Milchkühen auftritt (Calderon et al. 2007; Castillo et al. 2005; Sharma et al. 2011). Ursachen dafür können sowohl die Bildung von ROS während eines

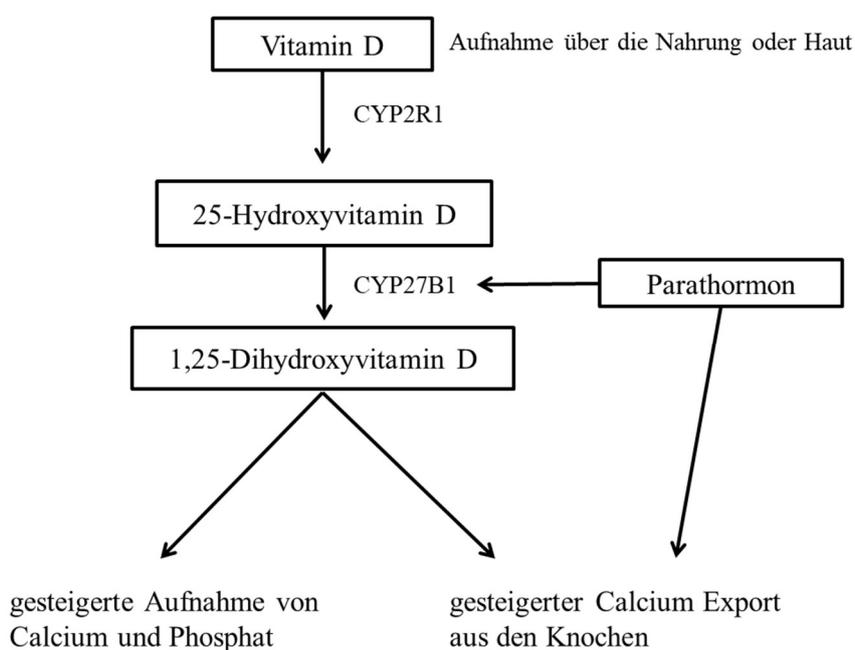
Entzündungsprozesses als auch die Produktion von Superoxid-Radikalen, die bei der gesteigerten Oxidation von nicht veresterten freien Fettsäuren (NEFA) und weiteren Nährstoffen entstehen (Shi et al. 2015; Ringseis et al. 2015), sein. Das Immunsystem der Kühe ist in der peripartalen Phase geschwächt. Daher ist der Organismus anfälliger für Infektionskrankheiten wie Mastitis und Endometritis (Morris et al. 2009). Im Rahmen dieser Infektionskrankheiten können als Abwehrreaktion des Organismus weitere ROS freigesetzt werden (Bradford et al. 2015). Oxidativer Stress kann selbst wiederum über die Aktivierung des Nuklearfaktor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) Inflammation und somit eine weitere Produktion von ROS fördern (Pillarsetti und Saxena 2004). Zum Schutz der Zelle kommt es in Folge des oxidativen Stresses zu einer Aktivierung des Nrf2, der die Transkription antioxidativer und zytoprotektiver Gene induziert (s. 1.2.1).

#### 1.1.4 Calcium und Vitamin D Stoffwechsel

Da Calcium zur Milchbildung benötigt wird, steigt der Bedarf dieses Mineralstoffes nach der Abkalbung drastisch an (DeGaris und Lean 2008). Subklinische und klinische Hypocalcämie (Milchfieber) sind weitere Stoffwechselstörungen bei Kühen in der Früh-laktation, die auftreten, wenn der Verlust an Calcium nicht ausgeglichen werden kann. Etwa 25% der Färsen und 50% der älteren Tiere entwickeln kurz nach der Abkalbung eine subklinische Hypocalcämie, die durch Calciumkonzentrationen von  $< 2,0$  mmol/L im Serum gekennzeichnet ist (Reinhardt et al. 2011). Bei ca. 5-7% der laktierenden Kühe tritt klinisches Milchfieber auf (DeGaris und Lean 2008). Calcium ist notwendig zur Aufrechterhaltung der Muskel- und Nervenfunktion. Bei einem Mangel an Calcium können diese Funktionen beeinträchtigt werden. Betroffene Tiere sind nicht mehr in der Lage aufzustehen und liegen fest. Weitere Symptome und Folgeerkrankungen der Hypocalcämie sind eine reduzierte Futteraufnahme, Mastitis, eingeschränkte Mobilität von Pansen und Labmagen sowie das Risiko einer Labmagenverlagerung (Goff 2008). Durch gutes Herdenmanagement und eine optimale Mineralstoffzufuhr während der peripartalen Phase kann das Auftreten von Milchfieber deutlich gesenkt werden (Reinhardt et al. 2011).

Um bei erhöhtem Calciumbedarf eine ausreichende Menge dieses Mineralstoffes bereitzustellen und den Verlust im Blut auszugleichen, wird im Organismus sowohl die intestinale Absorption des Minerals erhöht als auch die Resorption von Calcium aus den Knochen gesteigert (Horst et al. 2003). In der Haut gebildetes oder durch die Nahrung aufgenommenes Vitamin D<sub>3</sub> wird in der Leber zunächst mittels Vitamin-D<sub>3</sub>-25-Hydroxylase (Cytochrom P450 2R1, CYP2R1) zu 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub> (25-Hydroxycholecalciferol, HVD3) umgewandelt (Abbildung 1.3). In Folge von niedrigen Calciumkonzentrationen kommt

es zu einer Freisetzung von Parathormon (PTH), welches die Hydroxylierung von 25-Hydroxycholecalciferol zu 1, 25-Dihydroxycholecalciferol ( $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ , DHVD3) durch die  $1\alpha$ -Hydroxylase (CYP27B1) in der Niere reguliert und zudem die Mobilisation von Calcium aus den Knochen stimuliert. DHVD3 begünstigt wiederum die Aufnahme von Calcium im Dünndarm (DeGaris und Lean 2008) und stimuliert die Produktion des Fibroblasten-Wachstumsfaktor 23 (FGF23) in Osteozyten und Osteoblasten (Rodriguez-Ortiz et al. 2012). FGF23 spielt eine Rolle bei der Regulation des Vitamin D und Phosphat-Metabolismus. In der Niere führt FGF23 zu einer Reduktion des Natrium-Phosphat-Cotransporters (NaPi-2a), was eine erhöhte Ausscheidung sowie reduzierte Plasma-Level an Phosphat zur Folge hat (Shimada et al. 2004). Des Weiteren führt FGF23 zu einer Hemmung der renalen CYP27B1, sodass erhöhte FGF23-Konzentrationen mit einem niedrigen DHVD3-Spiegel im Plasma assoziiert sind (Saito et al. 2003; Shimada et al. 2004).



**Abbildung 1.3 Schema des Vitamin D Metabolismus (eigene Darstellung)**

Vitamin  $\text{D}_3$  wird in der Leber mittels Vitamin- $\text{D}_3$ -25-Hydroxylase (CYP2R1) zu 25-Hydroxyvitamin  $\text{D}_3$  umgewandelt. Parathormon (PTH) reguliert die Hydroxylierung von 25-Hydroxyvitamin  $\text{D}_3$  zu 1, 25-Dihydroxyvitamin  $\text{D}_3$  (DHVD3) durch die  $1\alpha$ -Hydroxylase (CYP27B1) in der Niere. DHVD3 wiederum begünstigt die Calcium- und Phosphataufnahme im Dünndarm und stimuliert gemeinsam mit PTH die Mobilisation von Calcium aus den Knochen.

## 1.2 Stress des endoplasmatischen Retikulums und Unfolded protein response (UPR)

In vorausgegangenen Untersuchungen wurde das Auftreten von Stress des endoplasmatischen Retikulums (ER) in der Frühlaktation bei Milchkühen beobachtet (Gessner et al. 2014).

Das endoplasmatische Retikulum (ER) ist ein membranartiges Zellorganell, das für die Synthese und Faltung von Proteinen sowie die Lipid- und Sterolsynthese zuständig ist und als Calcium-Speicher fungiert (Schröder und Kaufman 2005). Es dient weiterhin als Transportorgan der Zelle. Wenn die Proteinkonzentration im ER dessen Faltungskapazität übersteigt, kommt es zu einer Akkumulation von nicht-gefalteten oder fehlgefalteten Proteinen im ER-Lumen; dies wird als ER-Stress bezeichnet (Ron und Walter 2007).

Als Konsequenz des ER-Stresses wird die sogenannte *unfolded protein response* (UPR) in Gang gesetzt. Die UPR ruft verschiedene Mechanismen hervor, die die Faltung von Proteinen, die Hemmung der Proteinsynthese sowie den Abbau von fehlgefalteten Proteinen über die ER-assoziierte Protein-Degradations-Maschinerie (ERAD) bewirken (Schröder und Kaufman 2005). Dies hat zum Ziel, das Gleichgewicht im ER wiederherzustellen. Falls eine Herstellung der Homöostase nicht gelingt, setzt zum Schutz des Organismus ein weiterer Mechanismus ein, der zur Apoptose der betroffenen Zellen führt (Breckenridge et al. 2003). Die UPR wird durch drei ER-Stress-Transduktoren vermittelt, die als integrale ER-Proteine im inaktiven Zustand an das Chaperon „Hitzeschockprotein 70 kDa protein“ (HSPA5 auch BiP) gebunden sind (Cnop et al. 2012). Steigt die Konzentration an ungefalteten und fehlgefalteten Proteinen im ER, kommt es zu einer Ablösung von HSPA5, welches DNA im ER-Lumen bei der Neufaltung der Proteine assistiert. Dies hat eine Aktivierung der Stress-Transduktoren sowie die Induktion einer Reihe von Downstream-Genen zur Folge (Tabelle 1.1, Abbildung 1.4) (Bertolotti et al. 2000). Bei den drei ER-Stress-Transduktoren handelt es sich um die *PKR-like-ER-Kinase* (PERK), das *Inositol-requiring Enzym 1* (IRE1) und den *activating transcription factor 6* (ATF6). Nach dem Ablösen von HSPA5 kommt es zu einer Oligomerisierung und Autophosphorylierung der PERK, wodurch die Kinasefunktion aktiviert wird (Ron und Walter 2007). In Folge dessen phosphoryliert PERK den eukaryontischen Initiationsfaktor 2 $\alpha$  (eIF2 $\alpha$ ), was eine Verminderung der Proteintranslation zur Folge hat (Harding et al. 1999). Des Weiteren fördert der phosphorylierte eIF2 $\alpha$  die Translation des aktivierenden Transkriptionsfaktors 4 (ATF4), der in den Nucleus transloziert und dort wiederum die Transkription weiterer UPR Downstream-Gene wie z. B. *DDIT3* induziert (Ron und Walter 2007; Cnop et al. 2012).

ATF6 transloziert nach der Ablösung von HSPA5 zum Golgi-Apparat, wo er durch *site-1* und *site-2* Proteasen modifiziert wird (Haze et al. 1999). Das so entstandene ATF6-Fragment wird

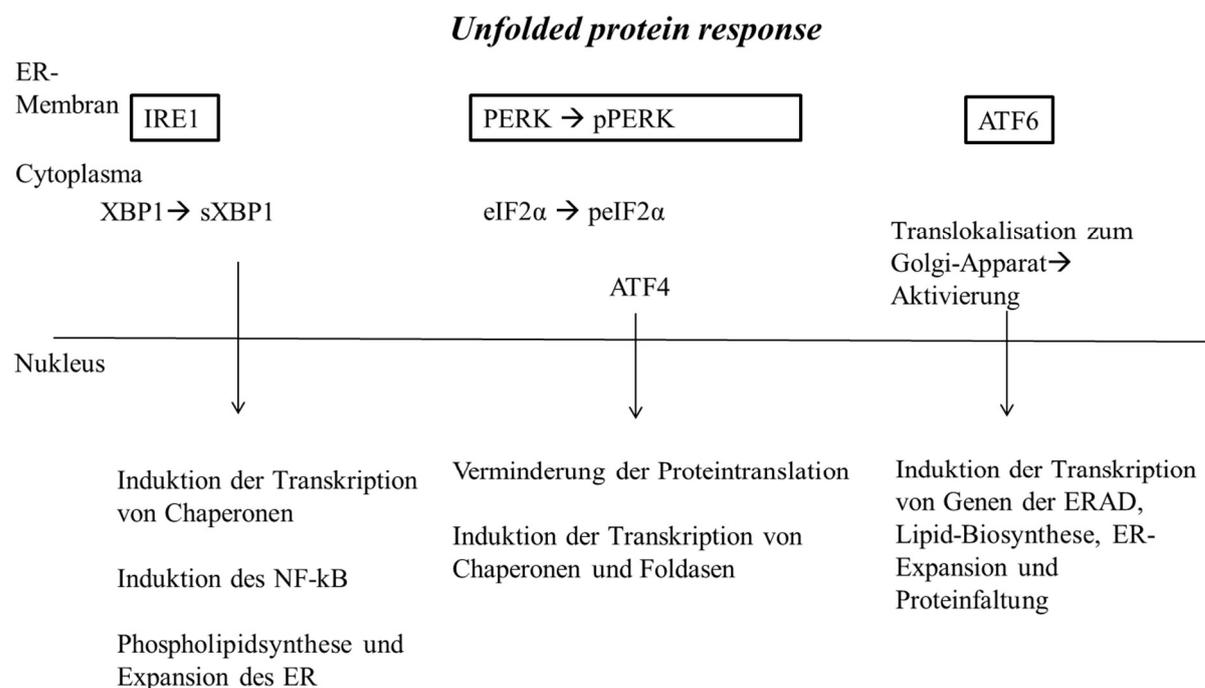
zum Nucleus transportiert und induziert dort die Expression von Genen, die eine Rolle bei der Proteinfaltung, ER Expansion, Lipidbiosynthese oder der ER-assoziierten Degeneration spielen (Bommiasamy H. et al. 2009).

Als Reaktion auf ER-Stress kommt es zu einer Oligomerisierung und anschließenden Autophosphorylierung des IRE1 (Ron und Walter 2007). Dieser Vorgang kann sowohl durch das Ablösen von HSPA5 als auch über die Bindung von ungefalteten oder fehlgefalteten Proteinen induziert werden (Gardner und Walter 2011). Durch die Aktivierung der c-terminalen Endoribonuklease-Domäne des IRE1 kommt es zum alternativen Spleißen der *X-Box-binding-protein 1* Messenger-RNA (*XBPI* mRNA). Dabei wird ein Intron von 26 Basenpaaren entfernt (Yoshida et al. 2001). Das stabilere Produkt transloziert in den Nucleus, bindet an ER-Stress Response-Elemente (ERSE) oder an Unfolded-Protein-Response-Elemente (UPRE) der Zielgene und fungiert somit als deren Aktivator (Yoshida et al. 2001; Calton et al. 2002; Yamamoto et al. 2004). Des Weiteren führt das gespleißte XBP1 (XBP1s) über die Induktion der Synthese von Phosphatidylcholin, welches das primäre Phospholipid in der ER Membran darstellt, zu einer Expansion des ER (Sriburi et al. 2004). Außerdem wird über den IRE1-Weg der Nuklearfaktor kappa B (*light-chain-enhancer of activated B-cells*, NFκB) aktiviert (Li et al. 2015). In Folge der Aktivierung des NFκB kommt es zu einer Induktion von Inflammation (s.1.1.2).

**Tabelle 1.1 Funktionen von Downstream-Genen der UPR**

<b>Chaperone</b> (Petrova et al. 2008; Schwaller et al. 2003)	<b>Bestandteil der ERAD</b> (Shenkman et al. 2013; Okuda-Shimizu und Hendershot 2007)	<b>Induktion der Apoptose</b> (Breckenridge et al. 2003; Oyadomari und Mori 2004)
PDIA4	EDEM	BAK1, BAX
DNAJC3	HERPUD	CASP3, CASP8, CASP9 DDIT3

Abkürzungen: ERAD: ER-assoziierte Protein Degradations-Maschinerie, *BAK1*: BCL2-Antagonist/Killer 1; *BAX*: BCL2-assoziiertes X-Protein; *CASP*: Caspase; *DNAJC3*: DnaJ (Hsp40) Homolog; Unterfamilie C3; *EDEM1*: ER-Abbau-Enhancer: Mannosidase alpha-ähnlich: 1; *HERPUD1*: Homocystein-induzierte, ER-Stress-induzierte-Ubiquitin-ähnliche Domäne 1; *PDIA4*: Protein-Disulfid-Isomerase-Familie A4



**Abbildung 1.4 schematische Darstellung der *Unfolded protein response* (UPR) (eigene Darstellung)**

In Folge des ER-Stresses kommt es durch das Abspalten des Chaperon BiP (*HSPA5*) zur Aktivierung der drei ER-Stress Transduktoren: *PKR-like ER Kinase* (PERK), *Inositol-requiring Enzyme 1* (IRE1) und aktivierender Transkriptionsfaktor 6 (ATF6). In Folge dessen werden verschiedene Downstream-Mechanismen mit dem Ziel, das Gleichgewicht in der Zelle wiederherzustellen, aktiviert.

ER: Endoplasmatisches Retikulum, XBP1: *X-box binding protein 1*, NFκB: *Nuklearfaktor kappa B*, eIF2α: eukaryontischer Initiationsfaktor 2α, ERAD: ER-assoziierte Protein Degradations-Maschinerie

### 1.2.1 Nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2)

Bei dem *Nuclear factor E2-related factor 2* (Nrf2) handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, der die Transkription von antioxidativen und cytoprotektiven Genen reguliert. Beispiele für Nrf2-Zielgene sind in Tabelle 1.2 aufgeführt. Im inaktiven Zustand liegt Nrf2 im Zytosol gebunden an das Inhibitorprotein *Kelch-like ECH-associated-protein* (Keap1) vor. Die Bindung an Keap1 verhindert die Translokation von Nrf2 in den Nucleus indem eine schnelle proteasomale Degradation begünstigt wird (Kobayashi et al. 2004). Unter dem Einfluss verschiedener Stimuli, wie z. B. ROS, wird die Degradation dieses Faktors gestoppt, woraufhin der stabilisierte Nrf2 in den Zellkern transloziert (Taguchi et al. 2011). Nach der Heterodimerisierung mit Maf-Proteinen (Itoh et al. 1997) oder ATF4 (He et al. 2001) bindet Nrf2 an die antioxidatives-Element-bindende-Region (ARE) in der Promotorregion der Zielgene und induziert so deren Transkription.

Nrf2 kann in Folge des oxidativen Stresses (Nguyen et al. 2004), aber auch im Rahmen der UPR aktiviert werden. So beschreiben (Cullinan et al. 2003) eine Aktivierung des Nrf2 über den PERK-Weg, die durch eine Phosphorylierung des Nrf2/Keap1 Komplexes induziert wird. Des Weiteren kann Nrf2 über den IRE1-Weg aktiviert werden (Digaleh et al. 2013). Die

Aktivierung des Nrf2 in Folge der UPR trägt maßgeblich zum Überleben der Zelle beim Auftreten von ER-Stress bei (Cullinan et al. 2003).

**Tabelle 1.2 Nrf2 Ziel-Enzyme und ihre Funktion**

<b>Name<sup>1</sup></b>	<b>Funktion</b>
<b>SOD1</b>	Abbau freier Superoxidradikale zu molekularem Sauerstoff und Wasserstoffperoxid (Bunton-Stasyshyn et al. 2015)
<b>NQO1</b>	Reduktion von Quinonen zu Hydroquinonen (Chen et al. 2000)
<b>GPX1</b>	Reduktion von organischen Hydroperoxiden sowie Wasserstoffperoxid durch Oxidation von Glutathion (Arthur 2000)
<b>CAT</b>	Abbau von Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff (Jones 1982)
<b>UGT1A1</b>	Glucuronidierung kleiner lipophiler Moleküle (z. B. Steroide, Bilirubin, Hormone) zu hydrophilen Metaboliten (Glucuroniden) (Strassburg et al. 2008)
<b>MT1A</b>	Radikalfänger, Detoxifikation von Schwermetallen (Andrews 2000)

<sup>1</sup>CAT = Catalase, GPX1 = Glutathionperoxidase 1, MT1A = Metallothionein-1A, NQO1 = NAD(P)H Dehydrogenase, Quinon 1, SOD1 = Superoxiddismutase 1, UGT1A1 = UDP-Glucuronosyltransferase 1Famie, Polypeptide A1

### 1.2.2 Fibroblast growth factor 21 (FGF21)

Bei FGF21 handelt es sich um ein Protein, das vor allem in der Leber exprimiert wird (Nishimura et al. 2000) und in den letzten Jahren immer mehr ins Interesse der Forschung gerückt ist. Das Protein hat die Funktion eines Stoffwechselregulators, der eine Rolle bei der Kontrolle der Energie-Homöostase im Organismus spielt. Im Fastenzustand ist die Expression von FGF21 gesteigert (Gälman et al. 2008; Badman et al. 2007), aber auch ein Nährstoffüberschuss kann die FGF21 Konzentration in der Leber erhöhen (Sanchez et al. 2009; Uebanso et al. 2011). Bei Nagern wurde gezeigt, dass FGF21 von Faktoren wie Aminosäuredefiziten und einer ketogenen oder Methionin/Cholin-defizitären Diät induziert wird (Fisher und Maratos-Flier 2016).

*FGF21* stellt ein Zielgen des Peroxisome Proliferator-aktivierten-Rezeptors (PPAR $\alpha$ ) dar. Dieser Transkriptionsfaktor wird u. a. durch Fettsäuren aktiviert und reguliert Enzyme der Ketogenese und Fettsäureoxidation (Badman et al. 2007). Die Expression von FGF21 wird aber auch in Folge von Stress ausgelöst. So kann u. a. über den IRE1- oder den PERK-Weg der UPR eine Steigerung der Expression von FGF21 hervorgerufen werden (Jiang et al. 2014; Schaap et al. 2013). Eine erhöhte Konzentration an FGF21 in der Leber führt zu einer gesteigerten Fettsäureoxidation und Ketogenese, erhöhten Glucosetoleranz, höherem Energieverbrauch, aber auch zu einer geringeren Fruchtbarkeit (Fisher und Maratos-Flier 2016). Bei Milchkühen wurde eine drastische Hochregulation der hepatischen FGF21-Expression nach der Abkalbung beobachtet (Schlegel et al. 2012a; Schoenberg et al. 2011; Carriquiry et al. 2009).

### 1.3 Fragestellung und Ziel dieser Arbeit

Bei hochleistenden Milchkühen stellen Fettleber und Ketose bedeutende Stoffwechselerkrankungen dar, die sowohl das Tierwohl beeinträchtigen und als auch ein ökonomisches Problem darstellen. Diese Arbeit soll nähere Erkenntnisse über die biochemischen Ursachen dieser Erkrankungen liefern, damit zukünftig eine bessere Prävention und Verminderung dieser Stoffwechselerkrankungen möglich ist.

Bislang wurde die Entwicklung einer Fettleber oder Ketose bei frühlaktierenden Milchkühen hauptsächlich auf das Auftreten einer negativen Energiebilanz nach der Abkalbung zurückgeführt (s. 1.1.1). Während die NEB ein Phänomen ist, das nahezu alle hochleistenden Milchkühe in der Frühlaktation betrifft, entwickeln jedoch nur bestimmte Tiere eine Stoffwechselerkrankung. (Gross et al. 2011) zeigten in einer Studie mit 50 Milchkühen, dass eine durch Futterrestriktion induzierte NEB in der späteren Laktation (um Tag 100 pp.) im Gegensatz zur NEB in der Frühlaktation zu einer deutlich geringeren Erhöhung der Konzentrationen an freien Fettsäuren im Plasma führt, während weder die Konzentration an BHBA im Plasma noch die Triglycerid-Einlagerung in der Leber bei den futterrestriktierten Tieren beeinflusst war. Daher liegt die Vermutung nahe, dass bei der Entwicklung von Fettleber und Ketose während der Frühlaktation weitere Faktoren eine Rolle spielen, die die Kapazität der Leber, freie Fettsäuren aufzunehmen, Triglyceride abzubauen oder diese als VLDL auszuschleusen, beeinträchtigen. Ein solcher Faktor könnte das Auftreten von ER-Stress bei frühlaktierenden Kühen sein.

In Humanstudien wurde bereits gezeigt, dass die Entwicklung einer nicht-alkoholischen Fettleber (NAFL) mit dem Auftreten von ER-Stress assoziiert ist (Zhang et al. 2014; Lebeaupin et al. 2018). Des Weiteren wurde im Nagermodell beobachtet, dass ER-Stress in der Leber zu einer Steigerung der Lipogenese führt und die  $\beta$ -Oxidation sowie die VLDL-Ausschleusung vermindern kann (Lee et al. 2012; Ota et al. 2008). Da diese Stoffwechselwege bei der Entstehung von Fettleber und Ketose in der Frühlaktation eine Rolle spielen (s.1.1.1), liegt die Vermutung nahe, dass es eine Verbindung zwischen dem Auftreten von ER-Stress und der Entstehung von Fettleber und Ketose bei frühlaktierenden Milchkühen gibt (Ringseis et al. 2015). Darüber hinaus ist die Konzentration an Triglyceriden in der Leber beim Menschen mit FGF21 korreliert (Li et al. 2010), wobei FGF21 über ER-Stress induziert werden kann (s.1.2.2). Neben ER-Stress ist auch ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Inflammation und einer Akkumulation von Triglyceriden in der Leber beschrieben (Bradford et al. 2009). Da Inflammation ER-Stress auslösen kann (Chae et al. 2012; Kanki et al. 2009), könnte die inflammationsbedingte Anreicherung von TG in der Leber der frühlaktierenden Milchkühe

über ER-Stress vermittelt werden. Aber auch ein direkter Einfluss der Inflammation wäre möglich.

Über die Ursachen des Auftretens von ER-Stress bei Wiederkäuern ist bislang noch wenig bekannt. In der Literatur wurden anhand von Zellstudien oder auch im Nagermodell freie Fettsäuren (Fu et al. 2012; Wei et al. 2006; Wang et al. 2006), Inflammation (Chae et al. 2012; Kanki et al. 2009) oder reaktive Sauerstoffspezies (Cao und Kaufman 2014) als mögliche Auslöser des ER-Stresses identifiziert. Da dies Faktoren sind, denen frühlaktierende Milchkühe ausgesetzt sind, könnten sie auch bei diesen Tieren zu der Entstehung von ER-Stress in der Leber beitragen.

Diese Arbeit soll nähere Erkenntnisse über die mögliche Ursachen von ER-Stress bei Milchkühen in der Frühlaktation liefern. Dazu wird der mögliche Einfluss einer erhöhten Konzentration an freien Fettsäuren oder Lipopolysacchariden im Plasma, des Vorliegens eines hepatischen Entzündungsprozesses, des Auftretens von oxidativem Stress und des Calcium- und Vitamin D- Stoffwechsels auf das Entstehen von ER-Stress bei frühlaktierenden Milchkühen betrachtet. Des Weiteren wird ein möglicher Zusammenhang des Auftretens von ER-Stress mit der Entstehung von Fettleber und Ketose untersucht.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien

Tabelle 2.1 Liste der verwendeten Chemikalien

Chemikalie	Reinheit	Hersteller
Acrylymid-Bisacrylamid-Stammlösung (Rotiphorese®Gel 40)	40% in Wasser (37, 5:1)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Agarose	-	Peqlab, Erlangen
Albumin Fraktion V (BSA)	≥ 98%	Carl Roth
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	≥ 98%	Carl Roth
2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) - Diammoniumsalz (ABTS)	> 98%	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Benzol-1,2,3-triol	≥ 99%	Carl Roth
Bromphenolblau Na-Salz	reinst.	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Calcium-Standard (Single Element AAS-Standard-Solution, Roti Star)	1000 mg/L	Carl Roth
β-Carotin	≥ 97%	Sigma-Aldrich
Deoxycholat	≥ 98%	Carl Roth
Diethyldicarbonat (DEPC)	≥ 97%, für Biochemie und Molekularbiologie	Carl Roth
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	≥ 99,5 %, p.a.	Carl Roth
2,4-Dinitrophenylhydrazin	min. 30% Wasser	Acros organics, New Jersey (USA)
DNA Polymerisations-Mix (dNTPs)	10 mM	GeneCraft, Lüdinghausen
2,6-Di- <i>tert</i> -butyl-4-methylphenol (BHT)	≥ 99%	Sigma-Aldrich
ECL Select Western Blotting Detection Reagent+RPN2235	-	GE Healthcare UK Limited, Little Chalfont Buckinghamshire (UK)

<b>Chemikalie</b>	<b>Reinheit</b>	<b>Hersteller</b>
EDTA	≥ 99,5%	Sigma Aldrich
Essigsäure	100% p.a.	Carl Roth
Ethanol	≥ 99,8%, p.a.	Carl Roth
Ethylacetat	<i>HPLC grade</i>	Th. Geyer, Renningen
GelPilot Loading Dye 5x	-	Qiagen, Hilden
GelRed™ Nucleinsäure Gel Farbstoff	-	Biotium, Fremont (USA)
Gen Ruler™ DNA Ladder Plus	100 bp	Thermo Scientific, Rockford (USA)
Glycerol	≥ 99,5%, p. a.	Carl Roth
Glycin	<i>analytical grade</i>	Carl Roth
Guanidin-HCl	≥ 99,5% für die Biochemie	Carl Roth
Hexan	<i>HPLC grade</i>	Carl Roth
6-Hydroxy-2,5,7,8- tetramethylchroman-2-carbonsäure (Trolox)	97%	Sigma-Aldrich
Isopropanol	<i>HPLC grade</i>	VWR, Darmstadt
Kaliumchlorid	reinst, Ph. Eur.	Serva Electrophoresis
Kaliumdihydrogenphosphat	≥ 99% p. a.	Carl Roth
Kaliumperoxodisulfat	≥ 99%	Sigma-Aldrich
KAPA™ Sybr Fast	-	Peqlab
Lanthan-III-oxid	≥99,99%, p.a.	Carl Roth
Methanol	<i>gradient grade</i> , Ph. Eur. for HPLC	VWR
Milchpulver	Blotting grade	Carl Roth
Natriumchlorid	≥ 99,5%	Carl Roth
Natriumfluorid	≥ 98,5, Ph. Eur.	Merck
Natriumhydrogencarbonat	≥ 99%	Carl Roth

Chemikalie	Reinheit	Hersteller
Natriumhydroxid (Plätzchen)	≥ 99%, p. a.	Carl Roth
Natriumlaurylsulfat (SDS)	≥ 99%	Carl Roth
Natrium- <i>ortho</i> -vanadat	99,98%	Sigma Aldrich
Natriumtetraborat-Decahydrat	-	Merck
Oligo-dT18.2	-	Eurofins MWG Operon, Ebersberg
<i>ortho</i> -Phosphorsäure 85%	-	Carl Roth
PageRuler <i>Prestained Protein Ladder</i>	10-250 kDa	Thermo Scientific
Ponceau S	für die Histologie	Carl Roth
Probenauftragspuffer Rotiload	-	Carl Roth
Protease-Inhibitor-Cocktail	-	Active Motif, Carlsbad, USA
5x Reaktionspuffer für die reverse Transkription	-	Thermo Scientific
Retinol synthetisch	≥ 95% <i>HPLC grade</i>	Sigma Aldrich
Reverse Transkriptase	200 U/μL	Thermo Scientific
Salzsäure 37%	37%	Merck, Darmstadt
Spectra <i>Multicolour High Range Protein Ladder</i>	43-315 kDa	Thermo Scientific
1,1,3,3,-Tetraethoxypropan	≥ 96%	Sigma Aldrich
Tetramethylethyldiamin TEMED	~ 99%	Sigma Aldrich
2-Thiobarbitursäure	≥ 98%	Sigma Aldrich
Trichloressigsäure	Normapure	VWR
Trichlormethan (Chloroform)	≥ 99,8%	Carl Roth
Tris	<i>research grade</i>	Serva Electrophoresis
Tris-HCl	≥ 99%	Carl Roth
Triton X 100	für die Molekularbiologie	Sigma Aldrich

Chemikalie	Reinheit	Hersteller
Trizol <sup>®</sup> Reagent	-	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
$\alpha$ -Tocopherol synthetisch	$\geq 96\%$ für HPLC	Sigma Aldrich
$\gamma$ -Tocopherol	$\geq 96\%$ für HPLC	Sigma Aldrich
Tween 20	pure	Serva Electrophoresis
Wasser	gefiltert 0,2 $\mu\text{m}$	VWR

## 2.2 Geräte und Hilfsmittel

Tabelle 2.2 Liste der verwendeten Geräte und sonstigen Hilfsmittel

Gerät	Modell	Hersteller
Bioanalyzer	Bioanalyzer 2100	Agilent Technologies, Santa Clara (United States)
Blotting-Papier	Rotilabo <sup>®</sup> , Dicke 0,35 mm	Carl Roth, Karlsruhe
CELLSTAR <sup>®</sup> Mikrotiterplatten	96-well-Platte	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Dokumentationssystem Western Blot	G:Box Chemi Imaging System	Syngene, Cambridge, UK
Elektrophorese-Kammer (Agarosegele)	M 40-1515	Peqlab, Erlangen
Elektrophorese-Kammer (SDS Page)	45-1614	Bio-Rad, Hercules (USA)
Feinwaage	Quintix X224-1CEU	Satorius, Göttingen
Fiber Pads	-	Bio-Rad
Geldokumentation (Agarosegele)	Gene Flash, Syngene Bio Imaging	VWR, Darmstadt
Geldokumentationssoftware Western Blot	Gene Flash	Syngene, Cambridge, UK
Grobwaage	PM 4800 Delta Range	Mettler Toledo, Gießen
Grobwaage	Scout Pro	Ohaus, Greifensee (Schweiz)
Homogenisator	Tissue Lyser II	Qiagen, Hilden

Gerät	Modell	Hersteller
Inkubationsschrank	Heraeus™	Thermo Fisher Scientific, Langensfeld
Inkubationsschüttler	IKA® KS 4000i control	IKA®-Werke, Staufen
Magnetrührer	IKA RCT® Classic	IKA®-Werke
Mehrkanalpipette	Eppendorf Research 20-200 µL 10-100 µL	Eppendorf
Metallkugel	Stainless Steel Beads 5 mm	Qiagen
Mikroplattenleser	Infinite® M200	Tecan, Crailsheim
Mikrozentrifuge	Galaxy MiniStar	VWR, Darmstadt
Nitrocellulosemembran	BioTrace™ NT	Pall, Dreieich
PCR Cycler	Rotor Gene Q	Qiagen
pH Meter	inoLab pH Level 1	wissenschaftlich-technische Werkstätten (WTW), Weilheim
pH Elektrode	InLab Routine	Mettler Toledo
Pipetten	Eppendorf Research 0,1-2,5 µL 0,5-10 µL 10-100 µL 20-200 µL 100-1000 µL	Eppendorf, Hamburg
Probenkonzentrator	Type 5000 6201	Liebisch Labortechnik, Bielefeld
Reinstwasser-Anlage	Nanopure II Barnstead	Thermo Fisher Scientific
Schüttler	Heidolph Dupmax 1030	Heidolph InstPansents, Schwabach
Spannungsquelle (SDS Page)	EV243	Peqlab
Spannungsquelle (Agarosegelelektrophorese)	Power Pac 200	Bio-Rad
Stickstoffverdampfer	-	Liebisch, Bielefeld
Thermocycler	TProfessional Basic	Biometra, Göttingen

<b>Gerät</b>	<b>Modell</b>	<b>Hersteller</b>
Thermomixer	Thermomixer comfort	Eppendorf
Ultraschallbad	Sonorex	Bandelin, Berlin
UV/VIS-Spektralphotometer	Cary Win	Agilent Technologies
Vakuummzentrifuge	Concentrator Plus	Eppendorf
Vortex	REAX 2000	Heidolph InstPansents
Wasserbad	Modell:1003	Gesellschaft für Labortechnik (GFL), Burgwedel
Western Blot-Kammer	TransBlot®Cell	Bio-Rad
Zentrifuge	Heraeus Fresco 21	Thermo Scientific, Osterode
HPLC Anlage 1		
Autosampler	L-7200 (LaChrom)	Merck/Hitachi, Darmstadt
Pumpe	L-7100 (LaChrom)	Merck/Hitachi
Säulenofen	L-7360 (LaChrom)	Merck/Hitachi
Detektor	Fluorescence Detector L-7485 (LaChrom)	Merck/Hitachi
HPLC Anlage 2		
Autosampler	L-2200 (LaChrom)	Merck/Hitach
Pumpe	L -2130 (LaChrom)	Merck/Hitachi
Säulenofen	Jetstream 2 Plus	Merck/Hitachi
Detektor	UV-VIS-Detektor L-2420 (LaChrom Elite)	Merck/Hitachi

### 2.3 Tierversuch und Probennahme

Der Tierversuch sowie die Probennahme wurden im Vorfeld dieser Arbeit unter Leitung von Herrn Dr. Christian Koch an der Lehr- und Versuchsstation Neumühle (Münchweiler an der Alsenz) durchgeführt. Die Genehmigung des Tierversuch wurde von der zuständigen Veterinärbehörde erteilt (Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz, Aktenzeichen 23 177-07/G 15-20-040). Die Durchführung erfolgte unter Einhaltung des Tierschutzgesetzes. 50 hochleistende Holstein-Kühe (19 Kühe erste Parität, 31 Kühe 2. - 5. Parität), die im Zeitraum vom 10.06.2015 bis 31.10.2016 beprobt wurden, waren in den Versuch einbezogen. Die Haltung der Tiere erfolgte in einem Liegeboxenlaufstall mit Tiefboxen. Die Tiere wurden gemäß den Empfehlungen der Gesellschaft für Ernährungsphysiologie gefüttert (GfE 2001). Den trockenstehenden Tieren wurde eine totale Mischration (TMR) ad libitum angeboten, die die Nettoenergie und den Rohproteinbedarf einer trockenstehenden Kuh mit einem Körpergewicht von 650 kg und einer Trockenmasse-Aufnahme (TMA) von 12 kg/ Tag deckt. Nach der Abkalbung wurden Nettoenergie und Rohprotein der TMR für eine Kuh mit einer täglichen Milchproduktion von 34 kg bei einer TMA von 22 kg/ Tag angepasst. Tränkwasser stand ad libitum zur Verfügung. Die durchschnittliche Zusammensetzung der TMR vor und nach der Abkalbung ist in Tabelle 2.3 und Tabelle 2.4 dargestellt. Die einzelnen Komponenten der TMR wurden alle zwei Wochen von der Landwirtschaftlichen Untersuchungs- und Forschungsanstalt (LUFÄ, Speyer) analysiert (Weender-Analytik für Trockensubstanz, Rohfaser und Rohprotein sowie Mineralstoffanalytik mittels Röntgenfluoreszenzanalyse gemäß VDLUFA (Naumann K. et al. 2012)). Die Parameter Nettoenergie-Laktation (NEL), umsetzbare Energie (ME) sowie das nutzbare Rohprotein am Duodenum wurden gemäß den Vorgaben der Gesellschaft für Ernährungsphysiologie (GfE 2009) berechnet. Die Mischung der TMR erfolgte auf der Basis der ermittelten Nährwerte, sodass eine gleichbleibende Zusammensetzung sichergestellt werden konnte.

Die tägliche tierindividuelle Futteraufnahme wurde mit Hilfe von Wiegetrögen (Roughage Intake Control, Insentec B. V., Marknesse, Niederlande) erfasst. 5 Tage vor dem voraussichtlichen Kalbedatum bis 5 Tage nach der Abkalbung wurden die Tiere in separaten Abkalbeboxen gehalten, während dieses Zeitraums konnte aus technischen Gründen keine Aufzeichnung der Futteraufnahme erfolgen. Am Tag der Abkalbung bekamen die Tiere einen Energietrunk (AC-Quick Fit, Schils, Niederlande, Zusammensetzung: Dextrose, Molkepulver, Natriumchlorid, Natriumbicarbonat, Pflanzenfett (Kokos), Vitamin- und Mineralstoffe gemäß Tabelle 2.5) *ad libitum* angeboten. Zusätzlich wurden die Tiere in den ersten 10 Tagen postpartum einmal täglich mit 250 mL Propylenglykol peroral behandelt.

**Tabelle 2.3 Durchschnittliche Zusammensetzung der totalen Mischration (TMR) der trockenstehenden und laktierenden Kühe**

Komponente	Anteil an der Trockenmasse [%]	
	Ration Trockensteher (7 w ap.-Abkalbung)	Ration laktierende Tiere (Abkalbung – 14 w. pp.)
Pressschnitzel (Zuckerrübe)	-	14,4
Stroh	2,3	1,6
Heu	6,9	4,1
Maissilage	37,8	18,3
Grassilage	37,7	24,4
Luzerneheu	-	1,4
Konzentrat <sup>1</sup>	14,1	34,6
Harnstoff	0,5	-
Mineralfutter <sup>2</sup>	0,8	-
Futterfett	-	0,9
Natriumhydrogencarbonat	-	0,4

<sup>1</sup>bezogen von Raiffeisen Waren-Zentrale Rhein-Main (Köln): Bestandteile in % Trockenmasse: 25,0% Rapsschrot, 22,5% Sojaschrot, 17,7% Mais, 15,8% Gerste, 12,2% Sojaschalen, 1,7% Melasse, 1,9% ProfiMineral Mix\*, 1,1% Futterharnstoff, 1,0% Viehsalz, 0,8% Futterfett, 0,3% Futterkalk

\*ergibt pro kg Konzentrat: 1,52 g Natrium, 0,95 g Magnesium, 3,42 g Calcium, 0,67 g Phosphor, 0,57 g Eisen, 95 mg Mangan, 152 mg Zink, 38 mg Kupfer, 1,9 mg Jod, 1,52 mg Cobalt, 0,95 mg Selen, 22800 IU Vitamin A, 2850 IU Vitamin D und 114 mg Vitamin E

<sup>2</sup>Rindamin K11 ATG; Schaumann, Pinneberg: ergibt pro kg TMR: 0,36 g Calcium, 0,36 g Phosphor, 0,36 g Natrium, 0,4 g Magnesium, 28 mg Zink, 17 mg Mangan, 6,0 mg Kupfer, 0,24 mg Cobalt, 0,80 mg Jod, 0,21 mg Selen, 4.000 IU Vitamin A, 600 IU Vitamin D, 20 mg Vitamin E

ap. = antepartum, pp. = postpartum

**Tabelle 2.4 Durchschnittliche Nährwerte der Trockensubstanz**

Komponente	Trockensteher (7 w ap. – Abkalbung)	Laktation (Abkalbung - 14 w pp.)
Metabolisierbare Energie* (ME) [MJ/ kg]	10,5	10,9
Nettoenergie-Laktation (Nel) [MJ/ kg]*	6,4	7,0
Rohprotein [g/kg]	132,4	170,6
nXP [g/kg]*	138,5	156,4
NDF, g/kg TM	382	333
ADF, g/kg TM	223	210
RNB [g/kg]*	-1,0	2,3
Rohfaser [g/kg]	206,4	174,5
Calcium [g/kg]	3,7	6,4
Phosphor [g/kg]	3,5	4,4
Magnesium [g/kg]	2,6	2,4
Natrium [g/kg]	0,8	2,2
Kalium [g/kg]	9,5	10,7

nXP = nutzbares Rohprotein am Duodenum, NDF Neutrale Detergenzfaser, ADF Saure Detergenzfaser, RNB = ruminale Stickstoffbilanz, ap. = antepartum, pp. = postpartum, \* berechneter Wert aus den Analysen aller Futtermittel-Komponenten gemäß GfE (2009)

**Tabelle 2.5 Vitamin- und Mineralstoffkonzentrationen des Energietrunkes (AC-Quick Fit)**

<b>Komponente</b>	<b>Gehalt/ kg Pulver</b>	<b>Konzentration/L zubereiteter Trunk (50 g AC-Quick Fit/L)</b>
Vitamin A	200.000 IU	10.000 IU
Vitamin D3	20.000 IU	1.000 IU
Vitamin E	1g	50 mg
Zinksulfat-Monohydrat	0,2 g	10 mg
Mangansulfat-Monohydrat	0,11 g	5,5 mg
Eisensulfat-Monohydrat	0,1 g	5 mg
Nikotinsäure	9 g	450 mg

Die Probennahme erfolgte zu den Zeitpunkten 2 Wochen antepartum (ap.) ( $12 \pm 4$  Tage) sowie 1 Woche ( $9 \pm 2$  Tage), 4 Wochen ( $28 \pm 2$  Tage) und 7 Wochen ( $50 \pm 2$  Tage) postpartum morgens nach dem Melken. Aus der Halsvene (*Vena jugularis*) wurden ca. 10 mL Blut entnommen und in Röhrchen mit Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (S-Monovette, Sarstedt, Nümbrecht) gesammelt. Anschließend wurde das Blut bei 1800 g und 4 °C für 10 min zentrifugiert, um Plasma zu gewinnen. Das Plasma wurde zunächst bei -20 °C eingefroren und längerfristig bei -80 °C gelagert. Die Leberbiopate, bestehend aus ca. 600 mg Lebergewebe, wurden nach lokaler Betäubung mit 5 mL Isocain (Selectavet, Weyarn/ Holzolling) zwischen der 11. und 12. Rippe mit einer sterilen Biopsienadel (Dispomed Witt oHG, Gelnhausen) entnommen und anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren und gelagert.

Die Tiere wurden zweimal täglich (05:00 und 15:30 Uhr) mit einem Melksystem (GEA Farm Technologies, Bönen) gemolken. Zur Erfassung der Milchleistung wurden die tägliche Milchmenge ab Tag 6 nach der Abkalbung mit dem Herdenmanagementsystems Diary Plan C21 (GEA) aufgezeichnet. Zusätzlich wurde das Körpergewicht über eine Tierwaage erfasst, die nach dem Durchlaufen des Melkstandes passiert wurde. Einmal wöchentlich wurde der Fett- und Proteingehalt der Milch vom Labor des Landeskontrollverbandes Rheinland-Pfalz-Saar (Bad Kreuznach) untersucht. Aus den erhobenen Daten wurde die Energie-korrigierte Milchleistung (ECM, entsprechend einer Milch mit 4% Fett und 3,4% Protein) gemäß (GfE 2001) nach Formel 1 berechnet:

$$\text{ECM [kg]} = \text{Milch [kg]} \cdot \frac{(0,38 \cdot \text{Fett [\%]} + 0,21 \cdot \text{Eiweiß [\%]} + 1,05)}{3,28} \quad (1)$$

Die Berechnung der Energiebilanz (EB) erfolgte nach Formel 2:

$$\text{Energiebilanz (EB) [MJ]} = \text{aufgenommene Energie} - (\text{Erhaltungsenergie} + \text{Leistungsenergie}) \quad (2)$$

aufgenommene Energie = Futterenergie [MJ/kg] · Futteraufnahme [kg Trockenmasse],  
 Erhaltungsenergie =  $0,293 \cdot \text{Körpergewicht [kg]}^{0,75}$ , Leistungsenergie = Energiebedarf zur Bildung von 1 kg Milch<sup>1</sup> \* ECM [kg], <sup>1</sup>3,3 MJ NEL/kg Milch für Milch mit 4% Fett und 3,4% Protein

## 2.4 Genexpressionsanalysen

RNA-Isolation, cDNA-Synthese und PCR wurden ausschließlich mit autoklavierten Gebrauchsmaterialien sowie mit Diethyldicarbonat (DEPC) behandeltem und autoklaviertem Reinstwasser durchgeführt.

### 2.4.1 Herstellung von Diethyldicarbonat-Wasser (DEPC-Wasser)

Zur Inaktivierung von RNAsen wurde 0,1% Diethyldicarbonat (DEPC) in Reinstwasser gelöst. Die Lösung wurde bei 37 °C für 24 h inkubiert und anschließend autoklaviert.

### 2.4.2 RNA-Isolation

Die Isolation der RNA erfolgte unter Verwendung von Trizol<sup>®</sup> (Thermo Fisher Scientific) nach den Angaben des Herstellers. Dazu wurden je Probe ca. 15 mg gefrorene Leber eingewogen, mit 1 mL Trizol und einer Metallkugel versetzt und im Tissue Lyser (Qiagen) für 5 min bei 15 Hz homogenisiert. Anschließend wurden zur Protein-Präzipitation 200 µL Chloroform zugegeben, gemischt und nach einer Inkubation von 3 min bei Raumtemperatur (RT) für 15 min bei 13.000 U/min (16.249 g) und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in neue Cups überführt und je 500 µL Isopropanol hinzu pipettiert, gemischt, 10 min bei RT inkubiert und erneut für 10 min zentrifugiert, um die Nukleinsäuren zu fällen. Nach dem Entfernen des Überstandes wurde das entstandene Pellet mit 1 mL 75%igem Ethanol gewaschen, 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Um Ethanolreste zu entfernen wurden die Cups für 20 min offen unter dem Abzug inkubiert. Die isolierten Pellets wurden anschließend in 50 µL DEPC-Wasser durch 10 min Inkubation bei 60 °C und 900 rpm gelöst, danach sofort auf Eis gekühlt und bis zur weiteren Verwendung bei - 80 °C gelagert.

### 2.4.3 Bestimmung der RNA Qualität und Integrität

Zur Bestimmung von Konzentration und Qualität der isolierten RNA wurde mittels Mikroplattenreader (Tecan) unter Verwendung einer NanoQuant plate<sup>™</sup> die optische Dichte (OD) bei 260 und 280 nm bestimmt. Anhand des Verhältnis OD 260 nm/OD 280 nm können Rückschlüsse auf eine mögliche Verunreinigung der RNA z. B. durch Proteine gezogen werden. Ein Verhältnis von 1,8 - 2,0 wurde als eine ausreichende Reinheit der extrahierten RNA

angesehen. Der Mittelwert des OD 260 nm/OD 280 nm Verhältnisses aller Proben betrug 1,94 +/- 0,03.

Die Integrität der RNA wurde mit Hilfe des Agilent 2100 Bioanalyzer unter Verwendung des Agilent RNA 6000 Nano Kits bestimmt. Die erhaltene RNA-Integritätsnummer (RIN-Wert) ist ein Maß für den Abbau der RNA, wobei ein RIN-Wert von 1 für vollständig degradierte RNA steht, während ein RIN-Wert von 10 komplett intakte RNA anzeigt. Ein RIN-Wert von  $\geq 5,0$  wurde als ausreichend für die nachfolgenden Analysen angesehen. Die RNA-Isolation von Proben mit einem RIN-Wert  $< 5,0$  wurde wiederholt. Der mittlere RIN-Wert aller isolierten RNA Proben lag bei 6,1 +/- 0,7.

#### 2.4.4 cDNA-Synthese

Die Messenger-DNA (mRNA) der isolierten RNA-Proben wurde durch reverse Transkription in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Dazu wurden je 2,4  $\mu\text{g}$  der isolierten RNA zur cDNA Synthese eingesetzt. Das entsprechende Probenvolumen wurde mit DEPC-Wasser auf ein Gesamtvolumen von 15  $\mu\text{L}$  ergänzt. Der verwendete Reaktionsansatz sowie das Temperaturprogramm des Thermocycler sind in Tabelle 2.6 und Tabelle 2.7 aufgeführt. Die verwendeten Oligo-dT-Primer binden an die Poly-A-Sequenzen der mRNA Fraktion, was ein selektives Umschreiben der mRNA in cDNA ermöglicht.

**Tabelle 2.6 Reaktionsansatz reverse Transkription**

Reaktionsansatz/Probe	$\mu\text{L}$
DEPC-Wasser	19,9
5xPuffer	10
dNTPs	2,5
OligodT	2
Reverse Transkriptase	0,6
Summe RNA + Wasser	15

**Tabelle 2.7 Temperaturprogramm des Thermo-Cyclers während der reversen Transkription**

Temperaturprogramm Thermo-Cycler	
60 min	42 °C
10 min	70 °C
10 min	4 °C

Die erhaltene cDNA wurde im Verhältnis 1:3 mit DEPC-Wasser verdünnt, aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

### 2.4.5 Quantitative Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurden die relativen Genexpressionen der Zielgene sowie potenzieller Referenzgene unter Verwendung des KAPA SYBR FAST qPCR Mastermixes (Peqlab, Erlangen) bestimmt. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes sowie das Temperaturprogramm der PCR sind in Tabelle 2.8 und Tabelle 2.9 aufgeführt. Genspezifische Primerpaare wurden mit Primer-BLAST (pubmed) designt und von Eurofins Genomics (Ebersberg) bezogen. Tabelle 2.10 zeigt die in dieser Arbeit verwendeten Primerpaare. Die Quantifizierung erfolgte anhand der Messung der Fluoreszenz des interkalierenden Farbstoffes SYBR Green. Im Anschluss an die qPCR wurde die Produktspezifität durch die Betrachtung einer Schmelzkurve im Bereich von 50-95 °C überprüft.

**Tabelle 2.8 Zusammensetzung des Reaktionsansatzes pro 10 µL PCR-Ansatz**

Komponente	Volumen [µL]
KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix	2,6
DEPC-Wasser	5
Forward Primer (10 pmol/µL)	0,2
Reverse Primer (10 pmol/µL)	0,2
cDNA-Probe	2

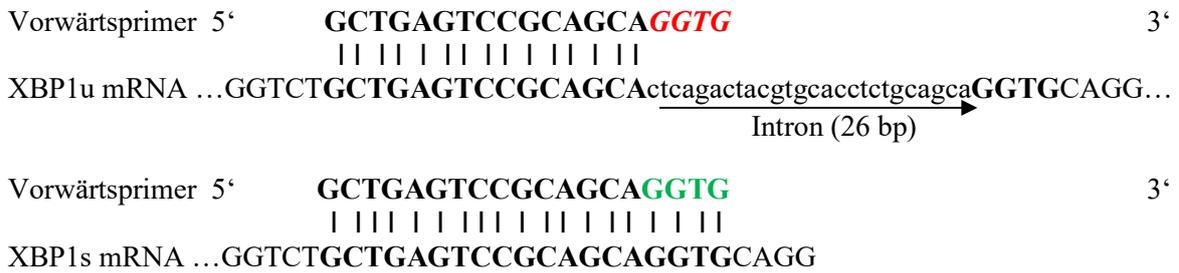
**Tabelle 2.9 Temperaturprogramm der PCR**

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit
1. Initiale Denaturierung	95	3 min
2. Denaturierung	95	5 s
3. Primer-Annealing	Primer spezifisch s. Tabelle	20 s
4. Elongation	72	1 s
Wiederholung von Schritt 2-4 für 30-45 Zyklen		

#### Primer zur spezifischen Detektion von XBP1s

Im Rahmen der UPR erfolgt das Spleißen von XBP1 (s.1.2) somit stellt gespleißtes XBP1 (XBP1s) einen wichtigen Marker für das Auftreten von ER-Stress dar. Der Nachweis von XBP1s erfolgte bisher hauptsächlich semiquantitativ mittels PCR, die sowohl die gespleißte als auch die ungespleißte Transkriptvariante detektiert. Die Auftrennung der Transkriptvarianten erfolgte in einer anschließenden Gelelektrophorese. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Primer designt, welche die direkte spezifische Detektion der XBP1s mRNA ermöglichen. Diese Primer sind so designt, dass sie das 26 bp lange Intron der ungespleißten Transkriptvariante überspannen (Abbildung 2.1). Der Vorwärtsprimer bindet an die Nukleotide direkt vor und nach dem Intron. Bei der ungespleißten Transkriptvariante ist die Bindungsstelle dieses Primers

durch das Intron unterbrochen. Die Spezifität der Primer wurde mittels Gelelektrophorese und einer bei LGC Genomics in Auftrag gegebenen Sequenzierung des PCR Produktes bestätigt.



**Abbildung 2.1 Bindung des spezifischen XBP1s Primers**

XBP1u: X-Box bindendes Protein 1 ungespleißt, XBP1s: X-Box bindendes Protein 1 gespleißt,

Bestimmung der Primereffizienzen

Anhand einer Verdünnungsreihe eines Probenpools aller Proben wurde die Effizienz der Primer bestimmt und nach Formel 3 berechnet:

$$E = 10^{-\frac{1}{m}} \tag{3}$$

Mit E: Primereffizienz, m: Steigung der Ausgleichsgeraden der Verdünnungsreihe

Die ermittelten Primereffizienzen sind in Tabelle 2.10 aufgeführt.

Tabelle 2.10 verwendete Primer für die PCR

Gen	Vorwärtsprimer Rückwärtsprimer 5' zu 3'	Produktgröße [bp]	GenBank NCBI	Temperatur [°C]	Primer- Effizienz	Steigung	R <sup>2</sup>
<b><u>Potenzielle Referenzgene</u></b>							
<i>ACTB</i>	<i>ACTTGCGCAGAAAACGAGAT</i> <i>CACCTTCACCGTTCCAGTTT</i>	121	NM_173979.3	57	2,01	-3,30	1,00
<i>ATP5B</i>	<i>GGACTCAGCCCTTCAGCGCC</i> <i>GCCTGGTCTCCCTGCCTTGC</i>	229	NM_175796.2	65	1,96	-3,41	1,00
<i>EEF1A1</i>	<i>GTCAAAGATGTCCGTVCGTGGC</i> <i>TGGCAGCGTCACCAGATTTCA</i>	253	NM_174535.2	60	1,95	-3,35	1,00
<i>H3F3A</i>	<i>CTGTGGCACTCCGTGAAATTA</i> <i>ACTTGCCCTCTGCAAAGCAC</i>	154	NM_001014389.2	60	1,94	-3,48	1,00
<i>HPCAL</i>	<i>CCATCGACTTCAGGGAGTTC</i> <i>AGTTTGCCGTCATTGTTGGTA</i>	256	NM_001098964.2	60	1,91	-3,55	0,98
<i>RPL12</i>	<i>GGCAACTGGTGATTGGAAGG</i> <i>TCTGCTTCTTTCTGTCCCTTGG</i>	143	NM_205797.1	60	1,90	-3,59	1,00
<i>RPS9</i>	<i>GTGAGGTCTGGAGGGTCAAA</i> <i>GGGCATTACCTTCGAACAGA</i>	108	BC148016	57	1,93	-3,51	0,98
<i>YWHAZ</i>	<i>AGGAGCCCGTAGGTCATCTTG</i> <i>ACCTCAGCCAAGTAGCGGTAG</i>	240	NM_174814.2	59	1,95	-3,45	1,00
<b><u>Zielgene</u></b>							
<i>ACADM</i>	<i>GCGAGTACCCTGTCCCATA</i> <i>CCTCAGTCATTCTCCCCAAA</i>	243	NM_001075235.1	57	1,92	-3,53	0,99
<i>ACAT</i>	<i>TGCGCCTGCATATGCTGTTCCCT</i> <i>AGCACCTCCTCCTCCGTTGC</i>	277	NM_001046075.1	62	1,97	-3,40	1,00

Gen	Vorwärtsprimer Rückwärtsprimer 5' zu 3'	Produktgröße [bp]	GenBank NCBI	Temperatur [°C]	Primer- Effizienz	Steigung	R <sup>2</sup>
<i>ACACA</i>	<i>CTCTTCCGACAGGTTCAAGC</i> <i>AGTCCCCGCACTCACATAAC</i>	270	NM_174224.2	60	2,03	-3,26	1,00
<i>ACOX1</i>	<i>TCAGCCGTAGCCAGCGTTAC</i> <i>GTCTGGGCGTAGGTGCCAAT</i>	256	NM_001035289.3	60	1,92	-3,53	0,99
<i>APOB</i>	<i>CGACCATCACCGTGCCCGAG</i> <i>ACAAGGGCGAGGCCACCTCA</i>	123	XM_010817552.1	64	1,97	-3,40	0,98
<i>AOAH</i>	<i>AGCAGAACTCTCCAAAACGC</i> <i>CCTTTGCCACTCCTCCGTGA</i>	115	NM_001078096.2	60	1,92	-3,54	0,99
<i>ATF4</i>	<i>TGGTCTCAGACAACAGCAAG</i> <i>AGCTCATCTGGCATGGTTTC</i>	130	NM_001034342.2	59	1,95	-3,46	0,98
<i>BAK</i>	<i>TACTTCACCAAGATCGCGTC</i> <i>ACGATGGCTACGCTCTTGAT</i>	254	NM_001077918.1	59	1,97	-3,39	0,98
<i>BAX</i>	<i>TCTGACGGCAACTTCAACTG</i> <i>ATGGTCACTGTCTGCCATGT</i>	224	NM_173894.1	59	1,90	-3,58	1,00
<i>CASP3</i>	<i>AGCACCTGGTACTTTTCCTGG</i> <i>CCGAGTAAGAATGTGCATGAGC</i>	118	NM_001077840.1	59	2,02	-3,27	0,99
<i>CASP8</i>	<i>TACCAGCGAGGAGGAGATGAAG</i> <i>CATCCAGCTTACATTTGGCAATC</i>	164	NM_001045970.2	59	1,91	-3,55	0,99
<i>CASP9</i>	<i>AAACAGGATGACCCATCAAAGC</i> <i>ATTCAGGACATAGGCCAGATCG</i>	204	NM_001205504.1	60	2,01	-3,30	1,00
<i>CAT</i>	<i>TGGGACCCAACTATCTCCAG</i> <i>AAGTGGGTCCCTGTGTTCCAG</i>	178	NM_001035386.2	59	1,92	-3,52	1,00
<i>CCL2</i>	<i>TCACAGTAGCTGCCTTCAGCA</i> <i>ACCCATTTCTGCTTGGGGTCT</i>	214	NM_174006.2	60	1,91	-3,55	1,00
<i>CP</i>	<i>CGGTGGAGGTGGAATGGGAT</i> <i>TGTGCTGTCAGTGAATTGCCG</i>	161	NM_001256556.1	59	1,96	-3,42	0,99

Gen	Vorwärtsprimer Rückwärtsprimer 5' zu 3'	Produktgröße [bp]	GenBank NCBI	Temperatur [°C]	Primer- Effizienz	Steigung	R <sup>2</sup>
<i>CPT1A</i>	<i>CGTCGCTCGCTCACTCGG</i> <i>CGGAGGTCGATCCCATCTGGA</i>	137	FJ415874.1	60	2,07	-3,16	0,98
<i>CRP</i>	<i>GGCCAGACAGACTTGCATAAGAAGG</i> <i>GGGTTCTGGGCCAGCTCTGTG</i>	142	NM_001144097.1	60	1,96	-3,43	1,00
<i>CYP2R1</i>	<i>CATTGCAACCCAGCCCTAC</i> <i>TTGGGGGTGAGGCAAACAAC</i>	90	NM_001076267.2	60	2,03	-3,24	1,00
<i>DDIT3</i>	<i>AGTCACTGCCTTTCTCCTTC</i> <i>TCTTCCTCCTGTTTCCAGG</i>	133	NM_001078163.1	59	1,92	-3,53	0,99
<i>DNAJC3</i>	<i>GTACGAAGGTGCTGAATGTG</i> <i>ATCAGGGTCACCATCTACTG</i>	133	NM_174756.3	59	1,92	-3,54	0,99
<i>EDEM1</i>	<i>CCCCTACCCTCGGGTGAATCT</i> <i>GTGGAATCCCCAGCAGTCG</i>	126	NM_001103092.2	60	1,91	-3,54	0,99
<i>FASN</i>	<i>GCTGAGCCTGATGCGTCTGAGC</i> <i>GGATGGCAGTGAGGCTCACGAA</i>	138	NM_001012669.1	64	1,96	-3,41	0,99
<i>FGF21</i>	<i>TGTGGGTCCCTGTGCTGGCT</i> <i>CCACTGTGCCATCGGCCCTG</i>	171	XM_001789587.1	65	1,89	-3,63	0,99
<i>GPAM</i>	<i>GGTGTAAGCATGCCACCGAG</i> <i>CAGCACCTTCCCACAAAGGG</i>	124	NM_001012282.1	60	1,89	-3,63	0,99
<i>GPX1</i>	<i>GCTCTGGATTCGGAAACGGA</i> <i>GAGGACAGGTTGAAGGGCTC</i>	134	NM_174076.3	59	1,89	-3,61	1,00
<i>HERUPD1</i>	<i>CCGTGTTTCTCAGTATCCTC</i> <i>TCTTGATTCACAGCCTCCTG</i>	169	NM_001102265.2	59	1,96	-3,42	0,99
<i>HMGCL</i>	<i>AGAAGCCACCAGCTTCGTGT</i> <i>GCGACTTTAGCCGGGGAGAT</i>	345	NM_001075132.1	60	1,89	-3,61	1,00
<i>HMGCS2</i>	<i>GCCCAATATGTGGACCAAAC</i> <i>ATGGTCTCAGTGCCCACTTC</i>	209	NM_001045883.1	60	1,91	-3,56	1,00

Gen	Vorwärtsprimer Rückwärtsprimer 5' zu 3'	Produktgröße [bp]	GenBank NCBI	Temperatur [°C]	Primer- Effizienz	Steigung	R <sup>2</sup>
<i>HP</i>	<i>TGAGGCAGTGTGCGGGAAGCC</i> <i>AGCGTGGCTCCCGAGATGAGGTT</i>	138	NM_001040470.2	60	1,93	-3,51	0,98
<i>HSPA5</i>	<i>CAAGTTGATGTTGGAGGTGG</i> <i>AAGCCTCAGCAGTTTCCTTC</i>	94	NM_001075148.1	59	1,89	-3,62	0,98
<i>IL1B</i>	<i>GCAGCTGGAGGAAGTAGACCCC</i> <i>TGTCCCAGGAAGACGGGCCTTT</i>	168	NM_174093.1	60	2,09	-3,12	1,00
<i>IL8</i>	<i>CTGCAGTTCTGTCAAGAATGA</i> <i>CTCTTCACAAATACCTGCACA</i>	220	NM_173925.2	56	1,99	-3,35	0,99
<i>MT1A</i>	<i>ATCCGACCAGTGGATCTGCTTTGCC</i> <i>AGACACAGCCCTGGGCACACT</i>	209	NM_001040492.2	63	1,98	-3,37	0,99
<i>MTTP</i>	<i>GCACCGAGAGCGTTATCCTCCA</i> <i>GGAGTGTGGTGGCGGCAAGG</i>	378	NM_001101834.1	64	1,96	-3,42	1,00
<i>NQO1</i>	<i>GGTGCTCATAGGGGAGTACGC</i> <i>CGGGAGTGTGCCCAATGCTAT</i>	236	NM_001034535.1	60	1,90	-3,59	0,99
<i>PDIA4</i>	<i>AGGTTTGACGTGAGTGGCTA</i> <i>CATCGAAGTTGTCCTTGGTC</i>	175	NM_001045879.2	59	2,04	-3,23	0,99
<i>PTGS2</i>	<i>CGCACCTCACCAAAACGGTC</i> <i>ACTGCTAGGCTTCTACAGTTCGG</i>	116	NM_174445.2	60	1,92	-3,53	1,00
<i>RBP4</i>	<i>GGGCGTAGCGTCCTTTCTCC</i> <i>GGGTCTCGGGCAAACACGAA</i>	150	NM_001040475.2	61	1,98	-3,38	1,00
<i>SAA</i>	<i>CCTCAAGGAAGCTGGTCAAGGGGCT</i> <i>CAGGCACCCCCAGGTCCCCT</i>	141	NM_181016.3	61	1,94	-3,47	0,99
<i>SLC27A1</i>	<i>CTGAGGTGGAAGGCGTGCTA</i> <i>TCCTCGTACAGTGC GTTGGG</i>	148	NM_001033625.2	60	2,10	-3,11	0,98
<i>SOD1</i>	<i>TGTTGCCATCGTGGATATTG</i> <i>CAGCGTTGCCAGTCTTTGTA</i>	143	NM_174615.2	56	1,92	-3,54	1,00

Gen	Vorwärtsprimer Rückwärtsprimer 5' zu 3'	Produktgröße [bp]	GenBank NCBI	Temperatur [°C]	Primer- Effizienz	Steigung	R <sup>2</sup>
<i>SREBF1</i>	<i>AACGCCATCGAGAAACGCTA</i> <i>CTTTGTGGACAGCAGTGCG</i>	197	NM_001113302.1	59	1,91	-3,55	1,00
<i>TNF</i>	<i>GCCCCAGGGCTCCAGAAGTT</i> <i>GCCACCTGGGGACTGCTCTTCC</i>	134	NM_173966.3	64	1,91	-3,56	0,98
<i>TTR</i>	<i>TCACTTGGCATCTCCCCGTTT</i> <i>AGGGCGGTGGTAGAGTAGGAG</i>	122	NM_173967.3	59	1,97	-3,39	1,00
<i>UGT1A1</i>	<i>GCTCGTCAAGTGGCTGCCCCA</i> <i>TCCCCGGGTCTCCATGCGCT</i>	175	NM_001105636.1	61	1,89	-3,63	1,00
<i>XBPIs</i>	<i>GCTGAGTCCGCAGCAGGTG</i> <i>AGGGATGGAGAAGGGGAGGC</i>	236	NM_001271737.1	61	2,08	-3,15	0,99

Abkürzungen: *ACACA*: Acetyl-CoA-Carboxylase alpha; *ACADM*: Acyl-CoA-Dehydrogenase C4 bis C12; *ACAT1*: Acetyl-CoA-Acetyltransferase 1; *ACO1*: Acyl-CoA-Oxidase 1; *APOB*: Apolipoprotein B; *ATF4*: aktivierender Transkriptionsfaktor 4; *BAK1*: BCL2-Antagonist/Killer 1; *BAX*: BCL2-assoziiertes X-Protein; *CASP*: Caspase; *CAT*: Catalase; *CCL2*: Chemokin-Ligand 2; *CP*: Ceruloplasmin; *CPT*: Carnitin-Palmitoyltransferase; *CRP*: C-reaktives Protein; *DDIT3*: DNA-schadeninduziertes Transkript 3; *DNAJC3*: DnaJ (Hsp40) Homolog, Unterfamilie C3; *EDEMI*: ER-Abbau-Enhancer, Mannosidase alpha-ähnlich; *FASN*: Fettsäuresynthase; *GPAM*: Glycerol-3-phosphat-Acyltransferase, mitochondrial; *GPX*: Glutathionperoxidase; *HERPUDI*: Homocystein-induzierte-ER-Stress-induzierte-Ubiquitin-ähnliche Domäne 1; *HMGCS2*: mitochondriale 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoASynthase; *HMGCL*: 3-Hydroxymethyl-3-Methylglutaryl-CoA-Lyase; *HP*: Haptoglobin; *HSPA5*: Hitzeschockprotein 70 kDa Protein 5; *IL*: Interleukin; *MT1A*: Metallothionein 1A; *MTTP*: mikrosomales TG-Transferprotein; *NQO1*: NAD(P)H-Dehydrogenase Quinon 1; *PDIA4*: Protein-Disulfid-Isomerase-Familie A4; *PTGS2*: Prostaglandin-Endoperoxid-Synthase 2; *RBP*: Retinol-bindendes Protein; *SAA*: Serumamyloid A; *SLC27A1*: SLC-Transporter für langkettige Fettsäuren; *SOD*: Superoxiddismutase; *SREBF1*: Sterol-regulatorisches-Element-bindender Transkriptionsfaktor 1; *TNF*: Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$ ; *TTR*: Transthyretin; *UGT1A1*: UDP-Glucuronosyltransferase 1-Familie: Polypeptid A1; *XBPI*: X-Box bindendes Protein 1

Datenkorrektur

Auf Grund der hohen Anzahl an Proben sind pro Gen mehrere PCR-Läufe nötig. Um mögliche Variationen zwischen den Läufen zu korrigieren, wird daher in jedem Lauf eine Poolprobe in Dreifachbestimmung mitgeführt.

Die mittels Rotor-Gene Q Software (Qiagen) aufgenommenen  $C_t$ -Werte wurden wie folgt in relative Expressionswerte transformiert (4):

$$\text{Relative Expression} = E^{-\Delta C_t} \quad \Delta C_t = C_{t,\min} - C_{t,\text{target}} \quad (4)$$

mit E: Primereffizienz = 2,  $C_{t,\min}$  = *threshold cycle* (Schwellwertzyklus) der Probe mit dem niedrigsten  $C_t$ -Wert,  $C_{t,\text{target}}$  = Schwellwertzyklus der Probe

Normalisierung

Um die relativen Expressionen verschiedener Proben miteinander vergleichen zu können, müssen Variationen in der Quantität und Qualität der cDNA ausgeglichen werden. Daher ist eine Normalisierung der  $C_t$ -Werte nötig. Gemäß den MIQE-Guidelines (Bustin et al., 2009) sollen mindestens drei Referenzgene zur Normalisierung herangezogen werden. Außerdem müssen diese in Abhängigkeit vom individuellen Versuch auf ihre Verwendbarkeit getestet werden.

Zur Normalisierung der relativen Expressionen wurden mittels GeNorm-Methode (Vandesompele et al. 2002) aus 8 in der Literatur beschriebenen potenziellen Referenzgenen die am besten geeigneten ausgewählt. Durch Bildung eines geometrischen Mittelwertes der relativen Expressionen der drei stabilsten Referenzgene (*EEF1A1*, *H3F3A*, *RPL12*) wurden anschließend probenindividuelle Normalisierungsfaktoren berechnet. Die Normalisierung erfolgt durch Division der relativen Expression durch den individuellen Normalisierungsfaktor.

**2.4.6 Agarosegelelektrophorese**

Zur Kontrolle der Primerspezifität wurden die PCR-Produkte aus 2.4.5 mittels Gelelektrophorese in einem 1,5%igen Agarosegel aufgetrennt.

Zur Herstellung eines Gels wurden 2,25 g Agarose eingewogen und nach Zugabe von 150 mL 1x TAE Puffer (Tabelle 2.11) durch Erhitzen in der Mikrowelle komplett gelöst. Nach dem Abkühlen auf 70 °C wurden 3 µL Gel Red hinzugefügt und gemischt. Anschließend wurde das Gel in die Gelkammer gegossen und ca. 30 min aushärten lassen. Das Gel wurde in der Gelkammer mit 1x TAE Puffer überschichtet für ca. 10 min äquilibriert.

**Tabelle 2.11 Herstellung des 50x TAE-Puffers für die Agarose-Gelelektrophorese**

<b>Komponente</b>	<b>Anteil</b>
EDTA-Lösung 0,5 M pH 8,0	100 mL
Essigsäure	57,1 mL
Tris	242 g
Reinstwasser	ad 1 L

Der 50x TAE-Puffer wurde vor der Verwendung 1:50 mit Reinstwasser verdünnt (1x TAE-Puffer).

2 µL Probe wurden mit 2 µL 5x Landepuffer und 8 µL DEPC-Wasser gemischt. Danach wurden 7 µL Probe pro Geltasche aufgetragen. Als Größenstandard diente ein GenRuler 100 bp Standard, von dem 4 µL in die erste und letzte Tasche des Gels aufgetragen wurden.

Die Gelelektrophorese wurde mit einer Spannung von 120 Volt durchgeführt. Die Laufzeit der Gele variierte zwischen 2,5 - 3 Stunden. Nach dem Lauf wurden die Gele mittels Gene Flash (VWR) dokumentiert.

## 2.5 Western Blot

Die relative Proteinkonzentration an *FASN* und *CPT1A* in der Leber wurde in zufällig ausgewählten Proben (n=9) mittels Western Blot bestimmt. Für den Western Blot wurden die in Tabelle 2.12 - Tabelle 2.18 aufgeführten Lösungen verwendet.

**Tabelle 2.12 Zusammensetzung des RIPA-Puffers**

<b>Substanz</b>	<b>Volumen</b>
1 M Tris, pH 7,4	2,5 mL
1 M NaCl	6,82 mL
Glycerol	5 mL
SDS-Lösung, 10%ig	500 µL
Triton x 100	5 mL
EDTA-Lösung, 50 mM	0,1 mL
Deoxycholat-Lösung, 2%ig	12,5 mL
Reinstwasser	ad 50 mL

**Tabelle 2.13 Zusammensetzung der Extraktionslösung**

<b>Substanz</b>	<b>Volumen</b>
RIPA-Puffer	20,475 mL
Protease-Inhibitor-Cocktail	105 µL
Vanadat	210 µL
Natriumfluorid-Lösung	210 µL

**Tabelle 2.14 Zusammensetzung des Trenngelpuffers (*Lower Tris*)**

<b>Substanz</b>	<b>Konzentration</b>
Tris	181,7 g/L
Die Einstellung des pH-Wertes auf 8,8 erfolgte mit 1 M HCl	

**Tabelle 2.15 Zusammensetzung des Sammelgelpuffers (*Upper Tris*)**

<b>Substanz</b>	<b>Konzentration</b>
Tris	60,55 g/L
Die Einstellung des pH-Wertes auf 6,8 erfolgte mit 1 M HCl	

**Tabelle 2.16 Zusammensetzung des SDS-Laufpuffers**

<b>Substanz</b>	<b>Konzentration</b>
Tris	30,2 g/L
Glycin	14,4 g/L
SDS	1 g/L

**Tabelle 2.17 Zusammensetzung des Transferpuffers**

<b>Substanz</b>	<b>Konzentration</b>
Tris	3,03 g/L
Glycin	14,4 g/L
Methanol	200 g/L

**Tabelle 2.18 Zusammensetzung der Tris-gepufferten Salzlösung (TBST-Puffer), 5fach konzentriert**

<b>Substanz</b>	<b>Konzentration</b>
Tris	30,2 g/L
NaCl	43,8 g/L
Tween	5 g/L
Die Einstellung des pH-Wertes auf 7,5 erfolgte mit 1 M HCl, der Laufpuffer wurde vor der Verwendung im Verhältnis 1:5 mit Reinstwasser verdünnt	

### 2.5.1 Proteinisolation

Zu ca. 150 mg Leberbiopat wurden 450 µL Extraktionslösung (Tabelle 2.13) gegeben. Die Proben wurden mit Hilfe einer Metallkugel im Tissue Lyser für 3 min bei 30 Hz homogenisiert. Nach einer 60-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Proben bei 14.000 U/min (18845 g) und 4 °C für 15 min zentrifugiert. Der proteinhaltige Überstand wurde in neue Cups überführt, aliquotiert und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

### 2.5.2 Bestimmung des Proteingehaltes

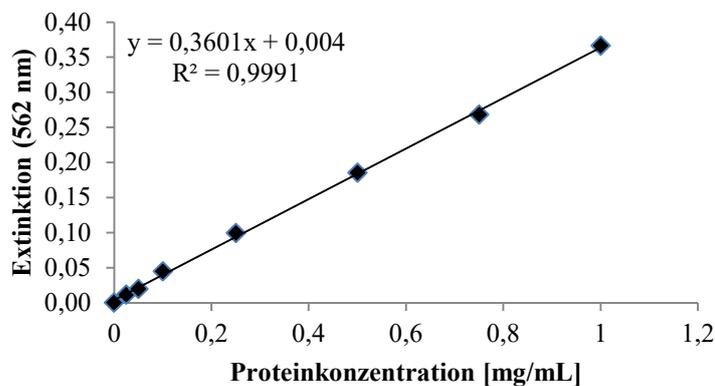
Die Bestimmung des Proteingehaltes der Isolate aus 2.5.1 erfolgte mittels des BCA Protein Quantitation Kits der Firma Interchim (Montluçon Cedex, Frankreich) nach Angaben des

Herstellers. Aus einer Stammlösung mit 20 mg Rinderserumalbumin (BSA) in 10 mL RIPA-Puffer (Tabelle 2.12) wurde zunächst eine Standardreihe erstellt (Tabelle 2.19). Die Proben wurden für die Proteinbestimmung im Verhältnis 1:200 mit RIPA Puffer verdünnt.

**Tabelle 2.19 Standardreihe zur Bestimmung des Proteingehaltes mittels BCA-Kit**

Konzentration [mg/mL]	BSA-Lösung (2 mg/mL) [ $\mu$ L]	RIPA-Puffer [ $\mu$ L]
1,0	500	500
0,75	375	625
0,5	250	750
0,25	125	875
0,1	50	950
0,05	25	975
0,025	12,5	987,5
0	0	1000

In eine 96-well Platte wurden in Doppelbestimmung je 25  $\mu$ L Probe/ Standard aufgetragen und anschließend 200  $\mu$ L BCA-Reagenzien-Mix (Lösung A/ Lösung B 50:1) zugegeben. Nach einer Inkubation der Platte bei 37 °C für 30 min wurde die Extinktion bei 492 nm am Plattenreader (Tecan) gemessen. Durch das Auftragen der Extinktionen der Standardlösungen gegenüber den Proteinkonzentrationen wurde eine Kalibriergerade erstellt (exemplarische Darstellung Abbildung 2.2), aus der unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors der Proteingehalt in den Proben errechnet wurde.



**Abbildung 2.2 Kalibriergerade zur Bestimmung des Proteingehaltes mittels BCA-Kit**

### 2.5.3 Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Proteine erfolgte mittels diskontinuierlicher SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach (Laemmli 1970). Unter Verwendung von Rotiphoresegel 40 (37, 5:1), einer 40%igen Acrylamid-Bisacrylamid-Stammlösung, wurden zunächst Gele hergestellt, deren Zusammensetzung in Tabelle 2.20 dargestellt ist.

Tabelle 2.20 Zusammensetzung der Gele

	<b>Sammelgel (6%ig)</b>	<b>Trenngel (12,5%ig)</b>	<b>Trenngel (7,5%ig)</b>
Reinstwasser	2,75 mL	5,35 mL	6,125 mL
Upper Tris pH 6,8	2,25 mL	-	3,125 mL
Lower Tris pH 8,8	-	3,13 mL	
Rotiphorese Gel 40	900 µL	7,81 mL	3,125 mL
SDS (10%)	60 µL	125 µL	125 µL
Ammoniumperoxodisulfat- Lösung (APS)	60 µL	125 µL	125 µL
TEMED	8 µL	5 µL	5 µL

Das Trenngel wurde nach dem Gießen mit Isopropanol überschichtet. Nach ca. 30 min Polymerisationszeit und dem Entfernen des Isopropanols wurde das Sammelgel gegossen.

Anhand der nach 2.5.2 ermittelten Proteingehalte wurde das benötigte Probenvolumen für eine Proteinladung von 50 µg pro Geltasche berechnet. Ein entsprechendes Volumen der Probe wurde mit RIPA-Puffer (Tabelle 2.12) auf ein Volumen von 24 µL ergänzt, mit 8 µL Probenauftragspuffer (Rotiload, Carl Roth, Karlsruhe) versetzt, gemischt und für 5 min im Thermoschüttler bei 95 °C denaturiert. Nach erneutem Mischen wurden 16 µL Probe pro Geltasche aufgetragen. Als Größenstandards dienten *PageRuler Prestained Protein Ladder* (10-250 kDa) oder *Spectra Multicolor High Range Protein Ladder* (43-315 kDa, Thermo Scientific, Rockford, USA), von denen 5 µL eingesetzt wurden.

Während sich die Probe im Sammelgel befand, wurde eine Stromstärke von 50 mA angelegt, nach dem Übergang in das Trenngel wurde die Stromstärke auf 80 mA erhöht.

#### 2.5.4 Western Blot

Die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden anschließend mittels Western Blot vom Gel auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Die Membran sowie das Blotpapier und die Fiber-Pads wurden zunächst in Transferpuffer (Tabelle 2.17) inkubiert. Der Blot erfolgte in einer mit Transferpuffer gefüllten Kammer (TransBlot<sup>®</sup>Cell, Biorad) bei 350 mA und 100 V für 90 min. Nach dem Blot wurde die Membran mit Ponceau S angefärbt und für die Bestimmung des Gesamtproteins als Ladekontrolle dokumentiert. Anschließend wurde die Membran mit TBST-Puffer (Tabelle 2.18) entfärbt und für 1 h in einer Blocking-Lösung (5% Milchpulver in TBST) auf dem Schüttler inkubiert. Nachdem der Blocking-Puffer entfernt wurde, wurde der primäre Antikörper (Tabelle 2.21) im Verhältnis 1:1000 mit 5% Milchpulver in TBST verdünnt und auf die Membran gegeben. Die Inkubation der Membran mit dem primären Antikörper (pAK) erfolgte über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler. Nach dem

Entfernen des pAKs wurde die Membran 3 Mal für 10 min mit TBST gewaschen. Anschließend wurde die Membran für 1,5 h mit einem Sekundärantikörper (anti-rabbit IgG konjugiert mit Peroxidase, Sigma-Aldrich, St. Luis, USA) behandelt. Nach drei weiteren Waschschrritten wurde die Membran mit einer Entwickler-Lösung (ECL Select Western Blotting Detection Reagent (Lösung A (Luminol) + Lösung B (Peroxid); 1:1), GE Healthcare, UK) für 5 min im Dunklen inkubiert. Die Membran wurde anschließend mittels des Geldokumentationssystems G:Box und der Software GenSnap V. 7.09 (SynGene, Cambridge, England) dokumentiert. Die Auswertung erfolgte mit der Software GeneTools MwLibrary V. 4.01 (SynGene). Die Konzentration des Zielproteins wurde in Bezug zum Gesamtproteingehalt gesetzt, um potenzielle Unterschiede in der Proteinladung auszugleichen.

**Tabelle 2.21 primäre Antikörper für den Western Blot**

Antikörper	Produktnummer/ Hersteller	Molekulargewicht Zielprotein [kDa]	Gelprozentigkeit Trenngel [%]
<i>anti-FASN</i>	#3181 Cell Signalling, Leiden (Niederlande)	273	7,5
<i>anti-CPT1A</i>	ARP44796_P050 Aviva Systems Biology San Diego (USA)	86	12,5

## 2.6 Bestimmung von Parametern des oxidativen Stresses

### 2.6.1 Trolox-äquivalente antioxidative Kapazität (TEAC)

Die Trolox-äquivalente antioxidative Kapazität (TEAC) ist definiert als die Trolox-Konzentration, die der antioxidativen Kapazität von 1,0 mmol/L der zu untersuchenden Substanz entspricht (Miller et al. 1993). Die Messung der TEAC erfolgte nach der Methode von (Re et al. 1999). Der Assay beruht auf einer Reaktion des 2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure (ABTS) - Radikalions mit antioxidativen Substanzen. Dabei erfolgt zunächst die Bildung des radikalen Kations ABTS<sup>•+</sup> aus ABTS in Gegenwart von Kaliumperoxodisulfat:



Die ABTS<sup>•+</sup>-Lösung weist eine blau-grüne Färbung auf, deren Absorption bei 734 nm bestimmt wird. Antioxidantien reduzieren das Radikalkation, was eine Abnahme der Absorption proportional zur Antioxidantienkonzentration der Probe zu Folge hat. Trolox, ein Vitamin E-Derivat, wird dabei als Standardsubstanz verwendet.

Die Lösungen zur Bestimmung von TEAC im Plasma sind in Tabelle 2.22 aufgeführt.

**Tabelle 2.22 Lösungen zur Bestimmung der TEAC von Plasma**

Lösung	Ansatz
ABTS-Stammlösung (14 mM)	76,82 mg ABTS ad 10 ml Reinstwasser
Kaliumperoxodisulfat-Lösung (4,9 mM)	132,45 mg Kaliumperoxodisulfat ad 100 ml Reinstwasser
Trolox-Stammlösung (1 mM)	25 mg Trolox und 25 ml Ethanol ad 100 ml Reinstwasser
ABTS <sup>•+</sup> - Lösung	ABTS-Stammlösung + Kaliumperoxodisulfat-Lösung im Verhältnis 1:1 mischen, Inkubation für 16 h im Dunklen, Verdünnung 1:90 mit Reinstwasser

Zur Erstellung einer Trolox-Standardreihe wurde die 1 mM Trolox-Stammlösung (Tabelle 2.22) gemäß Tabelle 3.24 in 10 mL Messkolben angesetzt und mit Reinstwasser/Ethanol (3:1, v:v) ad Marke aufgefüllt.

**Tabelle 2.23 Herstellung der Trolox-Standardreihe zur Bestimmung der TEAC**

Trolox-Konzentration [ $\mu\text{mol/L}$ ]	Volumen Trolox-Stammlösung [mL] ad 10 mL Reinstwasser/Ethanol (3:1, v:v)
750	7,5
500	5,0
250	2,5
100	1,0
50	0,5
0	0

10  $\mu\text{L}$  der im Verhältnis 1:10 mit Reinstwasser verdünnten Plasmaproben wurden in die Kavitäten einer Mikrotiterplatte pipettiert, mit 300  $\mu\text{L}$  ABTS<sup>•+</sup> - Lösung versetzt und gemischt. Proben und Standards wurden jeweils in Dreifachbestimmung aufgetragen. Nach einer Inkubationszeit von 6 Minuten wurde die Extinktion bei 734 nm am Mikroplattenleser (Tecan Infinite<sup>®</sup> M200) gemessen. Nach Auftragen der Extinktionen gegen die Konzentrationen der Trolox-Standards wurde mittels einfacher linearer Regression eine Geradengleichung ermittelt (Tabelle 2.23, Abbildung 2.3). Die TEAC wurde wie folgt berechnet (5):

$$TEAC [\mu\text{mol/L}] = (E_{\text{Probe}} - n) / m \cdot VF \tag{5}$$

$E_{\text{Probe}}$ : Extinktion der Probe,  $n$ : Achsenabschnitt,  $m$ : Steigung,  $VF$ : Verdünnungsfaktor der Probe (hier:10)

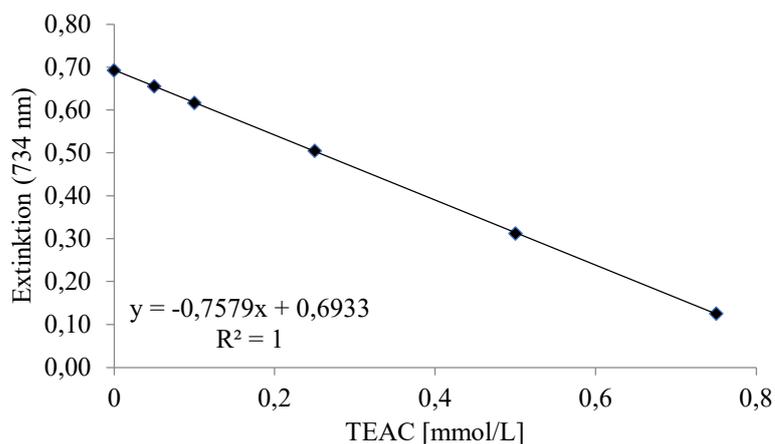


Abbildung 2.3 Kalibriergerade zur Bestimmung der TEAC

### 2.6.2 Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen (TBARS)

Die Bestimmung von Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen (TBARS) ist eine verbreitete Methode zum Nachweis der Peroxidation von ungesättigten Fettsäuren und Lipiden (Nair und Turner 1984). Die Lipidperoxidation tritt im Zusammenhang mit oxidativem Stress auf; daher sind TBARS ein weiterer Indikator zur Beurteilung der antioxidativen Kapazität. Der nach einer Modifizierung der Methode von (Sidwell et al. 1954) durchgeführte Assay basiert auf der Reaktion von zwei Molekülen Thiobarbitursäure (TBA) mit Aldehyden wie Malondialdehyd, einem Hauptprodukt der Lipidperoxidation (Abbildung 2.4) (Botsoglou et al. 1994). Die Fluoreszenz des gebildeten Reaktionsproduktes kann nach Anregung spektroskopisch erfasst werden.

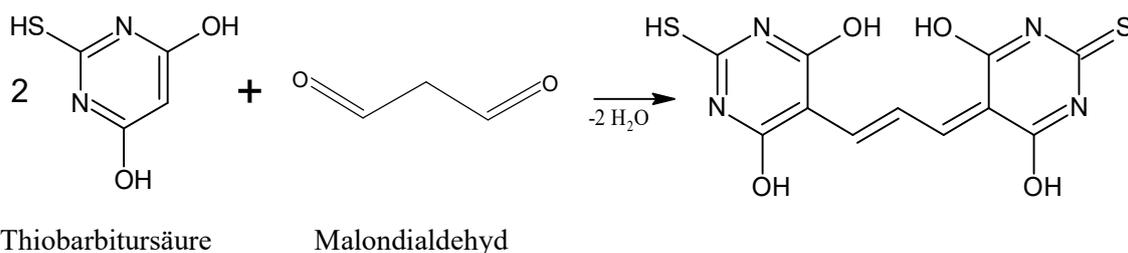


Abbildung 2.4 Reaktion von Thiobarbitursäure mit Malondialdehyd (nach (Valenzuela 1990))

Die benötigten Lösungen für die Bestimmung der TBARS sind in Tabelle 2.24 aufgeführt. Aus der TEP-Stammlösung B (Tabelle 2.24) wurde eine Verdünnungsreihe gemäß Tabelle 2.25 hergestellt.

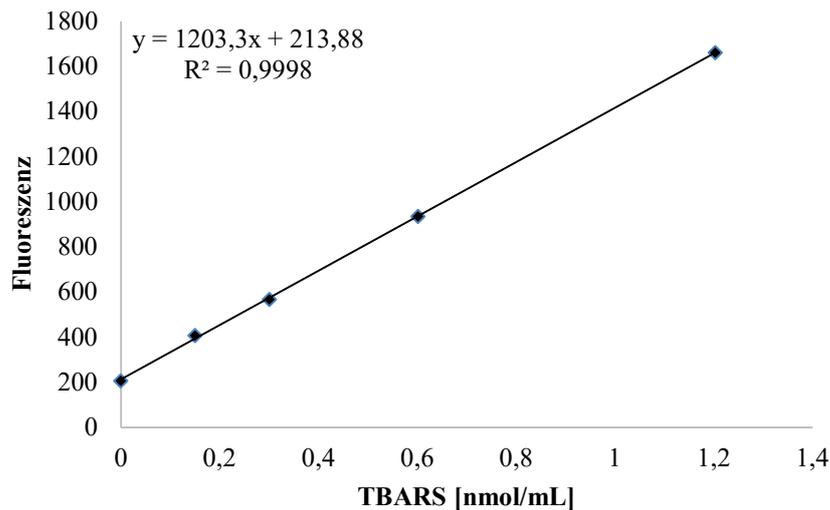
**Tabelle 2.24 Lösungen zur Bestimmung der Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen**

Lösung	Ansatz
TBA-Reagenz 0,6%	0,6 g Thiobarbitursäure ad 100 ml bidest. Wasser
Ethanol-Wasser (1:2,4, v:v)	420 ml Ethanol (99,8%) ad 1000 ml bidest. Wasser
Tetraethoxypropan (TEP)-Standard (Stammlösung A)	50 µl TEP in 25 ml Ethanol-H <sub>2</sub> O-Gemisch
TEP-Standard (Stammlösung B)	300 µl Stammlösung A + 20 ml Ethanol-H <sub>2</sub> O-Gemisch
0,44 M <i>ortho</i> -Phosphorsäure	10 ml <i>ortho</i> -Phosphorsäure (85%) ad 1000 ml mit bidest. Wasser auffüllen
Methanolische NaOH	9 ml 1 mol/L NaOH ad 100 ml mit Methanol auffüllen

**Tabelle 2.25 Herstellung der Tetraethoxypropan (TEP) - Standardreihe zur Bestimmung der TBARS**

Konzentration TEP [nmol/mL]	Volumen Stammlösung B [µL] ad 10 mL Ethanol/Wasser (1:2,4, v:v)
0,15	12,5
0,30	25
0,60	50
1,20	100
2,41	200
4,81	400

50 µL Plasma, Standardlösung oder Ethanol/ Wasser (1/2,4) als Blindwert wurden mit 375 µL 0,44 M *ortho*-Phosphorsäure, 200 µL Reinstwasser und 125 µL TBA-Reagenz (0,6%) versetzt, geschüttelt und für 60 min im Wasserbad bei 100 °C erhitzt. Anschließend wurden die Proben sofort in Eiswasser abgekühlt. Nach Zugabe von 750 µL methanolischer Natronlauge wurden die Proben erneut geschüttelt und bei 10 °C und 4000 U/min (1538 g) für 10 min zentrifugiert. Anschließend wurden 300 µL des Überstandes in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte pipettiert und mit einer Anregungswellenlänge von 532 nm bei einer Emissionswellenlänge von 560 nm gemessen. Die Messung der Proben und Standards erfolgte in Dreifachbestimmung. Durch Auftragen der Fluoreszenz gegenüber den TEP-Konzentrationen der Standards wurde eine Kalibrierreihe erstellt. Nach linearer Regression wurde die resultierende Geradengleichung zur Berechnung der Konzentration der TBARS in der Probe verwendet.



**Abbildung 2.5** Kalibriergerade zur Bestimmung der TBARS

### 2.6.3 Bestimmung von Proteincarbonylen im Plasma

In Folge des oxidativen Stresses kommt es zu einer Oxidation von Proteinen durch radikale Sauerstoffspezies. Die dabei entstehenden Carbonyle können als Indikator für die Protein-oxidation erfasst werden (Luo und Wehr 2009). Der Nachweis von Proteincarbonylen im Plasma erfolgte nach einer modifizierten Methode basierend auf dem Assay von (Levine et al. 1990). Diesem Assay liegt die Derivatisierung der Carbonyle mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin (DNPH) zu Dinitrophenylhydrazon-Addukten zugrunde, deren Extinktion proportional zum Carbonylgehalt in der Probe ist. Die zur Bestimmung der Proteincarbonyle angesetzten Lösungen sind in Tabelle 2.26 aufgeführt.

**Tabelle 2.26** Lösungen zur Bestimmung von Proteincarbonylen

Lösung	Ansatz
Salzsäure, 2,5 M	64,24 mL 37%ige HCL, Reinstwasser ad 300 mL
Salzsäure, 2 M	85,65 mL 37%ige HCL, Reinstwasser ad 500 mL
Trichloressigsäure, 10%ig	30 g TCA, Reinstwasser ad 300 mL
Trichloressigsäure, 20%ig	60 g TCA, Reinstwasser ad 300 mL
Guanidinhydrochlorid-Lösung, 6 M	86,98 g, 2 M Salzsäure ad 150 mL
2,4-Dinitrophenylhydrazin-Lsg, 10 mM	0,4 g, 2,5 M Salzsäure ad 200 mL

Zur Bestimmung der Proteincarbonyle wurden zunächst 50  $\mu\text{L}$  Plasma mit 150  $\mu\text{L}$  Reinstwasser verdünnt. Nach Zugabe von 400  $\mu\text{L}$  einer 10 mM 2,4-Dinitrophenylhydrazin (DNPH)-Lösung in 2,5 M Salzsäure wurden die Proben für 1 h bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Der Blindwert wurde analog aufgearbeitet, anstelle der DNPH-Lösung wurde dem verdünnten Plasma jedoch 400  $\mu\text{L}$  2,5 M Salzsäure zugegeben. Anschließend erfolgte zur Fällung der Proteine eine Zugabe von 1 mL 20%iger Trichloressigsäure und eine 10-minütige Inkubation der Proben auf Eis. Die Proben wurden bei 10.000 g und 4 °C für 10 min zentrifugiert und der Überstand entfernt. Das gefällte Proteinpellet wurde in 1 mL 10%iger Trichloressigsäure resuspendiert, danach erneut bei 10.000 g und 4 °C für 10 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Um überschüssiges DNPH zu entfernen, wurde das Pellet noch dreimal in 1 mL Ethanol/Ethylacetat (1/1) gewaschen. Dazu wurde das Pellet bei jedem Waschschrift zunächst mittels Vortexer resuspendiert und anschließend bei 10.000 g und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Anschließend wurde das Proteinpellet mit 0,5 mL einer 6 M Guanidinhydrochlorid-Lösung in 2 M Salzsäure versetzt und mittels Thermoblock bei 37 °C und 900 rpm innerhalb von 15 min gelöst. Je 100  $\mu\text{L}$  Probe wurden in die Vertiefungen einer 96-Well-Platte pipettiert und die Extinktion bei 375 nm am Mikroplattenreader (Tecan) gemessen.

Um Proteinverluste während der Waschvorgänge zu berücksichtigen, wurde zusätzlich der Proteingehalt in den aufgearbeiteten Proben bestimmt. Diese Bestimmung erfolgte wie in 2.5.2 beschrieben. Die Proben wurden für die Bestimmung im Verhältnis 1:50 mit Reinstwasser verdünnt. Die Standards wurden analog zu den Proben in Guanidin-HCl Lösung/ Reinstwasser (1:50) angesetzt.

### **2.6.4 Bestimmung von Vitaminen mittels HPLC**

#### **2.6.4.1 Probenaufarbeitung**

Zur Bestimmung von Retinol,  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Tocopherol und  $\beta$ -Carotin im Plasma wurden die Proben zunächst nach einer Modifizierung der Methode von (Balz et al. 1993) aufgearbeitet. Dazu wurden je 200  $\mu\text{L}$  Plasma und 1 mL Ethanol mit 1% Benzol-1,2,3-triol sowie 150  $\mu\text{L}$  einer gesättigten Natronlauge in ein Reagenzglas gegeben, mit einem Stopfen verschlossen und gut gemischt. Anschließend wurden die Proben bei 70 °C im Thermoblock für 30 min verseift. 2 mL Hexan mit 0,05% 2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-methylphenol (BHT) sowie 1 mL Reinstwasser wurden nach dem Abkühlen der Proben zugegeben. Die Proben wurden gemischt und bei 3500 U/min (1178 g) und 10 °C für 5 min zentrifugiert. Nach Äquilibration bei Raumtemperatur wurden 600  $\mu\text{L}$  der Hexanphase für die Bestimmung von Retinol,  $\alpha$ - und  $\gamma$ -

Tocopherol und 300 µL für die Bestimmung von β-Carotin abgenommen, mit Stickstoff begast und bis zur Messung bei -80 °C gelagert.

#### 2.6.4.2 Bestimmung von Retinol, α- und γ-Tocopherol

Der Hexanüberstand aus 2.6.4.1 wurde langsam im Dunklen aufgetaut, gemischt und im Probenkonzentrator unter Stickstoffatmosphäre bei 40 °C eingedampft. Der Rückstand wurde anschließend in 0,2 µL Methanol mit 0,05% BHT aufgenommen und in ein HPLC-Vial überführt. Die Parameter der HPLC-Messung sind in Tabelle 2.27 dargestellt. Die Quantifizierung der Retinol-, sowie der α- und γ-Tocopherol-Konzentrationen im Plasma erfolgte anhand einer Standardreihe. Die Konzentrationen der verwendeten Standardlösungen sind in Tabelle 2.28 aufgeführt. Durch Auftragen der Peakflächen gegenüber der Konzentration der Standardlösungen wurden Kalibriergeraden ermittelt (Abbildung 2.6), aus denen die Konzentration der Vitamine im Plasma wie folgt berechnet wurde (6):

$$c \text{ Vitamin } [\mu\text{g/mL}] = (A_{\text{Probe}} - n) / (m \cdot V_{\text{Probe}}) \quad (6)$$

mit  $A_{\text{Probe}}$  = Peakfläche der Probe,  $n$  = Achsenabschnitt,  $m$  = Steigung,  $V_{\text{Probe}}$  = eingesetztes Volumen an Plasma (0,2)

**Tabelle 2.27 HPLC-Parameter zur Bestimmung von Retinol, α- und γ-Tocopherol**

Parameter	Typ/ Einstellung
Säulenofen	L7360 LaChrom (Merck/Hitachi)
Pumpe	HPLC-Pumpe LaChrom L-7100 (Merck/Hitachi)
Detektor	LaChrom Fluoreszenz Detektor L-7485 (Merck/Hitachi)
Detektoreinstellungen	Vitamin A = EM 475 nm; EX 325 nm Vitamin E = EM 325 nm; EX 295 nm
Software	EZChrom Elite Version 3.3.1
Säule	Luna 5u C18(2); 150· 4,6 mm (Phenomenex, Aschaffenburg)
Vorsäule	LiChroCART 4-4 RP 18 (Merck)
Injektionsvolumen	50 µl
Fließmittel	MeOH / H <sub>2</sub> O (98:2, v:v)
Flussrate	1,5 ml/min
Druck	96 bar
Säulenofen Temperatur	40 °C
Laufzeit	7,6 min

**Tabelle 2.28 Konzentrationen der Standards zur Bestimmung von Vitamin E und A**

Standard	Konzentration [µg/mL]						
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7
α-Tocopherol	0,052	0,131	0,261	0,523	0,784	1,568	2,090
γ-Tocopherol	0,008	0,021	0,042	0,083	0,125	0,250	0,333
Retinol	0,008	0,019	0,038	0,076	0,114	0,229	0,305

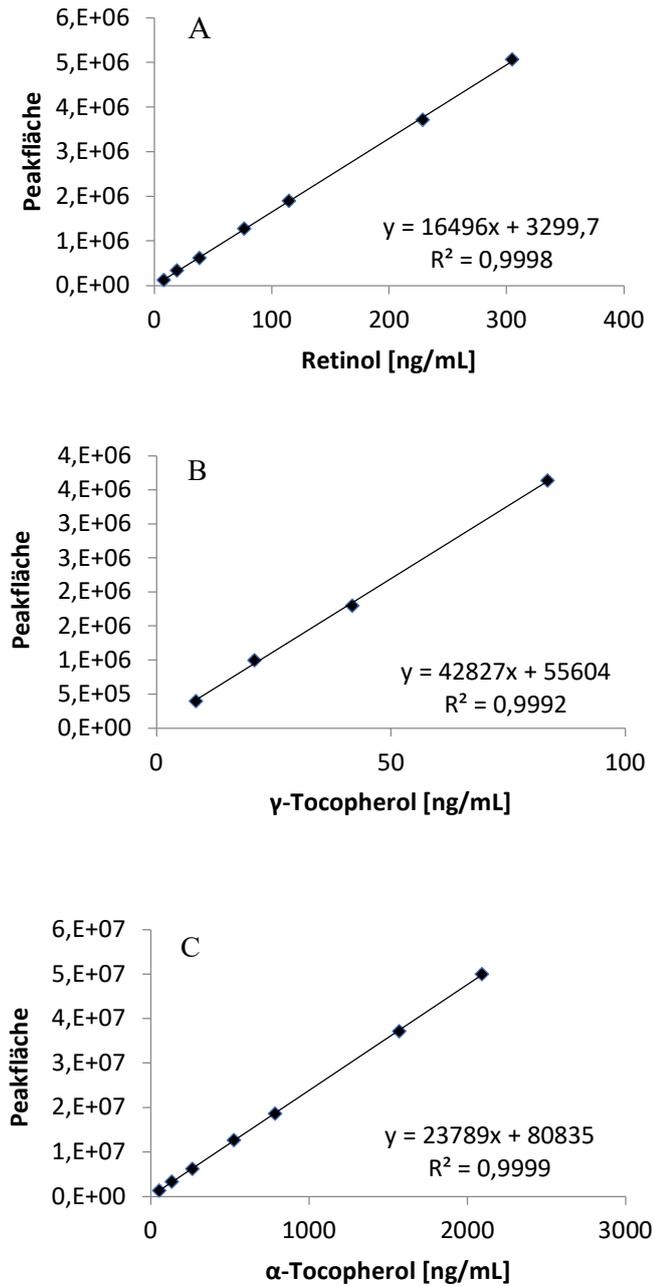


Abbildung 2.6 Kalibriergerade zur Bestimmung von Retinol (A),  $\gamma$ -Tocopherol (B) und  $\alpha$ -Tocopherol (C)

#### 2.6.4.3 Bestimmung von $\beta$ -Carotin

Für die Bestimmung von  $\beta$ -Carotin wurde der Hexanüberstand aus 2.6.4.1 aufgetaut und direkt zur Messung mittels HPLC eingesetzt. Die Parameter der HPLC-Messung sind in Tabelle 2.29 aufgeführt.

**Tabelle 2.29 HPLC-Parameter zur Bestimmung von  $\beta$ -Carotin**

Parameter	Typ/ Einstellung
Säulenofen	Jetstream 2 Plus (Merck/ Hitachi)
Pumpe	L – 2130 (Merck/ Hitachi)
Detektor	UV-VIS-Detektor L-2420 (LaChrom Elite) (Merck/ Hitachi)
Detektoreinstellungen	Wellenlänge: 455 nm
Software	EZChrom Elite Version 3.3.1
Säule	LiChroCART DIOL 125-4 (Merck)
Vorsäule	LiChroCART DIOL 4-4 (Merck)
Injektionsvolumen	25 $\mu$ l
Fließmittel	Hexan/Isopropanol (90:10, v:v)
Flussrate	1 ml/min
Druck	23 bar
Säulenofen Temperatur	Raumtemperatur
Laufzeit	6 min

Aus einer  $\beta$ -Carotin-Stammlösung ( $c = 4,5$  mg/mL) in Hexan mit 0,05% (BHT) wurde durch Verdünnung mit Hexan + 0,05% BHT eine Standardreihe hergestellt. Die Konzentrationen der einzelnen Standards sind in Tabelle 2.30 dargestellt.

**Tabelle 2.30: Konzentrationen der Standards zur Bestimmung von  $\beta$ -Carotin**

Standard	Konzentration [ $\mu$ g/mL]				
	S1	S2	S3	S4	S5
$\beta$ -Carotin	0,224	0,560	1,120	2,240	4,480

Durch Auftragen der Peakflächen gegenüber den Konzentrationen der Standardlösungen wurde mittels linearer Regression eine Geradengleichung ermittelt, aus der die Konzentration an  $\beta$ -Carotin in den Proben wie folgt berechnet wurde (7):

$$c_{\text{Vitamin}} [\mu\text{g/mL}] = (A_{\text{Probe}} - n) / (m \cdot V_{\text{Probe}}) \cdot VF \quad (7)$$

mit  $A_{\text{Probe}}$  = Peakfläche der Probe,  $n$  = Achsenabschnitt,  $m$  = Steigung,  $V_{\text{Probe}}$  = eingesetztes Volumen an Plasma (0,2),  $VF$  = Verdünnungsfaktor (2)

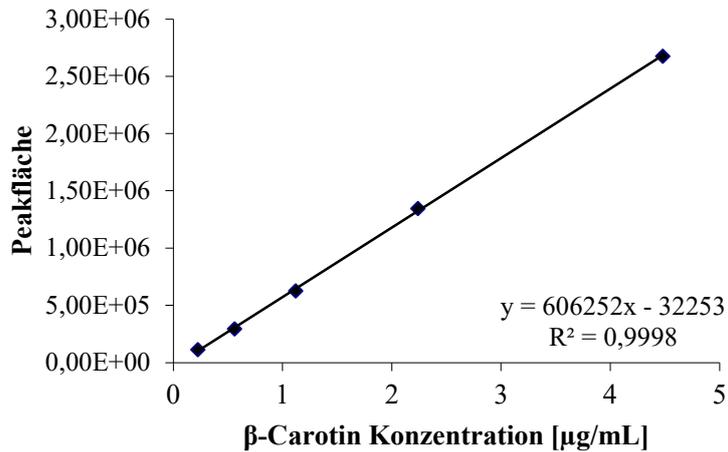
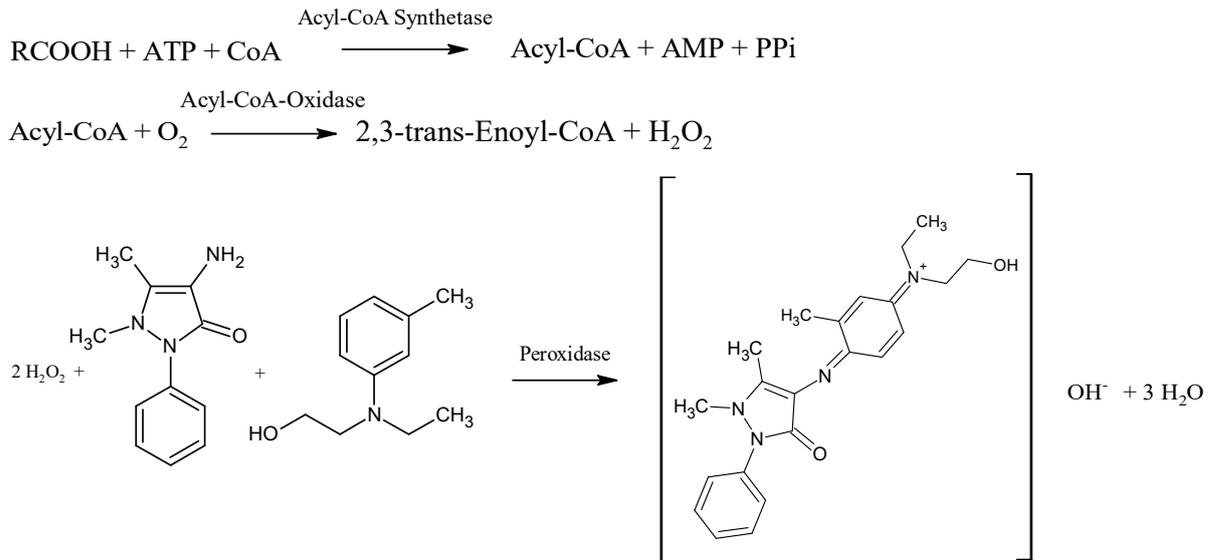


Abbildung 2.7 Kalibriergerade zur Bestimmung der  $\beta$ -Carotin-Konzentration

## 2.7 Bestimmung von Parametern des Fettstoffwechsels

### 2.7.1 Nicht-veresterte, freie Fettsäuren (NEFA)

Die Konzentration an freien Fettsäuren im Plasma wurde unter der Verwendung des NEFA-HR(2) Kits von Wako Chemicals enzymatisch bestimmt. Die freien FS wurden dabei zunächst mittels Acyl-CoA Synthetase in Anwesenheit von Adenosin-5-Triphosphat (ATP) und Coenzym A zu Acyl-CoA, AMP und Phosphorsäure umgesetzt (Abbildung 2.8). Anschließend katalysiert das Enzym Acyl-CoA-Oxidase (ACO) die Reaktion von Acyl-CoA zu 2,3-trans-Enoyl-CoA, wobei Wasserstoffperoxid entsteht. Peroxidase und Wasserstoffperoxid bewirken eine Kupplung von 3-Methyl-N-Ethyl-N-( $\beta$ -Hydroxyethyl)-Anilin und 4-Aminoantipyrin zu einem blau-violetten Farbstoff, dessen Extinktion bei 546 nm bestimmt werden kann. Die Bildung dieses Farbkomplexes ist proportional zur Konzentration an freien Fettsäuren in der Probe.



**Abbildung 2.8** Prinzip der enzymatischen Bestimmung von freien Fettsäuren

Die Durchführung des Assays erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Als Standard wurde der NEFA-Standard der Firma Wako Chemicals (1 mM Ölsäure) verwendet. Aus dieser Stammlösung wurde eine Verdünnungsreihen gemäß Tabelle 2.31 hergestellt.

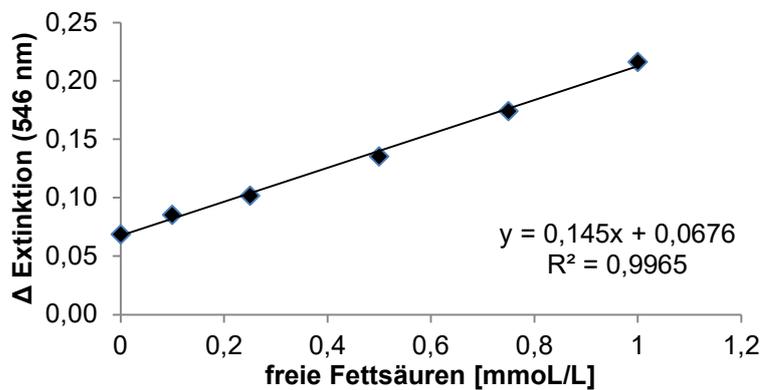
**Tabelle 2.31** Standardreihe zur Bestimmung von NEFA im Plasma

Konzentration [mmol/L]	Stammlösung 1 mmol/L [µL]	Reinstwasser [µL]
0	0	100
0,10	10	90
0,25	25	75
0,50	50	50
0,75	75	25
1,00	100	0

Je 7 µL Probe oder Standard wurden in die Vertiefungen einer 96-well Platte pipettiert und anschließend 300 µL Arbeitsreagenz 1 (Tabelle 2.32) hinzugefügt. Die Platte wurde für 2,5 min bei 37 °C inkubiert und die Extinktion als Probenleerwert (E1) bei 546 nm als Haupt- und 660 nm als Referenzwellenlänge gemessen. Danach erfolgte die Zugabe von 150 µL Arbeitsreagenz 2 (Tabelle 2.32). Nach einer Inkubation von weiteren 4,5 min bei 37 °C wurde die Extinktion erneut bei 546 und 660 nm gemessen (E2). Die Auswertung erfolgte anhand der Kalibriergeraden (Abbildung 2.9).

**Tabelle 2.32 Zusammensetzung der Arbeitsreagenzien zur Bestimmung von NEFA (NEFA-HR(2) Kit, Wako Chemicals)**

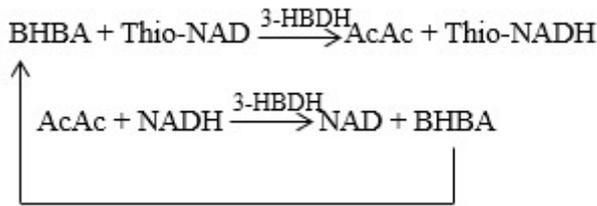
Reagenz 1	Reagenz 2
Acyl-CoA-Synthetase 0,53 U/mL	Acyl-CoA-Oxidase 12 U/mL
Coenzym A 0,31 mmol/L	Peroxidase 14 U/mL
Adenosintriphosphat 4,3 mmol/L	3-Methyl-N-Ethyl-N-(β-Hydroxyethyl)-Anilin
4-Aminoantipyrin 1,5 mmol/L	2,4 mmol/L
AOD 2,6 U/mL	
Natriumazid 0,062 %	
Phosphat-Puffer, pH 7,0; 50 mmol/L	



**Abbildung 2.9 Kalibriergerade zur Bestimmung von freien Fettsäuren im Plasma**

### 2.7.2 3-Hydroxybutansäure (BHBA)

Die Bestimmung von 3-Hydroxybutansäure (BHBA) in den Plasmaproben erfolgte enzymatisch mittels des kommerziell erhältlichen Autokits 3-HB der Firma Wako Diagnostics. In der Probe vorhandenes Acetoacetat (AcAc) wird dabei zunächst durch die Acetoacetat-Decarboxylase zu Aceton abgebaut, sodass bei dem nachfolgenden Assay ausschließlich BHBA erfasst wird. In einem zweiten Schritt wird BHBA durch das Enzym 3-Hydroxybutyrat Dehydrogenase in Gegenwart von  $\beta$ -Thionicotinamidadenindinucleotid (Thio-NAD) zu AcAc oxidiert. Eine zyklische Reaktion wird induziert, indem das entstandene Acetoacetat durch die 3-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase (3-HBDH) wieder zu BHBA umgesetzt wird (Abbildung 2.10). Die Produktionsrate des bei der Oxidation von BHBA entstehenden Thio-NADHs wird photometrisch erfasst und ist proportional zu der BHBA Konzentration in der Probe.



**Abbildung 2.10 Prinzip der enzymatischen Bestimmung von BHBA**

Die Durchführung des Assays erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Die Plasmaproben wurden zunächst im Verhältnis 1:3 mit 0,9%iger NaCl-Lösung verdünnt. Je 4 µL Probe wurden in die Vertiefungen einer 48-Well Platte pipettiert, 270 µL Reagenz 1 (Tabelle 2.34) hinzugefügt und für 5 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 90 µL Reagenz 2 (Tabelle 2.34) pro Vertiefung hinzu pipettiert, geschüttelt und erneut für 2 min bei 37 °C inkubiert. Über einen Zeitraum von 10 min wurde die Extinktion des entstehenden Thio-NADH alle 30 s bei 405 nm gemessen. Zur Quantifizierung wurde eine Standardreihe aus einer Stammlösung mit einer Konzentration von 0,3 mmol/L BHBA (Ketone Body Calibrator 300, Wako Diagnostics) hergestellt (Tabelle 2.34). Durch Auftragen der Extinktionsänderung pro Minute gegen die BHBA- Konzentrationen der Standards und linearer Regression wurde eine Geradengleichung ermittelt (Abbildung 2.11), aus der unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors die BHBA-Konzentration der Proben berechnet wurde.

**Tabelle 2.33 Pipettierschema zur Erstellung einer Kalibriergeraden zur Messung von BHBA**

Konzentration [mmol/L]	BHBA-Stammlösung [µL] (0,3 mmol/L)	0,9% NaCl [µL]
0	0	60
0,05	10	50
0,10	10	20
0,15	20	20
0,20	20	10
0,30	60	0

**Tabelle 2.34 Zusammensetzung der Arbeitsreagenzien zur Bestimmung von NEFA (NEFA-HR(2) Kit, Wako Chemicals)**

Reagenz 1	Reagenz 2
β- Thionicotinamadenindinucleotid, oxidiert (Thio-NAD) 4,27 mmol/L	3-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase 3200 IU/mL
Phosphat-Puffer, pH 7,0, 20 mmol/L	NADH 2,65 mmol/L
Acetoacetatdecarboxylase 5 IU/mL	Goods Puffer, pH 9,0, 0,2 mol/L
Natriumazit 0,018%	Natriumazit 0,053%

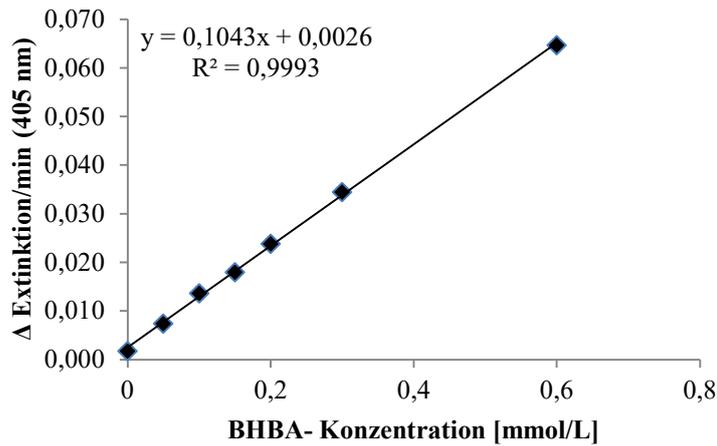


Abbildung 2.11 Kalibriergerade zur Bestimmung von BHBA im Plasma

### 2.7.3 Bestimmung der Triglycerid-Konzentration in Plasma und Leber

Die Bestimmung von Triglyceriden im Plasma und in der Leber erfolgte mit dem kommerziell erhältlichen Kit Fluidtest Triglyceride (Analyticon) nach den Angaben des Herstellers. Das Testprinzip des Assays beruht auf einer Methode von (Wahlefeld 1969), nach der die Triglyceride in einer Probe zunächst durch eine mikrobielle Lipoproteinlipase hydrolysiert werden. Das entstandene Glycerol wird in Gegenwart von ATP mittels Glycerol-Kinase zu Glycerol-3-phosphat umgesetzt, welches durch die Glycerol-3-Phosphat-Oxidase weiter zu Dihydroxyacetonphosphat und Wasserstoffperoxid oxidiert wird (Abbildung 2.12). Das entstandene Wasserstoffperoxid bildet mit 4-Aminophenazon und 4-Chlorphenol in einer durch Peroxidase katalysierten Reaktion einen roten Farbstoff, dessen Extinktion photometrisch bei 500 nm bestimmt wird.

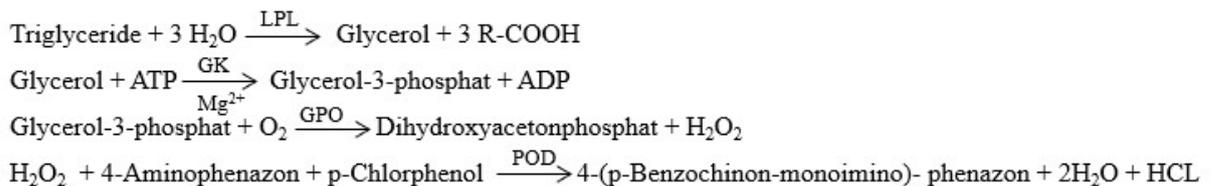


Abbildung 2.12 Prinzip der Bestimmung von Triglyceriden in Plasma und Leber (nach Wahlefeld 1969)

LPL = Lipoproteinlipase, GK = Glycerolkinase, GPO = Glycerol-3-phosphat-oxidase, POD = Peroxidase

### 2.7.3.1 Bestimmung der Triglycerid-Konzentration im Plasma

Für die Bestimmung der Triglyceride im Plasma wurden 60 µL Probe bzw. 10 µL Standard mit 500 µL Reagenz 1 (Tabelle 2.35) versetzt und für 5 min bei 37 °C inkubiert. Als Blindwert wurden 60 µL Reinstwasser anstelle der Probe eingesetzt. Anschließend wurde die Extinktion am Photometer bei 500 nm gemessen. Die Auswertung erfolgte mittels Einpunktkalibrierung. Als Standard diente eine Glycerol-Lösung mit einer Konzentration, die 200 mg/dL (2,28 mmol/L) Triglyceriden entspricht (R4, Fluidtest Triglycerides; Analyticon). Die Konzentration an Triglyceriden im Plasma wurde nach Gleichung 8 berechnet:

$$c \text{ TG [mg/dL Plasma]} = \frac{\Delta E_{\text{Probe}} \cdot V_{\text{Standard}}}{\Delta E_{\text{Standard}} \cdot V_{\text{Probe}}} \cdot c_{\text{Standard}} \quad (8)$$

mit  $c \text{ TG}$  = Triglyceridkonzentration im Plasma,  $c \text{ Standard}$  = Konzentration des Standards (200 mg/dL),  $V_{\text{Probe}}$  = Volumen an eingesetztem Plasma [µL],  $V_{\text{Standard}}$  = Volumen an Standardlösung [µL],  $\Delta E_{\text{Probe}}$  = Extinktion der Probe – Extinktion des Blindwertes,  $\Delta E_{\text{Standard}}$  = Extinktion des Standards – Extinktion des Blindwertes

**Tabelle 2.35 Zusammensetzung des Reagenz 1 (Fluitest® Triglyceride, Analyticon)**

Komponente	Konzentration
Piperazin-1,4-bis-2-ethansulfonsäure (PIPES) Puffer, pH 7,8	50 mmol/L
p-Chlorophenol	2 mmol/L
Lipoproteinlipase	150000 U/L
Glycerolkinase	800 U/L
Glycerol-3-P-oxidase	4000 U/L
Peroxidase	440 U/L
4-Aminoantipyrin	0,7 mmol/L
ATP	0,3 mmol/L
Mg <sup>2+</sup>	40 mmol/L
Na-Cholat	0,20 mmol/L
Kalium-Hexacyanoferrat(II)	1 µmol/L

### 2.7.3.2 Bestimmung der Triglycerid-Konzentration in der Leber

Zur Bestimmung der Triglycerid-Konzentration in der Leber wurden ca. 0,075 g Leber mit 1,5 mL n-Hexan/Isopropanol (3:2, v:v) und einer Metallkugel versetzt und im TissueLyser für 3 min bei 30 Hz homogenisiert. Anschließend wurden die Proben über Nacht (18 h) im Dunklen unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Proben wurden für 10 min bei 1900 g und 15 °C zentrifugiert und der Überstand in ein neues Cup überführt. 70 µL des Extraktes wurde im Stickstoffverdampfer bei 37 °C für ca. 8 min eingedampft. Der Rückstand wurde in 25 µL TritonX/Chloroform (1:1, v:v) aufgenommen. Parallel zu den Proben wurden Standards (10 µL R4, Fluidtest Triglycerides; Analyticon) und Blindwert (10 µL n-Hexan/Isopropanol (3:2, v:v)) eingedampft und während der weiteren Aufarbeitung mitgeführt. Zur Entfernung des Chloroforms wurden die offenen Cups im Abzug über Nacht inkubiert und am nächsten Tag

zur vollständigen Entfernung der Lösungsmittelreste für 1 h bei 45 °C in den Zentrifugalverdampfer gestellt. Nach der Zugabe von 500 µL Reagenz 1 (Tabelle 2.35) wurden die Proben mittels Vortexer gemischt und im Thermoblock für 15 min bei 37 °C inkubiert. Die Extinktionsmessung am Photometer erfolgte anschließend bei 500 nm. Die Konzentration an Triglyceriden in der Leber wurde nach Gleichung 9 berechnet.

$$c \text{ [mg/g Leber] } = \frac{\Delta E_{\text{Probe}} \cdot n_{\text{Standard}} \cdot V_{\text{Hexan/Isopropanol}}}{\Delta E_{\text{Standard}} \cdot G_{\text{Probe}} \cdot v_{\text{Probe}}} \quad (9)$$

mit  $c$  = Triglyceridkonzentration,  $n_{\text{Standard}}$  = absolute Stoffmenge an TG in der Standardaufarbeitung (20 µg),  $V_{\text{Hexan/Isopropanol}}$  = Gesamtvolumen der Extraktionslösung [µL] (1500 µL),  $v_{\text{Probe}}$  = Volumen des eingesetzten Probenextraktes [µL],  $\Delta E_{\text{Probe}}$  = Extinktion der Probe – Extinktion des Blindwertes,  $\Delta E_{\text{Standard}}$  = Extinktion des Standards – Extinktion des Blindwertes,  $G_{\text{Probe}}$  = Lebereinwaage [mg]

#### 2.7.4 Bestimmung von Cholesterol in Plasma und Leber

Die Bestimmung von Cholesterol in Plasma und Leber wurde enzymatisch mittels des kommerziell erhältlichen Kits Fluitest® CHOL von Analyticon durchgeführt. In der Probe vorhandene Cholesterolester werden zunächst durch die Cholesterolesterase (CE) gespalten. Das freigesetzte Cholesterol wird anschließend mittels Cholesteroloxidase (CO) in Gegenwart von Sauerstoff zu 4-Cholesten-3-on umgewandelt (Abbildung 2.13). Das bei dieser Reaktion entstehende Wasserstoffperoxid wird in einer von der Peroxidase (POD) katalysierten Reaktion mit 4-Aminoantipyrin und Phenol zu Chinonimin, einem roten Farbstoff, umgesetzt. Die Extinktion dieses Farbstoffes ist proportional zur Cholesterol-Konzentration in der Probe und kann bei 500 nm am Photometer gemessen werden.

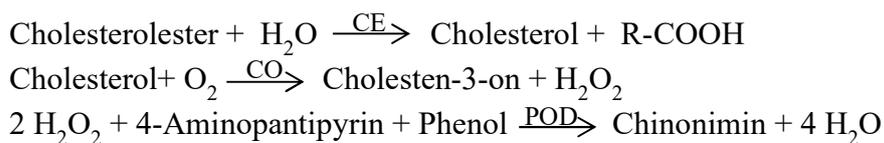


Abbildung 2.13 Prinzip der Bestimmung von Cholesterol in Plasma und Leber

##### 2.7.4.1 Bestimmung der Cholesterol-Konzentration im Plasma

Für die Bestimmung von Cholesterol im Plasma wurden 10 µL Probe mit 500 µL Reagenz 1 (Tabelle 2.36) versetzt und für 5 min bei 37 °C inkubiert. Für den Blindwert wurden 10 µL Reinstwasser anstelle der Probe eingesetzt. Als Standard für eine Einpunktkalibrierung wurden 10 µL einer Lösung mit 200 mg/dL (5,17mmol/L) Cholesterol (R4 Kit Fluitest® CHOL, Analyticon) verwendet. Die Extinktion wurde am Photometer bei 500 nm gemessen. Die Konzentration an Cholesterol im Plasma wurde nach Gleichung 10 berechnet.

$$c \text{ Cholesterol [mg/dL Plasma]} = \frac{\Delta E_{\text{Probe}}}{\Delta E_{\text{Standard}}} \cdot c_{\text{Standard}} \quad (10)$$

mit  $c$  Cholesterol = Cholesterolkonzentration im Plasma,  $c$  Standard = Konzentration des Standards (200 mg/dL),  $\Delta E_{\text{Probe}}$  = Extinktion der Probe – Extinktion des Blindwertes,  $\Delta E_{\text{Standard}}$  = Extinktion des Standards – Extinktion des Blindwertes

**Tabelle 2.36 Zusammensetzung des Reagenz 1 (Fluitest® CHOL, Analyticon)**

Komponente	Konzentration
Piperazin-1,4-bis-2-ethansulfonsäure (PIPES) Puffer, pH 6,9	90 mmol/L
Phenol	26 mmol/L
Cholesteroxidase	200 U/L
Cholesterolesterase	300 U/L
Peroxidase	1250 U/L
4-Aminoantipyrin	0,4 mmol/L

#### 2.7.4.2 Bestimmung der Cholesterol-Konzentration in der Leber

Zur Bestimmung von Cholesterol in der Leber wurden die Lipidextrakte aus 2.7.3.2 verwendet. 70  $\mu$ L des n-Hexan/Isopropanol-Überstandes wurden in ein separates Cup für die Cholesterolbestimmung überführt und analog zu 2.7.3.2 aufgearbeitet. Für den Standard wurden 10  $\mu$ L Cholesterol (R4  $c$ = 200 mg/dL Kit Fluitest® CHOL, Analyticon) eingesetzt. Nach der Entfernung der Chloroform-Reste im Zentrifugalverdampfer wurden 500  $\mu$ L Reagenz 1 (Tabelle 2.36) zugegeben. Inkubation, Extinktionsmessung und Berechnung der Cholesterolkonzentration erfolgten wie in 2.7.3.2 beschrieben.

## 2.8 Bestimmung von Albumin im Plasma

Albumin macht etwa 50% des Gesamtproteins im Plasma aus und stellt somit das quantitativ wichtigste Plasmaprotein dar (Evans 2002). Das Protein ist hauptverantwortlich für den kolloidosmotischen Druck des Plasmas und hat zahlreiche weitere biologische Funktionen. So dient es beispielsweise als Transportprotein für Fettsäuren, Cholesterol und Calcium und spielt eine Rolle bei der Reduktion radikaler Sauerstoffspezies (Evans 2002). Niedrige Albuminspiegel können Indikatoren für Entzündungsprozesse oder Lebererkrankungen sein (Moshage et al. 1987; Oetl et al. 2008).

Die Bestimmung von Albumin im Plasma erfolgt mit dem Kit Fluidtest® ALB BCG (#9136, Analyticon) nach den Angaben des Herstellers. Dem Assay liegt die Reaktion von Albumin mit Bromkresolgrün zu einem blau-grünen Albumin-Bromkresolgrün-Komplex in saurem Milieu zu Grunde. 5  $\mu$ L Plasma, Reinstwasser (als Blindwert) oder Standardlösung (Rinderalbumin,  $c$  = 4,5g/dL, R4, Fluidtest® ALB BCG, Analyticon) wurden mit 1 mL Reagenz 1 (Tabelle 2.37)

versetzt, gemischt und für 10 min inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion des entstandenen Farbkomplexes photometrisch bei 620 nm gemessen. Die Quantifizierung der Konzentration des Plasmas in der Probe erfolgte mittels Einpunktkalibrierung nach Formel 11.

$$\text{Albumin [g/dL]} = \frac{E_{\text{Probe}} - E_{\text{Blind}}}{E_{\text{Std}} - E_{\text{Blind}}} \cdot c_{\text{Std}} [\text{g/dL}] \quad (11)$$

mit  $E_{\text{Probe}}$  = Extinktion der Probe,  $E_{\text{Blind}}$  = Extinktion des Blindwertes,  $E_{\text{Std}}$  = Extinktion des Standards,  $c_{\text{Std}}$  = Konzentration des Standards (hier: 4,5 g/dL)

**Tabelle 2.37 Zusammensetzung des Reagenz 1 (Fluidtest® ALB BCG, #9136, Analyticon)**

Komponente	Konzentration
Succinat-Puffer, pH 4,2	75 mmol/L
Bromkresolgrün	0,15 mmol/L
Brij 35 (Polyoxyethylenlaurylether)	7 mL/L
Detergenzien und Stabilisatoren	>0,1%

## 2.9 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Mittels Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) wurden verschiedene Proteine (*FGF21*, *FGF23*, *SAA*, *RBP4*, PTH), sowie 25-Hydroxyvitamin D3, 1,25-Dihydroxyvitamin D3 und Lipopolysaccharide im Plasma bestimmt. Für die Analysen wurden kommerziell erhältliche Kits verwendet (Tabelle 2.38). Aus technischen Gründen erfolgte die Bestimmung von *FGF23*, PTH, 25-Hydroxyvitamin D3, 1,25-Dihydroxyvitamin D3 und Lipopolysacchariden ausschließlich mit den Proben der ersten Woche postpartum.

**Tabelle 2.38 verwendete ELISA Kits zur Bestimmung ausgewählter Plasmaparameter**

Parameter	verwendetes Kit
<i>FGF21</i>	Cow Fibroblast Growth Factor 21 ELISA Kit, Abxexa (Cambridge, UK)
<i>SAA</i>	Bovine Serum amyloid A Protein ELISA Kit, FineTest
<i>RBP4</i>	Bovine Retinol-binding protein 4 ELISA Kit, EIAab (Wuhan, China)
LPS	LPS-ELISA Kit bovine, Cusabio (Houston, USA)
PTH	Bovine Parathyroid Hormone ELISA Kit, Cusabio
<i>FGF23</i>	Bovine FGF23 ELISA Kit, Cusabio
25-Hydroxyvitamin D3	25-Hydroxyvitamin D3 ELISA Kit, LS Bio LifeSpan Bio Science, (Seattle, USA)
1,25-Dihydroxyvitamin D	Bovine 1,25-Dihydroxyvitamin D3 ELISA Kit, Cusabio

Diese Kits beinhalten 96-well Mikrotiterplatten, die mit einem Antikörper beschichtet sind, der gegen das Zielmolekül gerichtet ist. Die Durchführung der ELISAs erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers und wird im Folgenden beschrieben.

### 2.9.1 Sandwich-ELISA

In Vertiefungen der mit dem Antikörper vorbeschichteten Mikrotiterplatte wurden zunächst Proben, Standard oder Verdünnungspuffer (als Negativkontrolle) aufgetragen. Nach einer Inkubation bei 37 °C im Dunklen wurde die überstehende Flüssigkeit verworfen. Je nach Assay erfolgte ein erster Waschschrift, bei dem mehrmals 300 µL Waschpuffer für 1-2 min unter leichtem Schütteln in den Vertiefungen der Mikrotiterplatte inkubiert und die Flüssigkeit anschließend vollständig entfernt wurde. Ein definiertes Volumen (Tabelle 2.39) eines gegen das Zielmolekül gerichteten Antikörpers, der mit Biotin oder Meerrettichperoxidase (HRP) konjugiert ist, wurde anschließend zugegeben und bei 37 °C im Dunklen inkubiert. Nach dem Entfernen der Flüssigkeit erfolgte ein weiterer Waschschrift (2. Waschschrift). Bei den Assays in denen ein Biotin-konjugierter Antikörper verwendet wurde, wurden anschließend 100 µL einer Lösung eines HRP-Avidin-Konjugates zugegeben und nochmals bei 37 °C inkubiert. Avidin bindet dabei an das Biotin des konjugierten Antikörpers. Nach erneutem Waschen wurden 50 µL Tetramethylbenzidin-Lösung (TMB) in die Vertiefungen pipettiert. Bei den Assays, in denen ein HRP-konjugierter Antikörper eingesetzt wurde, erfolgte die Zugabe der TMB Lösung direkt nach dem 2. Waschschrift. TMB wird durch die Peroxidase zu einem blauen Farbstoff umgesetzt. Diese Reaktion wurde nach einer definierten Zeit durch die Zugabe von 50 µL Schwefelsäure-Lösung gestoppt. Die Säurezugabe führt außerdem zu einer Umwandlung des blauen Reaktionsproduktes in einen gelben Farbstoff, dessen Extinktion bei 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 630 nm gemessen wurde. Die Auswertung erfolgte anhand einer Kalibriergeraden, bei der der Logarithmus der relativen Extinktionen  $[E(450 - 630 \text{ nm}) \text{ Probe} - E(430 - 630 \text{ nm}) \text{ Blindwert}]$  gegenüber dem Logarithmus der Konzentration der Standards aufgetragen wurde.

**Tabelle 2.39** Parameter der Durchführung der Sandwich-ELISAs

	<b>FGF21</b>	<b>FGF23</b>	<b>RBP4</b>	<b>PTH</b>	<b>LPS</b>
VF Plasma	1	1	500	1	1
c Standard [ng/mL]	0,1-1,8	0,02-1,00	1,56-100	0,03-2,00	0,03-20
Probe	50 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100µL
Inkubationszeit	30 min	120 min	120 min	120 min	120 min
1. Waschschrift	5x je 2 min	-	-	-	-
<u>Antikörper</u>					
Konjugat	HRP	Biotin	Biotin	Biotin	Biotin
Volumen	50 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
Inkubationszeit	30 min	60 min	60 min	60 min	60 min
2. Waschschrift	5x 2 min	3x 2 min	4x 1 min	3x 2 min	3x 2 min
HRP-Avidin	-	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
Inkubationszeit		60 min	60 min	60 min	60 min
3. Waschschrift	-	5x 2 min	5x 1 min	5x 2 min	5x 2 min
TMB-Lösung	50 µL	90 µL	90 µL	90 µL	90 µL
Inkubationszeit	15 min	20 min	20 min	20 min	20 min

### 2.9.2 Kompetitiver ELISA

Zur Durchführung der kompetitiven ELISAs wurden 50 µL Probe/ Standard oder Puffer (als Blindwert) in die Vertiefungen der mit Antikörper beschichteten Mikrotiterplatte aufgetragen. Direkt im Anschluss wurden 50 µL eines mit Biotin oder HRP konjugierten Targetmoleküls zugegeben, gemischt und bei 37 °C im Dunklen inkubiert. Das Targetmolekül in der Probe konkurriert mit dem Targetkonjugat um Bindungsstellen des immobilisierten Antikörpers. Je mehr Targetmolekül in der Probe vorhanden ist, desto weniger Konjugat kann an den Antikörper binden. Überschüssiges Targetkonjugat wird durch das Entfernen der Lösung und anschließendes Waschen entfernt. Bei dem ELISA zum Nachweis von 1,25-Dihydroxyvitamin D3 erfolgt nun direkt die Zugabe der TMB-Lösung. In den ELISAs, bei denen ein Biotin-konjugiertes Target verwendet wurde, werden zunächst 100 µL HRP-Avidin Konjugat in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettiert und bei 37 °C im Dunklen inkubiert. Nach dem Entfernen des Überstandes und erneutem Waschen wird ein definiertes Volumen an TMB-Lösung zugegeben. Die weitere Inkubation, das Stoppen der Reaktion sowie die Auswertung erfolgten analog zu 2.9.1. In Tabelle 2.40 sind die genauen Parameter der Durchführung der verschiedenen kompetitiven ELISAs aufgeführt.

**Tabelle 2.40 Parameter der Durchführung der kompetitiven-ELISAs**

	<b>SAA</b>	<b>1,25-Dihydroxy- vitamin D3</b>	<b>25-Hydroxyvitamin D3</b>
VF Plasma	25 bzw. 50	50	10
c Standard	3,125-200 ng/mL	1-5 pmol/L	2,47-200 ng/mL
Probe +	50 µL	50 µL	50 µL
Antikörper	50 µL (Biotin-konjugiert)	50 µL (HRP-konj.)	50 µL (Biotin-konjugiert)
Inkubationszeit	45 min	60 min	60 min
1. Waschschrift	3x 1 min	5x 1 min	3x 1 min
HRP-Avidin	100 µL	-	100 µL
Inkubationszeit	30 min		30 min
3. Waschschrift	5x 1 min	-	5x 1 min
TMB-Lösung/	90 µL	100 µL	90 µL
Inkubationszeit	20 min	15 min	15 min

## 2.10 Bestimmung von Parametern des Calciumstoffwechsels

### 2.10.1 Bestimmung von Calcium mittels Atomabsorptionsspektroskopie (AAS)

Die Calciumkonzentrationen der Plasmaproben, die zum Zeitpunkt 1 Woche pp. entnommen wurden, wurden mittels Flammen-Atomabsorptionsspektroskopie (AAS) bestimmt. Die Standardreihe wurde durch Verdünnen einer Stammlösung mit einer Calcium-Konzentration von 1000 mg/L (Single-Element AAS-Standard, RotiStar Ca, Carl Roth) gemäß Tabelle 2.41 angesetzt.

**Tabelle 2.41 Ansetzen der Standards zur Calcium-Bestimmung mittels AAS**

<b>Calcium-Konzentration [mg/L]</b>	<b>Volumen Ca- Stammlösung (1000 mg/L) [µL]</b>
0,0	0
0,25	12,5
0,5	25
1,0	50
2,5	125
5,0	250

ad 50 mL mit 0,1 M HCl+0,2% Lanthanoxid

Die Proben wurden in Doppelbestimmung im Verhältnis 1:50 mit 0,2% Lanthanoxid in 0,1 M Salzsäure verdünnt und für 15 min bei 3500 U/min (1178 g) zentrifugiert. Die Messung erfolgte mittels Solaar S Series AA Spektrometers (Thermo Fisher, Massachusetts, USA) mit den in Tabelle 2.42 aufgeführten Parametern. Durch das Erstellen einer Kalibriergeraden, bei der die Absorptionen gegenüber den Standardkonzentrationen aufgetragen wurden, und eine anschließende lineare Regression wurde die Konzentration an Calcium in den Proben ermittelt (Abbildung 2.14).

Tabelle 2.42 AAS-Parameter für die Bestimmung von Calcium im Plasma

Parameter	
Atomisierung	Luft/Acetylenflamme
Gasfluss	4,2 L/min
Lampe	Calcium-Hohlkathodenlampe
Lampenstrom	100%
Brenner	50 mm
Bandbreite	0,5 mm
Wellenlänge	422,7 nm

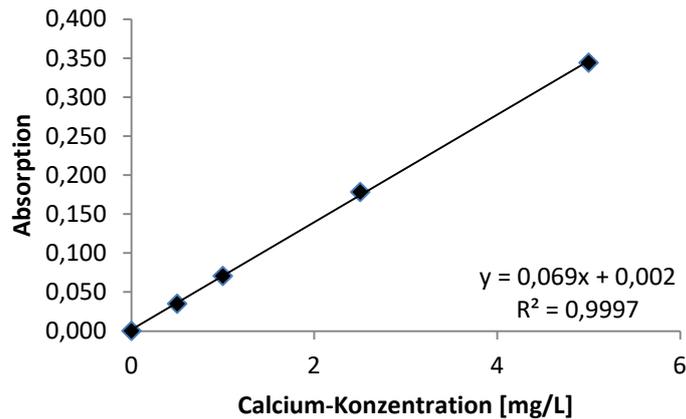


Abbildung 2.14 Kalibriergerade zur Bestimmung der Calcium-Konzentration mittels AAS

### 2.10.2 Bestimmung von Phosphat im Plasma

Für die Bestimmung von anorganischem Phosphat im Plasma wurde das kommerzielle Kit Fluidtest<sup>®</sup> Phos der Firma Analyticon verwendet. Das Prinzip des Assays ist die Bildung eines Ammoniumphosphomolybdat-Komplexes  $(\text{NH}_4)_3[\text{PO}_4(\text{MoO}_3)_{12}]$  aus anorganischem Phosphat mit Ammoniummolybdat in Gegenwart von Schwefelsäure. Die Extinktion dieses Komplexes ist proportional zur Phosphatkonzentration in der Probe und kann photometrisch bei 340 nm gemessen werden.

Zur Bestimmung von Phosphat wurden die Arbeitsreagenzien R1 und R2 (Tabelle 2.43) zunächst im Verhältnis 1:1 gemischt. In Doppelbestimmung wurden je 5  $\mu\text{L}$  Plasma (Probennahmezeitpunkt Woche 1 pp.) mit 500  $\mu\text{L}$  des Reagenz-Mixes versetzt, gemischt und für 5 min bei 400 rpm inkubiert. Anschließend wurden je 200  $\mu\text{L}$  dieser Lösungen in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte pipettiert und die Absorption bei 340 nm am Plattenreader gemessen. Die Phosphatkonzentrationen in der Probe wurden anhand eines Phosphat-Standards ( $c = 5 \text{ mg/dL}$  (1,62 mmol/L), R4 Fluidtest<sup>®</sup> Phos, Analyticon) mittels Einpunktkalibrierung nach Formel 12 ermittelt.

$$\text{Phosphat [mmol/L]} = \frac{E_{\text{Probe}} - E_{\text{Blind}}}{E_{\text{Std}} - E_{\text{Blind}}} \cdot c_{\text{Std}} [\text{mmol/L}] \quad (12)$$

mit  $E_{\text{Probe}}$  = Extinktion der Probe,  $E_{\text{Blind}}$  = Extinktion des Blindwertes,  $E_{\text{Std}}$  = Extinktion des Standards,  $c_{\text{Std}}$  = Konzentration des Standards (hier: 1,62 mmol/L)

**Tabelle 2.43 Zusammensetzung der Reagenzien 1 und 2 (Fluidtest® Phos, Analyticon)**

Reagenz 1	Reagenz 2
Schwefelsäure 280 mmol/L	Schwefelsäure 280 mmol/L
NaCl 154 mmol/L	NaCl 154 mmol/L
Detergens 2%	Ammoniummolybdat 3 mmol/L

## 2.11 Statistische Auswertung

Die Statistische Auswertung der Messdaten erfolgte mit der Software R (Version 3.4.0, R Foundation for Statistical Computing, Wien, Österreich) unter der Verwendung der Pakete *lsmeans* (Lenth 2016) und *nlme* (Pinheiro 2018). Die Daten wurden zunächst über die Ermittlung der Cooks-Distanzen auf Ausreißer geprüft. Zur statistischen Auswertung wurde ein gemischtes lineares Modell verwendet, bei dem der Zeitpunkt, die Laktationsgruppe, sowie die Interaktion zwischen Zeitpunkt und Laktationsgruppe als feste Faktoren und das individuelle Tier als zufälliger Faktor berücksichtigt wurden. Die resultierenden *least square* Mittelwerte (*lsmeans*) der Gruppen wurden anschließend mittels multiplem Mittelwertvergleich nach Hochberg auf signifikante Unterschiede getestet. Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von < 5% (p-Wert < 0,05) wurden als signifikant betrachtet. Die Ergebnisse in dieser Arbeit werden als *least square* Mittelwerte ± Standardfehler (SE) angegeben.

Zur Ermittlung von Zusammenhängen zwischen unterschiedlichen Parametern wurden Korrelationskoeffizienten nach Pearson berechnet, die auf der Basis der linearen Regression beruhen.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Stoffwechselanpassungen während der peripartalen Phase

In Abbildung 3.1 sind die nach 2.3 berechneten Daten der Energieaufnahme und -bilanz sowie das Körpergewicht der untersuchten Tiere bis zu einem Zeitraum von 15 Wochen pp. dargestellt. Die Futtermittelaufnahme sowie die Energiebilanz der Milchkühe war bereits vor der Abkalbung leicht rückläufig. Postpartum trat bedingt durch die einsetzende Laktation eine starke negative Energiebilanz auf, die direkt nach der Abkalbung mit  $-60$  MJ NEL/Tag am stärksten ausgeprägt ist und im weiteren Verlauf der Laktation langsam wieder abnahm. Mehrkalbksühe wiesen zu allen Zeitpunkten ein höheres Körpergewicht sowie eine höhere Energieaufnahme auf. Die Energiebilanz der Mehrkalbksühe lag vor der Abkalbung signifikant höher als die der Färsen. In den ersten vier Wochen nach der Abkalbung war die negative Energiebilanz bei Mehrkalbksühen jedoch stärker ausgeprägt (Abbildung 3.1 B).

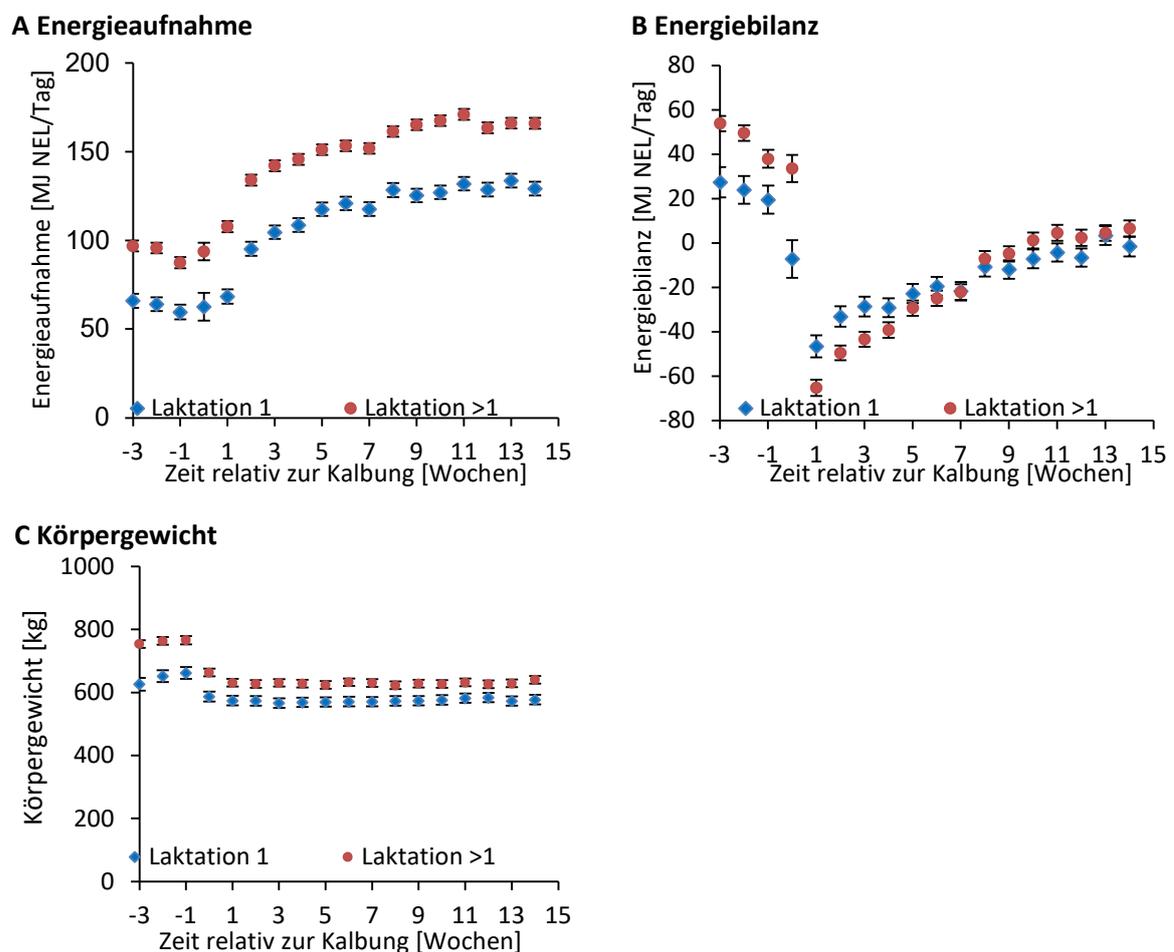


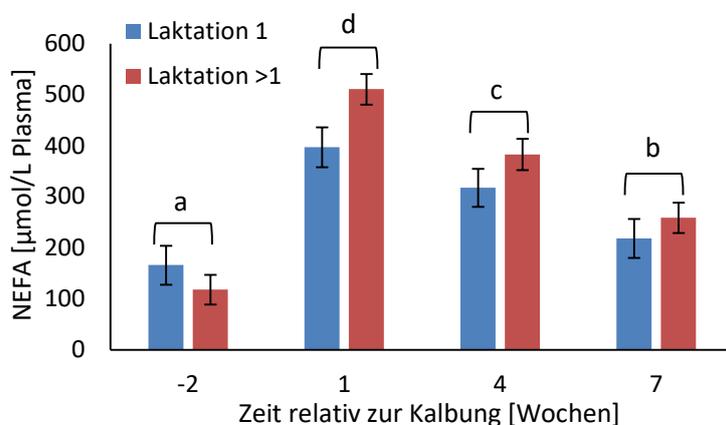
Abbildung 3.1 A) Energieaufnahme B) Energiebilanz C) Körpergewicht bei Milchkühen in der peripartalen Phase (Laktation 1: n = 19, Laktation > 1: n = 31)

(dargestellt sind Ismeans  $\pm$  Standardfehler)

### 3.1.1 Fettmobilisation

#### 3.1.1.1 Freie Fettsäuren (NEFA)

Wie in Abbildung 3.2 zu sehen ist, stieg die NEFA-Konzentration im Plasma nach der Abkalbung zunächst drastisch an (Faktor 3,3 p-Wert:  $< 0,001$ ) und war DNA im weiteren Verlauf der Laktation wieder rückläufig. Die Laktationsnummer hatte keinen signifikanten Einfluss auf die absolute NEFA-Konzentration, jedoch stieg die Konzentration bei höher laktierenden Kühen nach der Abkalbung stärker an als bei Färsen (Faktor 4,1 vs. 2,6). Die Konzentration an freien Fettsäuren im Plasma in der ersten Woche pp. war zudem negativ mit der Energiebilanz korreliert ( $r = 0,629$ ,  $p < 0,001$ ).

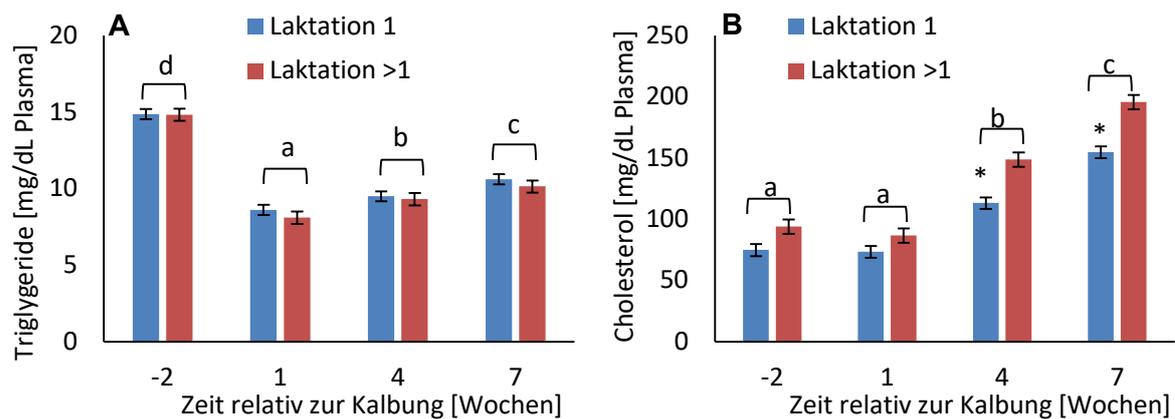


**Abbildung 3.2 Konzentration an freien Fettsäuren im Plasma von Holstein-Kühen während der peripartalen Phase (Ismeans  $\pm$  Standardfehler, Laktation 1:  $n = 19$ , Laktation  $> 1$ :  $n = 31$ )**

a, b, c, d: Signifikanzniveaus Zeit, p-Wert  $< 0,001$

#### 3.1.1.2 Triglyceride und Cholesterol im Plasma

Die Triglycerid-Konzentrationen im Plasma waren nach der Abkalbung signifikant niedriger als in Woche 2 ap. (Abbildung 3.3 A). Die niedrigsten Konzentrationen wurden an Tag 8 pp. gemessen, im weiteren Verlauf der Laktation stiegen diese Werte wieder an. Die Laktationsgruppe hatte keinen Einfluss auf die Triglycerid-Konzentration im Plasma. Die Cholesterol-Konzentrationen im Plasma waren in Woche 4 und 7 pp. im Vergleich zu Woche 2 ap. und Woche 1 pp. signifikant erhöht (Abbildung 3.3 B). Bei Mehrkalbskühen war der Anstieg der Cholesterol-Werte zu diesen Zeitpunkten stärker ausgeprägt als bei erstlaktierenden Tieren.



**Abbildung 3.3 A) Triglycerid-Konzentration und B) Cholesterolkonzentration im Plasma von Holstein-Kühen während der peripartalen Phase (Ismmeans  $\pm$  Standardfehler, Laktation 1: n = 19, Laktation > 1: n = 31)**

a, b, c: Signifikanzniveaus Zeitpunkt, p-Wert < 0,001; \*: Signifikanzniveaus Laktation, p-Wert < 0,05

### 3.1.2 Auftreten von Inflammation in der Frühlaktation

Zur Beurteilung der Ausprägung der „*inflammatory-like-condition*“ in der Leber der untersuchten Milchkühe wurden die mRNA-Konzentrationen ausgewählter positiver und negativer Akute-Phase-Proteine- (APP) codierender Gene sowie proinflammatorischer Gene gemessen. Die Genexpressionen der Akute-Phase-Proteine-codierende Gene *HP* und *SAA* war zum Zeitpunkt 1 Woche pp. signifikant erhöht, während die Genexpression des negativen Akute-Phase-Protein-codierenden Gens *TTR* erniedrigt war (Tabelle 3.1). Für das *CP* codierende Gen wurde bereits vor der Abkalbung eine erhöhte Expression beobachtet, die analog zu *HP* und *SAA* in Woche 4 pp. wieder rückläufig war. Die mRNA-Konzentration von *CRP* zeigte hingegen keine signifikanten Änderungen während des Versuchszeitraums. Die Expression von *RBP4* war in Woche 1 pp. gegenüber den übrigen Zeitpunkten leicht erhöht. Mehrkalbskühe zeigten über alle Zeitpunkte hinweg eine höhere hepatische *RBP4*-Expression als Färsen.

Zur Ergänzung der Genexpressionsanalysen wurde die Konzentration der Proteine *SAA*, *RBP4* und Albumin im Plasma gemessen (Tabelle 3.2). Die Konzentration des negativen Akute-Phase Proteins Albumin war in Woche 2 ap. sowie in Woche 1 pp. im Vergleich zu Woche 4 und 7 pp. verringert. Die Protein-Konzentration von *RBP4* war in Woche 1 pp. im Vergleich zu Woche 7 pp. reduziert, während die Konzentration des Akute-Phase-Proteins *SAA* im Plasma in den Wochen 2 ap. und 1 pp. gegenüber Woche 4 und 7 pp. erhöht war.

**Tabelle 3.1 Relative mRNA-Konzentration von Akute-Phase- und negativ Akute-Phase-Proteine-codierenden Genen in der Leber von Holstein-Kühen<sup>1</sup> (n = 50)**

Gen <sup>2</sup>	Woche 2 ap.	Woche 1 pp.	Woche 4 pp.	Woche 7 pp.	SE	p-Wert Zeit	p-Wert Laktation
<u>Akute-Phase-Proteine-codierende Gene</u>							
<i>CP</i>	1,00 <sup>b</sup>	0,98 <sup>b</sup>	0,67 <sup>a</sup>	0,70 <sup>a</sup>	0,04	<0,001	0,993
<i>CRP</i>	1,00	1,04	1,12	1,05	0,06	0,351	0,229
<i>HP</i>	1,00 <sup>a</sup>	5,05 <sup>b</sup>	0,33 <sup>a</sup>	0,76 <sup>a</sup>	0,61	<0,001	0,082
<i>SAA</i>	1,00 <sup>a</sup>	1,56 <sup>b</sup>	1,15 <sup>ab</sup>	1,21 <sup>ab</sup>	0,15	0,020	0,798
<u>negative Akute-Phase-Proteine codierende Gene</u>							
<i>TTR</i>	1,00 <sup>c</sup>	0,60 <sup>a</sup>	0,66 <sup>a</sup>	0,80 <sup>b</sup>	0,03	<0,001	0,438
<i>RBP4</i>	1,00 <sup>a</sup>	1,12 <sup>b</sup>	1,02 <sup>a</sup>	1,04 <sup>ab</sup>	0,03	0,008	0,001
<i>Laktation 1</i>	0,92*	1,02*	0,94*	0,95*	0,05*		
<i>Laktation &gt;1</i>	1,08**	1,22**	1,09**	1,11**	0,04**		

<sup>1</sup> mRNA-Expressionen relativ zum Zeitpunkt 2 Wochen antepartum dargestellt

<sup>2</sup>*CP* = Ceruloplasmin, *CRP* = C-reaktives Protein, *HP* = Haptoglobin, *SAA* = Serumamyloid A, *TTR* = Transthyretin, *RBP4* = Retinol-bindendes Protein 4, a, b, c Signifikanzniveaus Zeit, \*, \*\* Signifikanzniveaus Laktation, ap. = antepartum, pp. = postpartum, SE = Standardfehler

**Tabelle 3.2 Konzentrationen an Akute-Phase- und negativen Akute-Phase-Proteinen im Plasma von Holstein Kühen (n = 50)**

Parameter <sup>1</sup>	Woche 2 ap.	Woche 1 pp.	Woche 4 pp.	Woche 7 pp.	SE	p-Wert Zeit	p-Wert Laktation
<i>SAA</i> [ng/mL]	324 <sup>c</sup>	312 <sup>bc</sup>	279 <sup>a</sup>	284 <sup>ab</sup>	91	0,001	0,010
<i>Laktation 1</i>	307	308	243*	253*	17		
<i>Laktation &gt;1</i>	341	316	315**	314**	14		
<i>RBP4</i> [ng/mL]	1509 <sup>ab</sup>	1486 <sup>a</sup>	1512 <sup>ab</sup>	1624 <sup>b</sup>	59	0,008	0,225
Albumin [mg/mL]	28 <sup>a</sup>	29 <sup>a</sup>	31 <sup>b</sup>	32 <sup>b</sup>	1	<0,001	0,108

<sup>1</sup> *SAA* = Serumamyloid A, *RBP4* = Retinol-bindendes Protein 4, a, b, c Signifikanzniveaus Zeit, \*, \*\* Signifikanzniveaus Laktation, ap. = antepartum, pp. = postpartum, SE = Standardfehler

Die mRNA-Expressionen der analysierten proinflammatorischen Gene sind in Tabelle 3.3 aufgeführt. Die Expression des Chemokin-Liganden 2 (*CCL2*) stieg nach der Abkalbung an und war in Woche 4 und 7 pp. gegenüber Woche 2 ap. signifikant erhöht. Interleukin 1 (*IL1b*), Interleukin 8 (*IL8*) und die Prostaglandin-Endoperoxid Synthase 2 (*PTGS2*) wurden in Woche 1 pp. im Vergleich zu Woche 2 ap. (signifikant) verringert exprimiert. Während die Verringerung der Expression für *IL1b* und *PTGS2* bis Woche 7 pp. anhielt, stieg die Expression von *IL8* in Woche 4 und 7 pp. an. Für den Tumor-Nekrose Faktor (*TNF*) waren keine Expressionsänderungen im Versuchszeitraum zu beobachten. Die hepatische mRNA-Konzentration des *AOAH*-codierenden Gens war in Woche 1 pp. gegenüber Woche 2 ap. signifikant reduziert.

**Tabelle 3.3 Relative mRNA-Konzentration von proinflammatorischen Genen in der Leber von Holstein-Kühen<sup>1</sup> (n = 50)**

Gen <sup>2</sup>	Woche 2 ap.	Woche 1 pp.	Woche 4 pp.	Woche 7 pp.	SE	p-Wert Zeit	p-Wert Laktation
<i>CCL2</i>	1,00 <sup>a</sup>	1,11 <sup>ab</sup>	1,36 <sup>b</sup>	1,33 <sup>b</sup>	0,09	0,002	0,101
<i>IL1B</i>	1,00 <sup>b</sup>	0,86 <sup>ab</sup>	0,76 <sup>a</sup>	0,76 <sup>a</sup>	0,05	<0,001	0,610
<i>IL8</i>	1,00 <sup>ab</sup>	0,83 <sup>a</sup>	1,18 <sup>bc</sup>	1,40 <sup>c</sup>	0,10	<0,001	0,223
<i>PTGS2</i>	1,00 <sup>b</sup>	0,78 <sup>a</sup>	0,94 <sup>ab</sup>	0,81 <sup>a</sup>	0,06	0,002	0,205
<i>TNF</i>	1,00	0,84	0,99	0,96	0,07	0,219	0,557
<i>AOAH</i>	1,00 <sup>c</sup>	0,74 <sup>a</sup>	0,87 <sup>b</sup>	0,85 <sup>ab</sup>	0,05	<0,001	0,666

<sup>1</sup> mRNA-Expressionen relativ zum Zeitpunkt zwei Wochen antepartum dargestellt

<sup>2</sup>*CCL2* = Chemokin-Ligand 2, *IL1B* = Interleukin 1 beta, *IL8* = Interleukin 8, *PTGS2* = Prostaglandin-Endoperoxid Synthase 2, *TNF* = Tumor-Nekrose Faktor, *AOAH* = Acyloxyacyl-Hydrolase  
a, b, c Signifikanzniveaus Zeit, ap. = antepartum, pp. = postpartum, SE = Standardfehler

### 3.1.2.1 Energiebilanz, freie Fettsäuren und Inflammation

Die hepatische relative mRNA-Konzentration des negativ-Akute-Phase-Protein-codierenden Gens *RBP4* war bei stärker ausgeprägter negativer Energiebilanz in Woche 1 pp. erhöht (Korrelation: Energiebilanz und *RBP4* mit  $r = -0,433$ ,  $p = 0,015$ ). Des Weiteren zeigte die mRNA-Konzentration von *RBP4* eine positive Korrelation zur Konzentration an freien Fettsäuren im Plasma ( $r = 0,406$ ,  $p = 0,006$ ). Weitere Zusammenhänge zwischen Inflammation und der Energiebilanz oder der Konzentration an freien Fettsäuren wurden nicht beobachtet (Anhang, Tabelle 6.1).

### 3.1.2.2 Lipopolysaccharide

Lipopolysaccharide (LPS) können ein Auslöser für das Auftreten von Inflammation in der Früh-laktation sein (s. 1.1.2). Die Bestimmung von LPS im Plasma in den Proben aus Woche 1 pp. erfolgte mittels ELISA (s. 2.9.1). Die Konzentration von LPS im Plasma von Färsen war im Vergleich Mehrkalbskühen tendenziell, jedoch nicht signifikant erhöht (Tabelle 3.4). Die Konzentration an Lipopolysacchariden im Plasma war positiv mit der relativen mRNA-Konzentration von *HP* korreliert ( $r = 0,280$ ,  $p = 0,049$ ). Weitere Zusammenhänge zwischen LPS und den gemessenen Entzündungsparametern wurden nicht beobachtet (Anhang, Tabelle 6.2).

**Tabelle 3.4 Konzentrationen an Lipopolysacchariden im Plasma von Holstein Kühen zum Zeitpunkt 1 Woche postpartum (n = 50)**

	Laktation 1	Laktation > 1	SE	p-Wert
LPS [ $\mu\text{g/L}$ ]	0,59	0,36	0,09	0,068

LPS = Lipopolysaccharide, SE = Standardfehler

### 3.1.3 Oxidativer Stress

Zur Erfassung des oxidativen Status während der peripartalen Phase wurden die Konzentrationen der Vitamine  $\beta$ -Carotin, Retinol,  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Tocopherol, sowie die Summenparameter TEAC, TBARS und Proteincarbonyle im Plasma gemessen (Tabelle 3.5). Die Konzentrationen von  $\beta$ -Carotin, Retinol, und  $\alpha$ -Tocopherol waren nach der Abkalbung gegenüber Woche 2 ap. und der späteren Laktation reduziert, was auf einen hohen postpartalen oxidativen Stress hindeuten kann. Im Einklang dazu war die Trolox-äquivalente antioxidative Kapazität (TEAC) in Woche 1 pp. gegenüber Woche 2 ap. und 4 pp. numerisch, jedoch nicht signifikant sowie gegenüber Woche 7 pp. signifikant reduziert. Die Plasmakonzentration von  $\gamma$ -Tocopherol war bereits in Woche 2 ap. gegenüber der späteren Laktation (Woche 4 und 7 pp.) signifikant reduziert, während die Konzentration an TBARS in Woche 2 ap. am höchsten war. Eine Erhöhung der Proteincarbonyl-Konzentration, die ein Indikator des Proteinabbaus darstellt, war bereits in Woche 2 ap. zu beobachten und war erst im späteren Verlauf der Laktation (ab Woche 4 pp.) wieder rückläufig. Mehrkalbskühe wiesen im Vergleich zu Färsen in Woche 2 ap. sowie in Woche 4 und 7 pp. signifikant höhere  $\gamma$ -Tocopherol-Konzentrationen auf, während die Konzentration an TBARS bei Mehrkalbskühen in Woche 2 ap. gegenüber erstlaktierenden Kühen verringert war.

**Tabelle 3.5 oxidative und antioxidative Parameter im Plasma von Holstein Kühen (n = 50) während der peripartalen Phase**

Parameter	Woche 2 ap.	Woche 1 pp.	Woche 4 pp.	Woche 7 pp.	SE	p-Wert Zeit	p-Wert Laktation
$\beta$ -Carotin [ $\mu\text{mol/g Lipid}$ ] <sup>1</sup>	18,94 <sup>a</sup>	11,65 <sup>b</sup>	10,99 <sup>b</sup>	18,08 <sup>a</sup>	0,77	<0,001	0,815
Retinol [ $\mu\text{mol/g Lipid}$ ] <sup>1</sup>	1,01 <sup>c</sup>	0,75 <sup>ab</sup>	0,67 <sup>a</sup>	0,84 <sup>b</sup>	0,04	0,001	0,085
$\alpha$ -Tocopherol [ $\mu\text{mol/g Lipid}$ ] <sup>1</sup>	8,14 <sup>a</sup>	5,14 <sup>b</sup>	5,63 <sup>b</sup>	8,81 <sup>a</sup>	0,33	<0,001	0,168
$\gamma$ -Tocopherol [ $\mu\text{mol/g Lipid}$ ] <sup>1</sup>	0,13 <sup>a</sup>	0,11 <sup>a</sup>	0,24 <sup>b</sup>	0,30 <sup>c</sup>	0,01	<0,001	<0,001
Laktation 1	0,10*	0,09	0,19*	0,23*	0,02		
Laktation >1	0,16**	0,13	0,29**	0,37**	0,01		
Proteincarbonyle [ $\mu\text{mol/g Protein}$ ]	0,33 <sup>a</sup>	0,30 <sup>a</sup>	0,24 <sup>b</sup>	0,24 <sup>b</sup>	0,01	<0,001	0,153
TEAC [mmol/L] <sup>2</sup>	3,73 <sup>ab</sup>	3,65 <sup>a</sup>	3,76 <sup>ab</sup>	3,87 <sup>b</sup>	0,06	0,011	0,847
TBARS <sup>3</sup> [ $\mu\text{mol/L}$ ]	1,01 <sup>a</sup>	0,83 <sup>b</sup>	0,79 <sup>b</sup>	0,84 <sup>b</sup>	0,02	<0,001	0,019
Laktation 1	1,10**	0,87	0,79	0,81	0,04		
Laktation >1	0,92*	0,79	0,78	0,86			

<sup>1</sup> Berechnung der Vitamin Konzentration relativ zur Triglycerid- und Cholesterolkonzentration im Plasma <sup>2</sup>TEAC = Trolox-äquivalente antioxidative Kapazität, <sup>3</sup>TBARS = Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen, a, b, c Signifikanzniveaus Zeit, \*, \*\* Signifikanzniveaus Laktation, ap. = antepartum, pp. = postpartum, SE = Standardfehler

### 3.1.3.1 Oxidativer Stress, Energiebilanz und NEFA

Bei stärker ausgeprägter negativer Energiebilanz war die Trolox-äquivalente antioxidative Kapazität im Plasma reduziert (Korrelation: Energiebilanz und TEAC mit  $r = 0,407$ ,  $p = 0,021$ ). Weitere Zusammenhänge zwischen dem Auftreten von oxidativem Stress und der Energiebilanz oder der Konzentration an freien Fettsäuren im Plasma konnten nicht beobachtet werden (Anhang, Tabelle 6.3).

### 3.1.3.2 Oxidativer Stress und Inflammation

Die hepatischen Expressionen der akute-Phase-Proteine-codierenden Gene *SAA*, *HP* und *CP* zeigten einige inverse Korrelationen zu den Konzentrationen an Vitaminen (v. a. Retinol) im Plasma (Tabelle 3.6). Die Expression des negativ akute-Phase-Protein-codierenden Gens *RBP4* war hingegen positiv mit Retinol und  $\gamma$ -Tocopherol korreliert, während die mRNA-Konzentration von *TTR* eine positive Korrelation mit  $\gamma$ -Tocopherol zeigte. Zusammenhänge zwischen Parametern des oxidativen Stresses mit der Expression proinflammatorischer Gene oder den Entzündungsmarkern im Plasma konnten nicht beobachtet werden.

**Tabelle 3.6 Korrelationen (nach Pearson) zwischen der Expressionen von Parametern der Inflammation und Markern des oxidativen Stresses bei Holstein Kühen in Woche 1 pp. (n = 50)**

Korrelationskoeffizient mit $p < 0,05$							
	$\beta$ - Carotin	Retinol	$\alpha$ - Tocopherol	$\gamma$ - Tocopherol	TEAC	TBARS	Protein- carbonyle
<i>SAA</i>	n.s.	-0,506	-0,318	-0,328	n.s.	n.s.	n.s.
<i>HP</i>	n.s.	-0,466	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>CP</i>	n.s.	-0,326	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>CRP</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>RBP4</i>	n.s.	0,373	n.s.	0,414	n.s.	n.s.	n.s.
<i>TTR</i>	n.s.	n.s.	n.s.	0,336			
<i>TNF</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>IL1b</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>IL8</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>PTGS2</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>CCL2</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>AOAH</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0,314	n.s.
<u>Plasmaparameter</u>							
Albumin	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>SAA</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>RBP4</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
LPS	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

TEAC = Trolox-äquivalente antioxidative Kapazität, TBARS = Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen, *CP* = Ceruloplasmin, *CRP* = C-reaktives Protein, *HP* = Haptoglobin, *SAA* = Serumamyloid A, *TTR* = Transthyretin, *RBP4* = Retinol-bindendes Protein 4, *CCL2* = Chemokin-Ligand 2, *IL1b* = Interleukin 1 beta, *IL8* = Interleukin 8, *PTGS2* = Prostaglandin-Endoperoxid Synthase 2, *TNF* = Tumor-Nekrose Faktor, n.s. = nicht signifikant ( $p > 0,05$ )

### 3.1.4 Nrf2-Weg

Um eine mögliche Aktivierung des Nrf2 in Folge von ER-Stress oder oxidativem Stress in der Frühlaktation nachzuweisen, wurde die hepatische mRNA-Expression einiger Nrf2-Zielgene mittels qPCR gemessen (Tabelle 3.7). Die Expression von Metallothionein-1A (*MT1A*) war in Woche 1 pp. stark erhöht (Faktor 11). Die Expression weiterer Nrf2-Zielgene wie Superoxiddismutase 1 (*SOD1*), NAD(P)H-Dehydrogenase (*NQO1*), Catalase (*CAT*), Glutathionperoxidase (*GPXI*) und UDP-Glucuronosyltransferase (*UGT1A1*) wurden im Versuchszeitraum kaum beeinflusst. *CAT* wurde in Woche 1 und 4 pp. weniger stark exprimiert als in Woche 7 pp. Mehrkalbskühe zeigten zu den Zeitpunkten 1 Woche ap. und 4 Wochen pp. eine signifikant höhere Expression an *CAT* als erstlaktierende Tiere. Die Expression von *SOD1* war nach der Abkalbung bei Tieren in einer höheren Laktation stärker ausgeprägt als bei Färsen, zeigte über den Zeitverlauf jedoch keine signifikante Änderung.

**Tabelle 3.7 Relative mRNA-Konzentration von Nrf2-Zielgenen in der Leber von Holstein-Kühen<sup>1</sup> (n = 50)**

Gen <sup>2</sup>	Woche 2 ap.	Woche 1 pp.	Woche 4 pp.	Woche 7 pp.	SE	p-Wert Zeit	p-Wert Laktation
<i>CAT</i>	1,00 <sup>ab</sup>	0,89 <sup>a</sup>	0,99 <sup>a</sup>	1,12 <sup>b</sup>	0,04	<0,001	0,015
<i>Laktation 1</i>	0,91*	0,85	0,91*	1,05	0,06		
<i>Laktation &gt;1</i>	1,09**	0,93	1,07**	1,18	0,05		
<i>GPXI</i>	1,00 <sup>b</sup>	0,96 <sup>b</sup>	0,81 <sup>a</sup>	0,90 <sup>ab</sup>	0,04	<0,001	0,669
<i>MT1A</i>	1,00 <sup>a</sup>	11,11 <sup>b</sup>	1,52 <sup>a</sup>	1,28 <sup>a</sup>	1,40	<0,001	0,891
<i>NQO1</i>	1,00	1,00	0,94	0,98	0,04	0,683	0,201
<i>SOD1</i>	1,00	1,01	0,96	0,98	0,02	0,275	0,011
<i>Laktation 1</i>	1,00	0,97*	0,90*	0,93*	0,04		
<i>Laktation &gt;1</i>	1,00	1,06**	1,01**	1,03**	0,03		
<i>UGT1A1</i>	1,00 <sup>b</sup>	0,98 <sup>ab</sup>	0,91 <sup>ab</sup>	0,87 <sup>a</sup>	0,04	0,026	0,325

<sup>1</sup> mRNA-Expressionen relativ zum Zeitpunkt zwei Wochen antepartum dargestellt

<sup>2</sup> *CAT* = Catalase, *GPXI* = Glutathionperoxidase, *MT1A* = Metallothionein-1A, *SOD1* = Superoxid-Dismutase 1, *UGT1A1* = UDP-Glucuronosyltransferase 1 A1, *NQO1* = NAD(P)H Dehydrogenase, Quinon 1, a, b, c Signifikanzniveaus Zeit, \*, \*\* Signifikanzniveaus Laktation  
ap. = antepartum, pp. = postpartum, SE = Standardfehler

#### 3.1.4.1 Nrf2-Aktivierung, Energiebilanz und freie Fettsäuren

Zwischen dem Auftreten einer negativen Energiebilanz und einer Expression von Nrf2-Zielgenen ist kein Zusammenhang feststellbar. Die Konzentration an freien Fettsäuren im Plasma ist in Woche 1 pp. positiv mit der relativen mRNA-Konzentration von *NQO1* korreliert ( $R = 0,399$ ,  $p = 0,007$ ), weitere Korrelationen zwischen freien Fettsäuren und der Expression der Nrf2-Zielgenen *CAT*, *GPXI*, *MT1A1*, *SOD1* und *UGT1A1* wurde nicht beobachtet (Anhang, Tabelle 6.4).

3.1.4.2 Nrf2-Aktivierung und Inflammation

Die relativen mRNA-Konzentrationen der Nrf2-Zielgene zeigten überwiegend positive Korrelationen mit den Expressionen der positiven akuten Phase Proteine codierenden Gene (Tabelle 3.8). Im Einklang damit standen positive Zusammenhänge der Expressionen proinflammatorischer Gene mit der mRNA-Konzentration von *GPXI*, und eine inverse Korrelation zwischen der Expression von *MTIA1* und *TTR* sowie inverse Korrelationen von *NQO1* und *UGTIA1* mit der Plasmakonzentration an RBP4. Interessanterweise waren aber auch positive Korrelationen zwischen Nrf2-Zielgenen und den negative akute-Phase-Proteine-codierenden Genen *RBP4* und *TTR*, sowie Albumin zu beobachten.

**Tabelle 3.8 Korrelationen (nach Pearson) zwischen den Expressionen von Nrf2-Zielgenen und Parametern der Inflammation in der Leber und von Holstein Kühen ( $p < 0,05$ ) in Woche 1 pp. (n = 50)**

	Korrelationskoeffizient mit $p < 0,05$					
	<i>CAT</i>	<i>GPXI</i>	<i>MTIA1</i>	<i>NQO1</i>	<i>SOD1</i>	<i>UGTIA1</i>
<u>positive akute-Phase-Proteine-codierende Gene</u>						
<i>SAA</i>	n.s.	0,546	0,474	n.s.	n.s.	n.s.
<i>HP</i>	-0,383	0,458	0,877	n.s.	n.s.	n.s.
<i>CP</i>	n.s.	0,334	0,689	n.s.	n.s.	n.s.
<i>CRP</i>	n.s.	n.s.	0,617	n.s.	0,363	n.s.
<u>negative akute-Phase-Proteine-codierende Gene</u>						
<i>RBP4</i>	0,558	n.s.	n.s.	0,301	0,410	0,367
<i>TTR</i>	0,468	n.s.	-0,407	n.s.	n.s.	0,421
<u>Proinflammatorische Gene</u>						
<i>TNF</i>	n.s.	0,337	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>IL1b</i>	n.s.	0,432	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>IL8</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>PTGS2</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	-0,298
<i>CCL2</i>	n.s.	0,335	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>AOAH</i>	n.s.	0,342	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<u>Plasmaparameter</u>						
Albumin	0,440	n.s.	n.s.	0,365	n.s.	0,397
<i>SAA</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>RBP4</i>	n.s.	n.s.	n.s.	-0,312	n.s.	-0,426
<u>Lipopolysaccharide</u>						
	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

*CAT* = Catalase, *GPXI* = Glutathionperoxidase, *MTIA* = Metallothionein-1A, *SOD1* = Superoxid-Dismutase 1, *UGTIA1* = UDP-Glucuronosyltransferase 1 A1, *NQO1* = NAD(P)H Dehydrogenase, Quinon 1, *CP* = Ceruloplasmin, *CRP* = C-reaktives Protein, *HP* = Haptoglobin, *SAA* = Serumamyloid A, *TTR* = Transthyretin, *RBP4* = Retinol-bindendes Protein 4, *CCL2* = Chemokin-Ligand 2, *IL1B* = Interleukin 1 beta, *IL8* = Interleukin 8, *PTGS2* = Prostaglandin-Endoperoxid Synthase 2, *TNF* = Tumornekrose Faktor, n.s. = nicht signifikant ( $p > 0,05$ )

### 3.1.4.3 Nrf2-Aktivierung und oxidativer Stress

Die relativen hepatischen mRNA-Konzentrationen der Nrf2-Zielgene *GPXI* und *MT1A1* zeigten nach der Abkalbung inverse Konzentrationen mit Vitaminkonzentrationen im Plasma (Tabelle 3.9). Im Einklang mit diesen Beobachtungen war die TEAC invers mit der Expression von *CAT*, *NQO1* und *SOD1* korreliert.

**Tabelle 3.9 Korrelationen (nach Pearson) zwischen der Expression von Nrf2-Zielgenen in der Leber und Parametern des oxidativen Stresses bei Holstein-Kühen in Woche 1 pp. (n = 50)**

	Korrelationskoeffizient mit p < 0,05					
	<i>CAT</i>	<i>GPXI</i>	<i>MT1A</i>	<i>NQO1</i>	<i>SOD1</i>	<i>UGT1A1</i>
Retinol	n.s.	-0,619	-0,335	n.s.	n.s.	n.s.
$\beta$ -Carotin	n.s.	-0,445	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
$\alpha$ -Tocopherol	n.s.	-0,453	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
$\gamma$ -Tocopherol	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
TBARS	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
TEAC	-0,299	n.s.	n.s.	-0,290	-0,364	n.s.
Proteincarbonyle	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

*CAT* = Catalase, *GPXI* = Glutathionperoxidase, *MT1A* = Metallothionein-1A, *SOD1* = Superoxid-Dismutase 1, *UGT1A1* = UDP-Glucuronosyltransferase 1 A1, *NQO1* = NAD(P)H Dehydrogenase, Quinon 1, TEAC = Trolox-äquivalente antioxidative Kapazität, TBARS = Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen, n.s. = nicht signifikant (p > 0,05)

### 3.1.5 FGF21

Um eine mögliche Induktion des Stresshormons FGF21 während der peripartalen Phase nachzuweisen, wurde sowohl die hepatische mRNA-Expression von FGF21 als auch die Konzentration des FGF21-Proteins im Plasma gemessen (Tabelle 3.10). Die Expression von *FGF21* war in Woche 1 pp. stark erhöht (Faktor 16) und im weiteren Verlauf der Laktation wieder rückläufig. In Woche 4 pp. wurde *FGF21* bei Färsen im Gegensatz zu Mehrkalbskühen signifikant stärker exprimiert. Die FGF21-Konzentration im Plasma stieg in Woche 1 pp. tendenziell an, dieser Anstieg war jedoch nicht signifikant.

**Tabelle 3.10 Konzentrationen an FGF21 im Plasma und relative mRNA-Konzentration von FGF21 in der Leber von Holstein Kühen<sup>1</sup> (n = 50)**

Parameter <sup>2</sup>	Woche 2 ap.	Woche 1 pp.	Woche 4 pp.	Woche 7 pp.	SE	p-Wert Zeit	p-Wert Laktation
FGF21 [pg/mL Plasma]	635	727	477	584	91	0,128	0,529
<i>FGF21</i> (mRNA)	1,00 <sup>a</sup>	16,44 <sup>c</sup>	9,77 <sup>b</sup>	4,11 <sup>ab</sup>	1,89	<0,001	0,029
<i>Laktation 1</i>	1,45	19,46	14,97**	6,00	2,97		
<i>Laktation &gt;1</i>	0,55	13,42	4,56*	2,23	2,33		

<sup>1</sup> mRNA-Expressionen relativ zum Zeitpunkt zwei Wochen antepartum dargestellt

<sup>2</sup> *FGF21* = *Fibroblast growth factor* 21, SE = Standardfehler

a, b, c Signifikanzniveaus Zeit, \*, \*\* Signifikanzniveaus Laktation, ap. = antepartum, pp. = postpartum

### 3.1.5.1 FGF21, Energiebilanz und freie Fettsäuren

Sowohl die hepatische FGF21-Expression als auch die FGF21-Proteinkonzentration im Plasma zeigten keine signifikanten Korrelationen zu der Energiebilanz oder der Konzentration an freien Fettsäuren (Anhang, Tabelle 6.5).

### 3.1.5.2 FGF21 und Inflammation

Die relative mRNA-Konzentration von *FGF21* in der Leber war positiv mit den akute Phase Protein codierenden Genen *HP* und *SAA* sowie invers mit den negativ akute Phase Protein codierenden Genen *RBP4* und *TTR* korreliert (Tabelle 3.11). Des Weiteren war eine positive Korrelation zwischen FGF21 und der Konzentration an LPS im Plasma zu beobachten. Die Proteinkonzentration an FGF21 im Plasma zeigte hingegen keinen Zusammenhang zu Parametern der Inflammation.

**Tabelle 3.11 Korrelationen (nach Pearson) zwischen der Expressionen von FGF21 in der Leber sowie der FGF21 Konzentration im Plasma und Parametern der Inflammation bei Holstein Kühen ( $p < 0,05$ ) in Woche 1 pp. (n = 50)**

	Korrelationskoeffizient mit $p < 0,05$	
	hepatische <i>FGF21</i> mRNA	FGF21 im Plasma
<u>positive akute-Phase-Proteine-codierende Gene</u>		
<i>SAA</i>	n.s.	n.s.
<i>HP</i>	0,290	n.s.
<i>CP</i>	0,327	n.s.
<i>CRP</i>	n.s.	n.s.
<u>negative akute-Phase-Proteine-codierende Gene</u>		
<i>RBP4</i>	-0,442	n.s.
<i>TTR</i>	-0,323	n.s.
<u>Proinflammatorische Gene</u>		
<i>TNF</i>	n.s.	n.s.
<i>IL1b</i>	n.s.	n.s.
<i>IL8</i>	n.s.	n.s.
<i>PTGS2</i>	n.s.	n.s.
<i>CCL2</i>	n.s.	n.s.
<i>AOAH</i>	n.s.	n.s.
<u>Plasmaparameter</u>		
Albumin	n.s.	n.s.
<i>SAA</i>	n.s.	n.s.
<i>RBP4</i>	n.s.	n.s.
Lipopolysaccharide	0,282	n.s.

*CP* = Ceruloplasmin, *CRP* = C-reaktives Protein, *HP* = Haptoglobin, *SAA* = Serumamyloid A, *TTR* = Transthyretin, *RBP4* = Retinol-bindendes Protein 4, *CCL2* = Chemokin-Ligand 2, *IL1B* = Interleukin 1 beta, *IL8* = Interleukin 8, *PTGS2* = Prostaglandin-Endoperoxid Synthase 2, *TNF* = Tumor-Nekrose Faktor, *FGF21* = *Fibroblast growth factor* 21, n.s. = nicht signifikant ( $p > 0,05$ )

### 3.1.5.3 FGF21 und oxidativer Stress

Die relative mRNA-Konzentration von *FGF21* in der Leber war invers mit der Retinol-Konzentration ( $r = -0,358$ ,  $p = 0,011$ ) sowie mit der  $\gamma$ -Tocopherol-Konzentration im Plasma ( $r = -0,359$ ,  $p = 0,013$ ) korreliert. Weitere Zusammenhänge zwischen der hepatischen *FGF21*-Expression oder der Konzentration des FGF21-Proteins im Plasma mit Parametern des oxidativen Stresses waren nicht zu beobachten (Anhang, Tabelle 6.6).

### 3.1.6 Calcium- und Vitamin D- Stoffwechsel

Um Aussagen über den Calcium- und Vitamin D Stoffwechsel laktierender Milchkühe treffen zu können, wurden die hepatische Genexpression der Vitamin-D<sub>3</sub>-25-Hydroxylase (Cytochrom P450 2R1, *CYP2R1*), sowie ausgewählte Parameter im Plasma bestimmt. Die Expression von *CYP2R1*, des Enzyms, das die Hydroxylierung von Vitamin D zu 25-Hydroxyvitamin D katalysiert, zeigte über den Versuchszeitraum keine signifikante Änderung (Tabelle 3.12). In der untersuchten Herde war in Woche 1 pp. bei Mehrkalbskühen im Vergleich zu Färsen eine höhere Konzentration an Calcium sowie eine niedrigere Konzentration an Phosphat zu beobachten (Tabelle 3.13). Die Laktationsnummer hatte jedoch keinen Einfluss auf die Konzentration von DHVD3, HVD3, PTH oder FGF23.

**Tabelle 3.12 Relative mRNA-Konzentration von *CYP2R1* in der Leber von Holstein-Kühen<sup>1</sup> (n = 50)**

Gen <sup>2</sup>	Woche 2 ap.	Woche 1 pp.	Woche 4 pp.	Woche 7 pp.	SE	p-Wert Zeit	p-Wert Laktation
<i>CYP2R1</i>	1,00	1,00	1,14	1,04	0,04	0,064	0,118

<sup>1</sup> mRNA-Expressionen relativ zum Zeitpunkt zwei Wochen antepartum dargestellt

<sup>2</sup> *CYP2R1* = Vitamin-D<sub>3</sub>-25-Hydroxylase, ap. = antepartum, pp. = postpartum, SE = Standardfehler

**Tabelle 3.13 relevante Parameter des Calcium- und Vitamin D- Stoffwechsels im Plasma von Holstein Kühen zum Zeitpunkt 1 Woche postpartum (n = 50)**

Parameter	Laktation 1	Laktation $\geq 2$	SE	p-Wert
Calcium [mmol/L]	2,39 <sup>a</sup>	2,52 <sup>b</sup>	0,03	<0,001
Phosphat [mmol/L]	1,60 <sup>b</sup>	1,12 <sup>a</sup>	0,05	<0,001
PTH [ng/L]	79,1	83,2	23,3	0,903
DHVD3 [pmol/L]	41,0	34,8	3,6	0,230
FGF23 [ng/L]	90,6	115,7	14,4	0,226
HVD3 [nmol/L]	177,9	160,1	11,9	0,295

FGF23 = *Fibroblast growth factor 23*, PTH = Parathormon, HVD3 = 25-Hydroxycholecalciferol, DHVD3 = 1, 25-Dihydroxycholecalciferol, SE = Standardfehler

### 3.1.6.1 Calcium-, Vitamin D- Stoffwechsel, Energiebilanz und freie Fettsäuren,

Die Konzentration an Calcium war in Woche 1 pp. positiv mit der Konzentration an freien Fettsäuren im Plasma ( $r = 0,342$ ,  $p = 0,023$ ) sowie invers mit der Energiebilanz ( $r = -0,428$ ,  $p = 0,015$ ) korreliert. Die Phosphatkonzentration im Plasma zeigte hingegen eine inverse Korrelation zu der Konzentration an freien FS ( $r = -0,296$ ,  $p = 0,048$ ). Weitere Zusammenhänge zwischen Parametern des Calcium- und Vitamin D- Stoffwechsels mit der Energiebilanz oder den freien FS wurden nicht beobachtet (Anhang, Tabelle 6.7).

### 3.1.6.2 Calcium-, Vitamin D Stoffwechsel und oxidativer Stress

Die Konzentration an Phosphat zeigte eine inverse Korrelation zu der Retinol Konzentration im Plasma ( $r = -0,333$ ,  $p = 0,021$ ). Weitere Zusammenhänge zwischen Parametern des Calcium- und Vitamin D Stoffwechsels mit Parametern des oxidativen Stresses konnten nicht beobachtet werden (Anhang, Tabelle 6.8).

### 3.1.6.3 Calcium-, Vitamin D- Stoffwechsel und FGF21

Zwischen der hepatischen FGF21-Expression sowie der FGF21-Konzentration im Plasma und den untersuchten Parametern des Calcium- und Vitamin D- Stoffwechsels waren keine Korrelationen zu beobachten (Anhang, Tabelle 6.9).

### 3.1.6.4 Calcium-, Vitamin D- Stoffwechsel und Nrf2-Aktivierung

Zwischen den Parametern des Calcium- sowie des Vitamin D Stoffwechsels waren nur einzelne Korrelationen zu Nrf2-Zielgenen zu beobachten (Anhang, Tabelle 6.10). So zeigte die Expression von *GPX1* positive Korrelationen mit der Phosphatkonzentration im Plasma ( $r = 0,417$ ;  $p = 0,004$ ) sowie mit der HVD3-Konzentration ( $r = 0,411$ ;  $p = 0,006$ ) während die Expression von *SOD1* positiv mit der *CYP2R1*-mRNA-Konzentration korrelierte ( $r = 0,292$ ;  $p = 0,042$ ).

### 3.1.6.5 Calcium-, Vitamin D Stoffwechsel und Inflammation

Die Konzentration an Calcium im Plasma war in Woche 1 pp. sowohl invers mit der hepatischen Expression der positiv akute-Phase-Proteine-codierenden Gene *SAA* und *HP*, als auch mit der Proteinkonzentration an HP sowie dem Gehalt an Lipopolysacchariden im Plasma korreliert (Tabelle 3.14). Des Weiteren zeigte die Calcium-Konzentration eine positive Korrelation mit dem negativ-akute-Phase-Protein-codierenden Gen *RBP4*, während der Gehalt an Phosphat eine inverse lineare Beziehung mit der Expression von *RBP4* und eine positive Korrelation mit

der mRNA-Konzentration von *SAA* zeigte. Interessanterweise war eine positive Assoziation zwischen HVD3 und der Expression von *SAA*, und *CP* sowie eine inverse Beziehung zwischen HVD3 und der RBP4-Konzentration im Plasma zu beobachten.

**Tabelle 3.14 Korrelationen (nach Pearson) zwischen Parametern des Calcium- und Vitamin D Stoffwechsels und Entzündungsmarkern von Holstein Kühen in Woche 1 pp. (n = 50)**

Korrelationskoeffizient mit $p < 0,05$							
<u>APP codierende Gene</u>	Ca	Phos.	HVD3	DHVD3	PTH	FGF23	<i>CYP2R1</i>
<i>SAA</i>	-0,433	0,319	0,343	n.s.	n.s.	n.s.	-0,329
<i>HP</i>	-0,437	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>CP</i>	n.s.	n.s.	0,384	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>CRP</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0,362	0,317
<u>negative APP codierende Gene</u>							
<i>RBP4</i>	0,380	-0,333	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>TTR</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<u>Proinflammatorische Gene</u>							
<i>TNF</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>IL1b</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>IL8</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>PTGS2</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>CCL2</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>AOAH</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<u>Plasmaparameter</u>							
Albumin	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0,322
<i>SAA</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	-0,299	n.s.	n.s.
<i>RBP4</i>	n.s.	n.s.	-0,498	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Lipopolysaccharide	-0,398	n.s.	n.s.	n.s.	0,381	n.s.	n.s.

*CP* = Ceruloplasmin, *CRP* = C-reaktives Protein, *HP* = Haptoglobin, *SAA* = Serumamyloid A, *TTR* = Transthyretin, *RBP4* = Retinol-bindendes Protein 4, *CCL2* = Chemokin-Ligand 2, *IL1B* = Interleukin 1 beta, *IL8* = Interleukin 8, *PTGS2* = Prostaglandin-Endoperoxid Synthase 2, *TNF* = Tumor-Nekrose Faktor, *FGF23* = *Fibroblast growth factor* 23, *PTH* = Parathormon, *HVD3* = 25-Hydroxycholecalciferol, *DHVD3* = 1, 25-Dihydroxycholecalciferol, *Ca* = Calcium, *Phos.* = Phosphat, *CYP2R1* = Vitamin-D<sub>3</sub>-25-Hydroxylase, *APP* = akute Phase Proteine, n.s. = nicht signifikant ( $p > 0,05$ )

### 3.2 Auftreten und Ursachen von ER-Stress in der Frühlaktation

In Tabelle 3.15 sind die mRNA-Expressionen relevanter Gene der UPR im Versuchszeitraum dargestellt. Zum Zeitpunkt 1 Woche pp. war die Expression von *HSPA5*, dem Master-Regulator der UPR sowie die des Downstream-Gens *CASP3* signifikant gegenüber den übrigen Versuchszeitpunkten erhöht. Eine Expressionssteigerung von *HERPUD1* und *XBPIs* trat bereits zwei Wochen ap. auf und war in Woche 4 pp. wieder rückläufig. Bei den hepatischen mRNA Konzentrationen von *ATF4*, *BAX*, *CASP8*, *CASP9*, *PDIA4*, *DNAJC3* und *DDIT3* waren keine signifikante Veränderung über den Zeitverlauf feststellbar. Erstlaktierende Tiere wiesen in Woche 4 pp. eine höhere ATF4-Expression auf als Mehrkalbskühe. Bei den Expressionen der übrigen Gene war kein Unterschied zwischen den Laktationsgruppen zu beobachten.

**Tabelle 3.15 Relative mRNA-Konzentration von Genen der UPR in der Leber von Holstein-Kühen während der peripartalen Phase<sup>1</sup> (n = 50)**

Gen <sup>2</sup>	Woche 2 ap.	Woche 1 pp.	Woche 4 pp.	Woche 7 pp.	SE	p-Wert Zeit	p-Wert Laktation
<i>ATF4</i>	1,00	0,98	0,98	1,02	0,03	0,444	0,007
<i>Laktation 1</i>	1,05	1,03	1,03**	1,03	0,04		
<i>Laktation &gt;1</i>	0,95	0,93	0,92*	1,01	0,03		
<i>BAK1</i>	1,00 <sup>b</sup>	1,02 <sup>b</sup>	0,68 <sup>a</sup>	0,85 <sup>ab</sup>	0,06	<0,001	0,777
<i>BAX</i>	1,00	0,82	1,00	0,89	0,06	0,069	0,136
<i>CASP3</i>	1,00 <sup>b</sup>	1,13 <sup>c</sup>	0,95 <sup>b</sup>	0,82 <sup>a</sup>	0,04	<0,001	0,848
<i>CASP8</i>	1,00	0,96	0,98	0,90	0,06	0,434	0,640
<i>CASP9</i>	1,00	1,02	1,09	0,96	0,06	0,588	0,069
<i>DDIT3</i>	1,00	0,98	1,14	1,05	0,05	0,220	0,388
<i>DNAJC3</i>	1,00	1,21	1,15	1,00	0,08	0,082	0,135
<i>EDEMI</i>	1,00 <sup>a</sup>	0,82 <sup>a</sup>	0,99 <sup>a</sup>	0,92 <sup>a</sup>	0,06	0,029 <sup>3</sup>	0,581
<i>HERPUD1</i>	1,00 <sup>b</sup>	1,01 <sup>b</sup>	0,81 <sup>a</sup>	0,84 <sup>a</sup>	0,04	<0,001	0,154
<i>HSPA5</i>	1,00 <sup>a</sup>	1,27 <sup>b</sup>	1,05 <sup>ab</sup>	0,88 <sup>a</sup>	0,08	0,001	0,373
<i>PDIA4</i>	1,00	1,06	0,85	0,90	0,06	0,070	0,575
<i>XBPIs</i>	1,00 <sup>b</sup>	1,13 <sup>b</sup>	0,68 <sup>a</sup>	0,71 <sup>a</sup>	0,08	<0,001	0,455

<sup>1</sup> mRNA-Expressionen relativ zum Zeitpunkt zwei Wochen antepartum dargestellt

<sup>2</sup> *ATF4* = aktivierender Transkriptionsfaktor 4, *BAK1* = BCL2-Antagonist 1, *BAX* = BCL-assoziiertes X-Protein, *CASP* = Caspase, *DDIT3* = DNA-Schaden-induzierendes Transkript 3, *DNAJC3* = DnaJ (Hsp40) Homolog, *EDEMI* = ER-Abbau-Enhancer, *HERPUD* = Homocystein-induzierte, ER-Stress induzierte, Ubiquitin-ähnliche Domäne 1, *PDIA4* = Protein-Disulfid-Isomerase Familie A4, *HSPA5* = Hitzeschockprotein 70 kDa Protein, *XBPIs* = X-Box bindendes Protein 1 gespleißt

<sup>3</sup>pos- hoc Test (paarweiser Mittelwertvergleich) nicht signifikant p>0,05

a, b, c Signifikanzniveaus Zeit, \* \*\*Signifikanzniveaus Laktation, ap. = antepartum, pp. = postpartum, SE = Standardfehler

Die Ausprägung des ER-Stresses der gesamten Herde war relativ gering, allerdings gab es tierindividuelle Schwankungen, was eine Einteilung der Tiere in Gruppen mit niedriger (n = 11), mittlerer (n = 28) und hoher (n = 11) relativer *HSPA5* Expression ( $1,00 \pm 0,32 / 2,02 \pm$

0,20/ 5,32 ± 0,32) zum Zeitpunkt Woche 1 pp. ermöglicht. Die Einteilung anhand der *HSPA5* Expression spiegelt das Ausmaß des ER-Stresses wider, so zeigten Tiere mit erhöhter *HSPA5* Expression gleichzeitig eine Erhöhung weiterer relevanter Gene der UPR (*ATF4*, *DNAJC3*, *EDEMI*, *HERPUD1*, *HSPA5*, *PDIA4* und *XBPIs*) (Tabelle 3.16). Um die Ursachen von ER-Stress zu identifizieren, wurden diese Gruppen im Folgenden auf Unterschiede im Stoffwechsel untersucht. Des Weiteren wurden Korrelationsanalysen mit allen 50 Tieren zum Zeitpunkt 1 Woche pp. zwischen Genen der UPR und möglichen Einflussfaktoren durchgeführt.

**Tabelle 3.16 relative mRNA-Expressionen<sup>1</sup> von Genen der UPR zum Zeitpunkt 1 Woche pp. bei Tieren mit niedrigem, mittlerem und hohem ER-Stress Level**

(Einteilung anhand der relativen *HSPA5*-Expressionen: 1,00 ± 0,32/ 2,02 ± 0,20/ 5,32 ± 0,32)

	niedriger Stress (n=11)	mittlerer Stress (n=28)	hoher Stress (n=11)	p-Wert
<i>ATF4</i>	1,00 ± 0,07 <sup>a</sup>	1,34 ± 0,05 <sup>b</sup>	1,60 ± 0,07 <sup>c</sup>	< 0,001
<i>BAK1</i>	1,00 ± 0,15	1,01 ± 0,08	0,94 ± 0,13	0,912
<i>BAX</i>	1,00 ± 0,15	1,11 ± 0,08	1,11 ± 0,13	0,785
<i>CASP3</i>	1,00 ± 0,09	1,17 ± 0,05	1,16 ± 0,08	0,246
<i>CASP8</i>	1,00 ± 0,13	1,23 ± 0,08	1,24 ± 0,13	0,289
<i>CASP9</i>	1,00 ± 0,15	1,19 ± 0,08	1,34 ± 0,13	0,223
<i>DDIT3</i>	1,00 ± 0,13	1,17 ± 0,08	1,36 ± 0,13	0,135
<i>DNAJC3</i>	1,00 ± 0,14 <sup>a</sup>	1,20 ± 0,09 <sup>a</sup>	1,72 ± 0,15 <sup>b</sup>	0,003
<i>EDEMI</i>	1,00 ± 0,14 <sup>a</sup>	1,52 ± 0,08 <sup>b</sup>	1,61 ± 0,13 <sup>b</sup>	0,004
<i>HERPUD1</i>	1,00 ± 0,11 <sup>a</sup>	1,40 ± 0,07 <sup>b</sup>	2,10 ± 0,12 <sup>c</sup>	< 0,001
<i>HSPA5</i>	1,00 ± 0,32 <sup>a</sup>	2,02 ± 0,20 <sup>b</sup>	5,32 ± 0,32 <sup>c</sup>	< 0,001
<i>PDIA4</i>	1,00 ± 0,19 <sup>a</sup>	1,18 ± 0,12 <sup>a</sup>	1,88 ± 0,18 <sup>b</sup>	0,003
<i>XBPIs</i>	1,00 ± 0,68 <sup>a</sup>	1,63 ± 0,42 <sup>a</sup>	5,45 ± 0,68 <sup>b</sup>	< 0,001

<sup>1</sup> mRNA-Expressionen relativ zu Gruppe 1 (niedriger ER-Stress) dargestellt

<sup>2</sup> *ATF4*= aktivierender Transkriptionsfaktor 4, *BAK1* = BCL2-Antagonist 1, *BAX* = BCL-assoziertes X-Protein, *CASP* = Caspase, *DDIT3* = DNA-Schaden-induzierendes Transkript 3, *DNAJC3* = DnaJ (Hsp40) Homolog, *EDEMI* = ER-Abbau-Enhancer, *HERPUD* = Homocystein-induzierte, ER-Stress induzierte, Ubiquitin-ähnliche Domäne 1, *PDIA4* = Protein-Disulfid-Isomerase Familie A4, *HSPA5* = Hitzeschockprotein 70 kDa Protein, *XBPIs* = X-Box bindendes Protein 1 gespleißt, a, b, c Signifikanzniveaus

### 3.2.1 Energiebilanz und freie Fettsäuren

Die Expressionen relevanter Gene der UPR zeigten weder signifikanten Korrelationen zu der Energiebilanz noch zu der Konzentration an freien Fettsäuren im Plasma (Anhang, Tabelle 6.11). Tiere mit einem hohen Level an ER-Stress wiesen im Gegensatz zu Tieren mit niedrigem ER-Stress Level numerisch, jedoch nicht signifikant höhere Konzentrationen an freien FS im Plasma auf (Tabelle 3.17).

**Tabelle 3.17 Energiebilanz und Konzentration an freien Fettsäuren (NEFA) zum Zeitpunkt 1 Woche pp. bei Tieren mit niedrigem, mittlerem und hohem ER-Stress Level**

(Einteilung anhand der relativen *HSPA5*-Expressionen:  $1,00 \pm 0,32$ /  $2,02 \pm 0,20$ /  $5,32 \pm 0,32$ )

	niedriger Stress (n=11)	mittlerer Stress (n=28)	hoher Stress (n=11)	p- Wert
NEFA [ $\mu\text{mol/L}$ Plasma]	$416 \pm 70$	$469 \pm 44$	$501 \pm 70$	0,684
Energiebilanz [MJ NEL/Tag]	$-53 \pm 9$	$-61 \pm 6$	$-59 \pm 10$	0,746

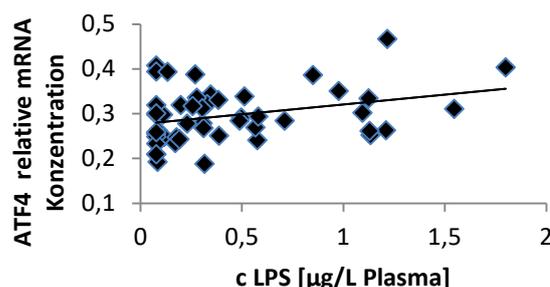
NEFA = nicht veresterte, freie Fettsäuren

### 3.2.2 Lipopolysaccharide

Der Gehalt an Lipopolysacchariden im Plasma war positiv mit der Expression von *ATF4* in der Leber korreliert (Tabelle 3.18, Abbildung 3.4). Korrelationen zu weiteren Expressionen von Genen der UPR wurden nicht festgestellt. Tiere mit hohem ER-Stress zeigten eine numerisch höhere Konzentration an LPS im Plasma, die jedoch nicht signifikant ist (Tabelle 3.19).

**Tabelle 3.18 Korrelationen (nach Pearson) zwischen der LPS-Konzentration im Plasma und hepatischen Expressionen von UPR-Genen bei Holstein Kühen (n = 50) in Woche 1 pp. ( $p < 0,05$ )**

Korrelationskoeffizient (R)	
<i>ATF4</i>	0,319
<i>BAK1</i>	n.s.
<i>BAX</i>	n.s.
<i>CASP3</i>	n.s.
<i>CASP8</i>	n.s.
<i>CASP9</i>	n.s.
<i>DDIT3</i>	n.s.
<i>DNAJC3</i>	n.s.
<i>EDEMI</i>	n.s.
<i>HERPUD1</i>	n.s.
<i>HSPA5</i>	n.s.
<i>PDIA4</i>	n.s.
<i>XBPIs</i>	n.s.



**Abbildung 3.4 Korrelation zwischen der LPS Konzentration im Plasma und Expressionen von *ATF4* in der Leber von Holstein Kühen ( $p < 0,05$ ) in Woche 1 pp. (n = 50)**

*ATF4* = aktivierender Transkriptionsfaktor 4, *BAK1* = BCL2-Antagonist 1, *BAX* = BCL-assoziertes X-Protein, *CASP* = Caspase, *DDIT3* = DNA-Schaden-induzierendes Transkript 3, *DNAJC3* = DnaJ (Hsp40) Homolog, *EDEMI* = ER-Abbau-Enhancer, *HERPUD* = Homocystein-induzierte, ER-Stress induzierte, Ubiquitin-ähnliche Domäne 1, *PDIA4* = Protein-Disulfid-Isomerase Familie A4, *HSPA5* = Hitzeschockprotein 70 kDa Protein, *XBPIs* = X-Box bindendes Protein 1 gespleißt, n.s. = nicht signifikant ( $p > 0,05$ )

**Tabelle 3.19 LPS-Konzentration zum Zeitpunkt 1 Woche pp. bei Tieren mit niedrigem, mittlerem und hohem ER-Stress Level**

(Einteilung anhand der relativen *HSPA5*-Expressionen:  $1,00 \pm 0,32$ /  $2,02 \pm 0,20$ /  $5,32 \pm 0,32$ )

	niedriger Stress (n=11)	mittlerer Stress (n=28)	hoher Stress (n=11)	p- Wert
LPS [ $\mu\text{g/L}$ Plasma]	$0,25 \pm 0,13$	$0,48 \pm 0,08$	$0,54 \pm 0,13$	0,246

LPS = Lipopolysaccharide

### 3.2.3 Inflammation

Wie in Tabelle 3.21 und Tabelle 3.22 dargestellt, zeigten die Expressionen der akute-Phase-Protein-codierenden Gene *SAA*, *HP*, *CP* und *CR* sowie die Expressionen der proinflammatorischen Gene *TNF*, *Il1b*, *PTGS2* sowie *AOAH* positive Korrelationen mit der Expression einiger Gene der UPR ( $p < 0,05$ ). Die Expression der negative akute-Phase-Proteine-codierende Gene (*RBP4* und *TTR*) wiesen inverse Korrelationen zu *HSPA5* und *PDIA4* auf. Bei Tieren mit hohem ER-Stress war die mRNA-Expression von *CP*, *CRP* und *HP* signifikant gesteigert (Tabelle 3.20). Die Konzentrationen an SAA, HP, RBP4 und Albumin im Plasma zeigten (mit Ausnahme der positiven Korrelation zwischen DDIT3 und RBP4 mit  $r = 0,305$ ,  $p = 0,042$ ) keinen Zusammenhang zur UPR (Anhang, Tabelle 6.12).

**Tabelle 3.20 relative mRNA-Expression und Plasmakonzentration von Parametern der Inflammation zum Zeitpunkt 1 Woche pp. bei Tieren mit niedrigem, mittlerem und hohem ER-Stress Level**

(Einteilung anhand der relativen *HSPA5*-Expressionen:  $1,00 \pm 0,32$ /  $2,02 \pm 0,20$ /  $5,32 \pm 0,32$ )

	niedriger Stress (n=11)	mittlerer Stress (n=28)	hoher Stress (n=11)	p-Wert
<u>positive akute-Phase-Proteine-codierende Gene</u>				
<i>SAA</i>	$1,00 \pm 0,35$	$1,09 \pm 0,20$	$1,14 \pm 0,35$	0,960
<i>HP</i>	$1,00 \pm 1,24^a$	$1,70 \pm 0,77^a$	$5,99 \pm 1,24^b$	0,009
<i>CP</i>	$1,00 \pm 0,14^a$	$1,26 \pm 0,08^a$	$1,66 \pm 0,14^b$	0,006
<i>CRP</i>	$1,00 \pm 0,14^a$	$1,13 \pm 0,08^a$	$1,57 \pm 0,13^b$	0,007
<u>negative akute-Phase-Proteine-codierende Gene</u>				
<i>RBP4</i>	$1,00 \pm 0,07$	$0,97 \pm 0,04$	$0,94 \pm 0,06$	0,832
<i>TTR</i>	$1,00 \pm 0,08$	$0,98 \pm 0,05$	$0,83 \pm 0,08$	0,226.
<u>Proinflammatorische Gene</u>				
<i>TNF</i>	$1,00 \pm 0,18$	$1,19 \pm 0,11$	$1,07 \pm 0,17$	0,606
<i>IL1b</i>	$1,00 \pm 0,16$	$1,05 \pm 0,09$	$1,26 \pm 0,16$	0,428
<i>IL8</i>	$1,00 \pm 0,25$	$1,30 \pm 0,15$	$1,61 \pm 0,23$	0,209
<i>PTGS2</i>	$1,00 \pm 0,16$	$1,13 \pm 0,10$	$1,23 \pm 0,16$	0,608
<i>CCL2</i>	$1,00 \pm 0,19$	$1,13 \pm 0,12$	$1,00 \pm 0,20$	0,777
<i>AOAH</i>	$1,00 \pm 0,13$	$1,02 \pm 0,08$	$1,04 \pm 0,13$	0,980
<u>Plasmaparameter</u>				
Albumin [mg/mL]	$26,9 \pm 1,1$	$29,1 \pm 0,6$	$28,3 \pm 1,1$	0,210
<i>SAA</i> [ng/mL Plasma]	$311,5 \pm 23,0$	$322,3 \pm 14,7$	$287,5 \pm 23,0$	0,448
<i>RBP4</i> [ng/mL Plasma]	$1594,4 \pm 126,2$	$1420,5 \pm 76,8$	$1515,4 \pm 120,4$	0,477

*CP* = Ceruloplasmin, *CRP* = C-reaktives Protein, *HP* = Haptoglobin, *SAA* = Serumamyloid A, *TTR* = Transthyretin, *RBP4* = Retinol-bindendes Protein 4, *CCL2* = Chemokin-Ligand 2, *IL1B* = Interleukin 1 beta, *IL8* = Interleukin 8, *PTGS2* = Prostaglandin-Endoperoxid Synthase 2, *TNF* = Tumor-Nekrose Faktor

**Tabelle 3.21 Korrelationen (nach Pearson) zwischen der Expression von Genen der UPR und Akute-Phase-Proteine-codierenden Gene in der Leber von Holstein Kühen in Woche 1 pp. (n = 50)**

	positive akute-Phase-Proteine-codierende Gene				negative akute-Phase-Proteine-codierende Gene	
	<i>SAA</i>	<i>HP</i>	<i>CP</i>	<i>CRP</i>	<i>RBP4</i>	<i>TTR</i>
<i>ATF4</i>	n.s.	0,369	0,390	n.s.	n.s.	n.s.
<i>BAK1</i>	0,526	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>BAX</i>	0,438	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>CASP3</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>CASP8</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>CASP9</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>DDIT3</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>DNAJC3</i>	n.s.	0,342	n.s.	0,514	n.s.	n.s.
<i>EDEMI</i>	n.s.	n.s.	n.s.	0,404	n.s.	n.s.
<i>HERPUD1</i>	n.s.	0,372	0,459	n.s.	n.s.	n.s.
<i>HSPA5</i>	n.s.	n.s.	0,424	n.s.	n.s.	-0,326
<i>PDIA4</i>	0,477	0,725	0,573	0,639	n.s.	-0,353
<i>XBPIs</i>	0,363	0,631	0,656	n.s.	n.s.	n.s.

*ATF4*= aktivierender Transkriptionsfaktor 4, *BAK1* = BCL2-Antagonist 1, *BAX* = BCL-assoziertes X-Protein, *CASP* = Caspase, *DDIT3* = DNA-Schaden-induzierendes Transkript 3, *DNAJC3* = DnaJ (Hsp40) Homolog, *EDEMI* = ER-Abbau-Enhancer, *HERPUD* = Homocystein-induzierte, ER-Stress induzierte, Ubiquitin-ähnliche Domäne 1, *PDIA4* = Protein-Disulfid-Isomerase Familie A4, *HSPA5* = Hitzeschockprotein 70 kDa Protein, *XBPIs* = X-Box bindendes Protein 1 gespleißt, *CP* = Ceruloplasmin, *CRP* = C-reaktives Protein, *HP* = Haptoglobin, *SAA* = Serumamyloid A, *TTR* = Transthyretin, *RBP4* = Retinol-bindendes Protein 4, n.s. = nicht signifikant (p > 0,05)

**Tabelle 3.22 Korrelationen (nach Pearson) zwischen der Expressionen von Genen der UPR und proinflammatorischen Gene in der Leber von Holstein Kühen in Woche 1 pp. (n = 50)**

	<i>TNF</i>	<i>IL1b</i>	<i>PTGS2</i>	<i>IL8</i>	<i>CCL2</i>	<i>AOAH</i>
<i>ATF4</i>	n.s.	0,446	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>BAK1</i>	0,511	0,515	n.s.	n.s.	n.s.	0,503
<i>BAX</i>	0,384	0,382	n.s.	n.s.	n.s.	0,321
<i>CASP3</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>CASP8</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>CASP9</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>DDIT3</i>	n.s.	n.s.	0,377	n.s.	n.s.	-0,340
<i>DNAJC3</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>EDEMI</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>HERPUD1</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>HSPA5</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>PDIA4</i>	n.s.	0,306	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>XBPIspl</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

*ATF4*= aktivierender Transkriptionsfaktor 4, *BAK1* = BCL2-Antagonist 1, *BAX* = BCL-assoziertes X-Protein, *CASP* = Caspase, *DDIT3* = DNA-Schaden-induzierendes Transkript 3, *DNAJC3* = DnaJ (Hsp40) Homolog, *EDEMI* = ER-Abbau-Enhancer, *HERPUD* = Homocystein-induzierte, ER-Stress induzierte, Ubiquitin-ähnliche Domäne 1, *PDIA4* = Protein-Disulfid-Isomerase Familie A4, *HSPA5* = Hitzeschockprotein 70 kDa Protein, *XBPIs* = X-Box bindendes Protein 1 gespleißt, *CCL2* = Chemokin-Ligand 2, *IL1B* = Interleukin 1 beta, *IL8* = Interleukin 8, *PTGS2* = Prostaglandin-Endoperoxid Synthase 2, *TNF* = Tumor-Nekrose Faktor, n.s. = nicht signifikant (p > 0,05)

### 3.2.4 Oxidativer Stress

Zwischen den Parametern des oxidativen Stresses und den Genexpressionen der UPR waren sowohl vereinzelte positive als auch inverse Korrelationen erkennbar (Tabelle 3.23). Tiere mit niedrigem ER Stress zeigten im Vergleich zu Tieren mit hohem ER-Stress keine signifikanten Unterschiede in ihrer Konzentration an oxidativen und antioxidativen Markern im Plasma (Tabelle 3.24).

**Tabelle 3.23 Korrelationen (nach Pearson) zwischen der Expression von Genen der UPR in der Leber und Parametern des oxidativen Status im Plasma von Holstein Kühen ( $p < 0,05$ ) in Woche 1 pp. (n = 50)**

	$\beta$ -Carotin	Retinol	$\alpha$ -Tocopherol	$\gamma$ -Tocopherol	TBARS	TEAC	Protein-carbonyle
<i>ATF4</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>BAK1</i>	-0,304	-0,304	-0,306	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>BAX</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>CASP3</i>	n.s.	n.s.	n.s.	0,300	n.s.	n.s.	n.s.
<i>CASP8</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0,392
<i>CASP9</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>DDIT3</i>	0,313	0,296	0,364	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>DNAJC3</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0,369
<i>EDEMI</i>	n.s.	0,297	n.s.	n.s.	0,309	n.s.	n.s.
<i>HERPUDI</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>HSPA5</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>PDIA4</i>	n.s.	-0,324	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0,404
<i>XBPIs</i>	n.s.	-0,313	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

*ATF4*= aktivierender Transkriptionsfaktor 4, *BAK1* = BCL2-Antagonist 1, *BAX* = BCL-assoziertes X-Protein, *CASP* = Caspase, *DDIT3* = DNA-Schaden-induzierendes Transkript 3, *DNAJC3* = DnaJ (Hsp40) Homolog, *EDEMI* = ER-Abbau-Enhancer, *HERPUDI* = Homocystein-induzierte, ER-Stress induzierte, Ubiquitin-ähnliche Domäne 1, *PDIA4* = Protein-Disulfid-Isomerase Familie A4, *HSPA5* = Hitzeschockprotein 70 kDa Protein, *XBPIs* = X-Box bindendes Protein 1 gespleißt, TEAC = Trolox-äquivalente antioxidative Kapazität, TBARS = Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen, n.s. = nicht signifikant

**Tabelle 3.24 Parameter des oxidativen Stresses zum Zeitpunkt 1 Woche pp bei Tieren mit niedrigem, mittlerem und hohem ER-Stress Level**

(Einteilung anhand der relativen *HSPA5*-Expressionen:  $1,00 \pm 0,32$ /  $2,02 \pm 0,20$ /  $5,32 \pm 0,32$ )

	niedriger Stress (n=11)	mittlerer Stress (n=28)	hoher Stress (n=11)	p- Wert
$\alpha$ -Tocopherol [ $\mu\text{mol/g}$ Lipid]	$6,29 \pm 0,80$	$5,28 \pm 0,51$	$5,74 \pm 0,84$	0,563
$\gamma$ -Tocopherol [ $\mu\text{mol/g}$ Lipid]	$0,16 \pm 0,02^a$	$0,11 \pm 0,01^b$	$0,13 \pm 0,02^{ab}$	0,045
$\beta$ -Carotin [ $\mu\text{mol/g}$ Lipid]	$15,43 \pm 1,53$	$11,25 \pm 0,91$	$11,76 \pm 1,53$	0,071
Retinol [ $\mu\text{mol/g}$ Lipid]	$0,84 \pm 0,08$	$0,77 \pm 0,05$	$0,68 \pm 0,08$	0,381
TEAC [mmol/L Plasma]	$3,65 \pm 0,13$	$3,67 \pm 0,09$	$3,55 \pm 0,13$	0,769
TBARS [ $\mu\text{mol/L}$ Plasma]	$0,79 \pm 0,04$	$0,84 \pm 0,03$	$0,80 \pm 0,05$	0,492
Proteincarbonyle [nmol/mg Protein]	$0,24 \pm 0,03$	$0,31 \pm 0,02$	$0,30 \pm 0,04$	0,175

TEAC = Trolox-äquivalente antioxidative Kapazität, TBARS = Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen

### 3.2.5 Calcium- und Vitamin D Stoffwechsel

Tiere mit niedrigem, mittlerem und hohem Level an ER-Stress zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Plasma-Parametern des Calcium-Stoffwechsels (Tabelle 3.25). Die hepatische Expression von *CYP2R1* war bei Tieren mit hohem ER-Stress tendenziell gegenüber Tieren mit niedrigem ER-Stress gesteigert ( $p < 0,01$ ). Zum Zeitpunkt 1 Woche pp. korrelierten die mRNA-Konzentrationen der für die Induktion der Apoptose relevanten Gene *BAK1*, *BAX* und *CASP9* positiv mit der Phosphat Konzentration im Plasma (Tabelle 3.26). Des Weiteren waren einzelne positive Korrelationen von *CASP9* mit 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub> und 1, 25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> sowie zwischen *BAK1* und 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub> zu beobachten während die Expression von *CYP2R1* mit *CASP3* und *DNAJC3* korrelierte.

**Tabelle 3.25 Parameter des Calciumstoffwechsels zum Zeitpunkt 1 Woche pp. bei Tieren mit niedrigem, mittlerem und hohem ER-Stress Level**

(Einteilung anhand der relativen *HSPA5*-Expressionen:  $1,00 \pm 0,32$ /  $2,02 \pm 0,20$ /  $5,32 \pm 0,32$ )

	niedriger Stress (n=11)	mittlerer Stress (n=28)	hoher Stress (n=11)	p- Wert
Calcium [nmol/L Plasma]	$2,47 \pm 0,04$	$2,47 \pm 0,03$	$2,46 \pm 0,04$	0,964
CYP2R1 (Genexpression)	$1,00 \pm 0,08$	$1,12 \pm 0,04$	$1,24 \pm 0,07$	0,076
PTH [ng/L Plasma]	$77,7 \pm 37,5$	$81,0 \pm 21,2$	$86,3 \pm 35,5$	0,986
DHVD3 [pmol/L Plasma]	$43,4 \pm 5,6$	$36,0 \pm 3,3$	$34,4 \pm 5,3$	0,442
FGF23 [ng/L Plasma]	$103,8 \pm 19,4$	$96,3 \pm 11,8$	$112,5 \pm 19,4$	0,769
HVD3 [nmol/L Plasma]	$161,7 \pm 19,1$	$170,7 \pm 10,8$	$163,2 \pm 19,1$	0,893
Phosphat [nmol/L Plasma]	$1,25 \pm 0,10$	$1,33 \pm 0,06$	$1,46 \pm 0,09$	0,287

FGF23 = *Fibroblast growth factor 23*, PTH = Parathormon, HVD3 = 25-Hydroxycholecalciferol, DHVD3 = 1, 25-Dihydroxycholecalciferol, CYP2R1 = Vitamin-D<sub>3</sub>-25-Hydroxylase

**Tabelle 3.26 Korrelationskoeffizient (nach Pearson) zwischen der hepatischen Expressionen von Genen der UPR und Parametern des Calcium- und Vitamin D Stoffwechsels bei Holstein Kühen (n = 50) in Woche 1 pp. (p < 0,05)**

	Calcium	Phosphat	HVD3	DHVD3	PTH	FGF23	CYP2R1
<i>ATF4</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>BAK1</i>	n.s.	0,329	0,437	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>BAX</i>	n.s.	0,291	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>CASP3</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0,452
<i>CASP8</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>CASP9</i>	n.s.	0,494	0,391	0,330	n.s.	n.s.	n.s.
<i>DDIT3</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>DNAJC3</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0,401
<i>EDEMI</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>HERPUD1</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>HSPA5</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>PDIA4</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>XBPIspl</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

*ATF4* = aktivierender Transkriptionsfaktor 4, *BAK1* = BCL2-Antagonist 1, *BAX* = BCL-assoziertes X-Protein, *CASP* = Caspase, *DDIT3* = DNA-Schaden-induzierendes Transkript 3, *DNAJC3* = DnaJ (Hsp40) Homolog, *EDEMI* = ER-Abbau-Enhancer, *HERPUD* = Homocystein-induzierte, ER-Stress induzierte, Ubiquitin-ähnliche Domäne 1, *PDIA4* = Protein-Disulfid-Isomerase Familie A4, *HSPA5* = Hitzeschockprotein 70 kDa Protein, *XBPIs* = X-Box bindendes Protein 1 gespleißt, *FGF23* = *Fibroblast growth factor 23*, *PTH* = Parathormon, *HVD3* = 25-Hydroxycholecalciferol, *DHVD3* = 1, 25-Dihydroxycholecalciferol, *CYP2R1* = Vitamin-D<sub>3</sub>-25-Hydroxylase

### 3.2.6 UPR und FGF21

Die hepatische Expression des Stresshormons *FGF21* war mit der Expression von *ATF4* und *HSPA5* korreliert (Tabelle 3.28), während die Konzentration des FGF21-Proteins im Plasma keine Korrelationen zu Genen der UPR zeigte. Tiere mit hohem ER-Stress wiesen im Vergleich zu Tieren mit niedrigem ER-Stress eine um Faktor 6,65 gesteigerte Expression an *FGF21* auf, unterschieden sich jedoch nicht in der FGF21- Konzentration im Plasma (Tabelle 3.27).

**Tabelle 3.27 relative hepatische Expression und Plasmakonzentration an FGF21 zum Zeitpunkt 1 Woche pp. bei Tieren mit niedriger ( $1,00 \pm 0,32$ ), mittlerer ( $2,02 \pm 0,20$ ) und hoher ( $5,32 \pm 0,32$ ) relativer *HSPA5* Expression**

	niedriger Stress (n=11)	mittlerer Stress (n=28)	hoher Stress (n=11)	p-Wert
<i>FGF21 [pg/mL Plasma]</i>	900 ± 244	583 ± 156	896 ± 270	0,427
<i>FGF21(Genexpression)</i>	1,00 ± 1,54 <sup>a</sup>	3,18 ± 0,92 <sup>ab</sup>	6,65 ± 1,47 <sup>b</sup>	0,033

FGF21 = Fibroblast growth factor 21

**Tabelle 3.28 Korrelationen (nach Pearson) zwischen der Expressionen von Genen der UPR und FGF21 in der Leber von Holstein Kühen (n = 50) in Woche 1 pp. (p < 0,05)**

	<b>Korrelationskoeffizient</b>
<i>ATF4</i>	0,496
<i>BAK1</i>	n.s.
<i>BAX</i>	n.s.
<i>CASP3</i>	n.s.
<i>CASP8</i>	n.s.
<i>CASP9</i>	n.s.
<i>DDIT3</i>	n.s.
<i>DNAJC3</i>	n.s.
<i>EDEMI</i>	n.s.
<i>FGF21</i>	n.s.
<i>HERPUDI</i>	n.s.
<i>HSPA5</i>	0,438
<i>PDIA4</i>	n.s.
<i>XBPIs</i>	n.s.

*ATF4*= aktivierender Transkriptionsfaktor 4, *BAK1* = BCL2-Antagonist 1, *BAX* = BCL-assoziertes X-Protein, *CASP* = Caspase, *DDIT3* = DNA-Schaden-induzierendes Transkript 3, *DNAJC3* = DnaJ (Hsp40) Homolog, *EDEMI* = ER-Abbau-Enhancer, *HERPUDI* = Homocystein-induzierte, ER-Stress induzierte, Ubiquitin-ähnliche Domäne 1, *PDIA4* = Protein-Disulfid-Isomerase Familie A4, *HSPA5* = Hitzeschockprotein 70 kDa Protein, *XBPIs* = X-Box bindendes Protein 1 gespleißt, n.s. = nicht signifikant (p > 0,05)

### 3.2.7 UPR, FGF21 und Nrf2-Weg

In Tabelle 3.29 sind Korrelationen zwischen der relativen mRNA-Expression von Genen der UPR sowie von *FGF21* mit Zielgenen des Nrf2 aufgeführt. Überwiegend waren positive Korrelationen von Nrf2-Zielgenen und UPR Genen zu beobachten. Eine Ausnahme bildeten die inversen Korrelationen von *DDIT3* und *EDEMI* mit Zielgenen des NRF2. Zwischen der *FGF21*- Expression in der Leber und *CAT* war ebenfalls eine inverse Korrelation zu beobachten. Tiere mit einem hohen Level an ER-Stress wiesen gegenüber Tieren mit niedrigem ER-Stress signifikant höhere Level an *MT1A* auf. Zusätzlich war die Expression von *GPXI* tendenziell erhöht (p < 0,1) (Tabelle 3.30).

**Tabelle 3.29 Korrelationen (nach Pearson) zwischen der Expressionen von Genen der UPR und Nrf2-Zielgenen in der Leber und von Holstein Kühen (n = 50) in Woche 1 pp. (p < 0,05)**

	<i>MT1A</i>	<i>SOD1</i>	<i>UGT1A1</i>	<i>GPXI</i>	<i>CAT</i>	<i>NQO1</i>
<i>ATF4</i>	0,351	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>BAK1</i>	n.s.	n.s.	n.s.	0,584	n.s.	n.s.
<i>BAX</i>	n.s.	n.s.	n.s.	0,328	n.s.	n.s.
<i>CASP3</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>CASP8</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>CASP9</i>	n.s.	n.s.	n.s.	0,387	n.s.	n.s.
<i>DDIT3</i>	n.s.	n.s.	-0,443	-0,380	-0,406	-0,347
<i>DNAJC3</i>	0,333	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>EDEMI</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	-0,343
<i>HERPUD1</i>	0,467	n.s.	n.s.	0,623	n.s.	0,374
<i>HSPA5</i>	0,377	0,324	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>PDIA4</i>	0,722	0,380	n.s.	0,438	n.s.	n.s.
<i>XBPIspl</i>	0,685	0,364	n.s.	0,464	n.s.	0,339
<i>FGF21</i> (mRNA)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	-0,316	n.s.
<i>FGF21</i> (Plasma)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

*ATF4*= aktivierender Transkriptionsfaktor 4, *BAK1* = BCL2-Antagonist 1, *BAX* = BCL-assoziertes X-Protein, *CASP* = Caspase, *DDIT3* = DNA-Schaden-induzierendes Transkript 3, *DNAJC3* = DnaJ (Hsp40) Homolog, *EDEMI* = ER-Abbau-Enhancer, *HERPUD* = Homocystein-induzierte, ER-Stress induzierte, Ubiquitin-ähnliche Domäne 1, *PDIA4* = Protein-Disulfid-Isomerase Familie A4, *HSPA5* = Hitzeschockprotein 70 kDa Protein, *XBPIs* = X-Box bindendes Protein 1 gespleißt, *FGF21* = Fibroblast growth factor 21, *CAT* = Catalase, *GPXI* = Glutathionperoxidase, *MT1A* = Metallothionein-1A, *SOD1* = Superoxid-Dismutase 1, *UGT1A1* = UDP-Glucuronosyltransferase 1 A1, *NQO1* =NAD(P)H Dehydrogenase, Quinon 1, n.s. = nicht signifikant (p > 0,05)

**Tabelle 3.30 relative Expression von Nrf2-Zielgenen zum Zeitpunkt 1 Woche pp. bei Tieren mit niedrigem, mittlerem und hohem ER-Stress Level**

(Einteilung anhand der relativen *HSPA5*-Expressionen: 1,00 ± 0,32/ 2,02 ± 0,20/ 5,32 ± 0,32)

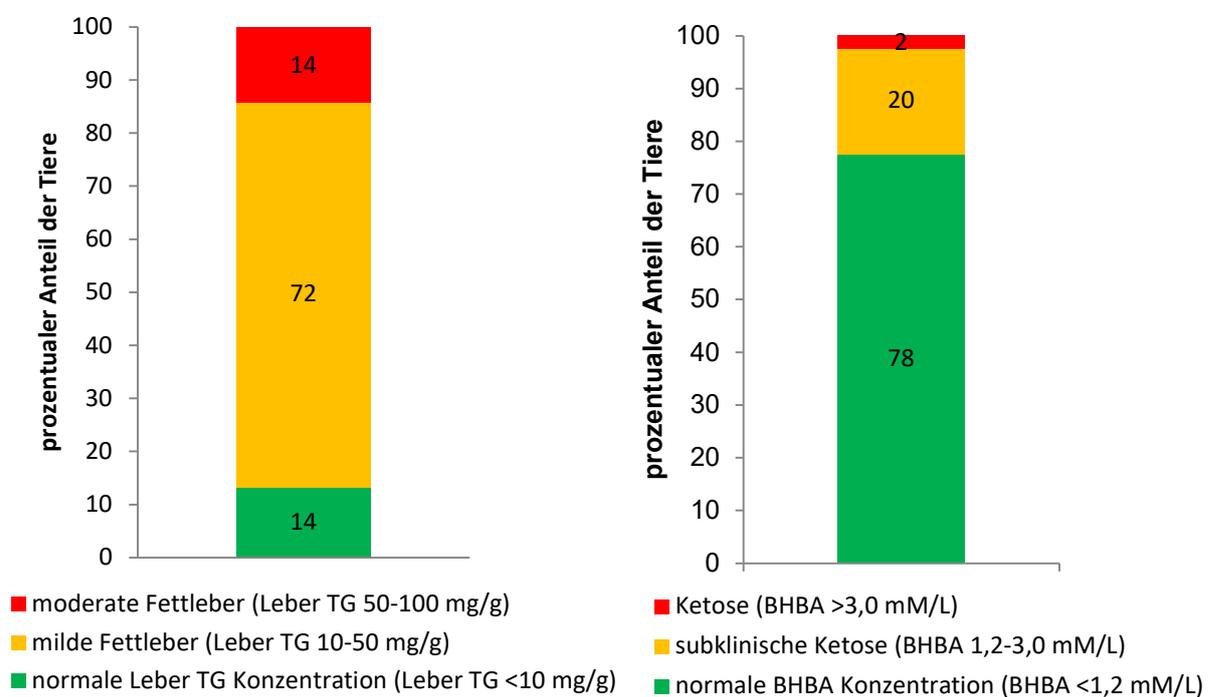
	niedriger Stress (n=11)	mittlerer Stress (n=28)	hoher Stress (n=11)	p-Wert
<i>CAT</i>	1,00 ± 0,09	1,07 ± 0,06	1,01 ± 0,09	0,763
<i>GPXI</i>	1,00 ± 0,13	1,11 ± 0,08	1,43 ± 0,13	0,061
<i>MT1A</i>	1,00 ± 1,20 <sup>a</sup>	1,70 ± 0,73 <sup>a</sup>	5,77 ± 1,20 <sup>b</sup>	0,011
<i>NQO1</i>	1,00 ± 0,11	1,17 ± 0,07	1,24 ± 0,10	0,251
<i>SOD1</i>	1,00 ± 0,05	1,04 ± 0,03	1,15 ± 0,05	0,140
<i>UGT1A1</i>	1,00 ± 0,08	1,16 ± 0,05	1,10 ± 0,08	0,265

*CAT* = Catalase, *GPXI* = Glutathionperoxidase, *MT1A* = Metallothionein-1A, *SOD1* = Superoxid-Dismutase 1, *UGT1A1* = UDP-Glucuronosyltransferase 1 A1, *NQO1* =NAD(P)H Dehydrogenase, Quinon 1

### 3.3 Entstehung von Fettleber und Ketose

Der Anteil der von Fettleber und Ketose betroffenen Tiere im Zeitraum 1 - 4 Wochen pp. ist in Abbildung 3.5 dargestellt. Bei 14% der Tiere wurden Leber-TG Konzentrationen von  $\geq 50$  mg/g nachgewiesen und somit die Entwicklung einer moderaten Fettleber festgestellt. 72% der Kühe zeigten eine milde Fettleber (Leber-TG Konzentration 10-50 mg/g).

Anhand der Konzentration von BHBA im Plasma wurde bei 2% der Tiere eine klinische Ketose diagnostiziert, während in Woche 1 und 4 bei insgesamt 20% der Tiere eine subklinische Ketose auftrat. 71% der Tiere mit einer moderaten Fettleber entwickelten zusätzlich eine subklinische Ketose.



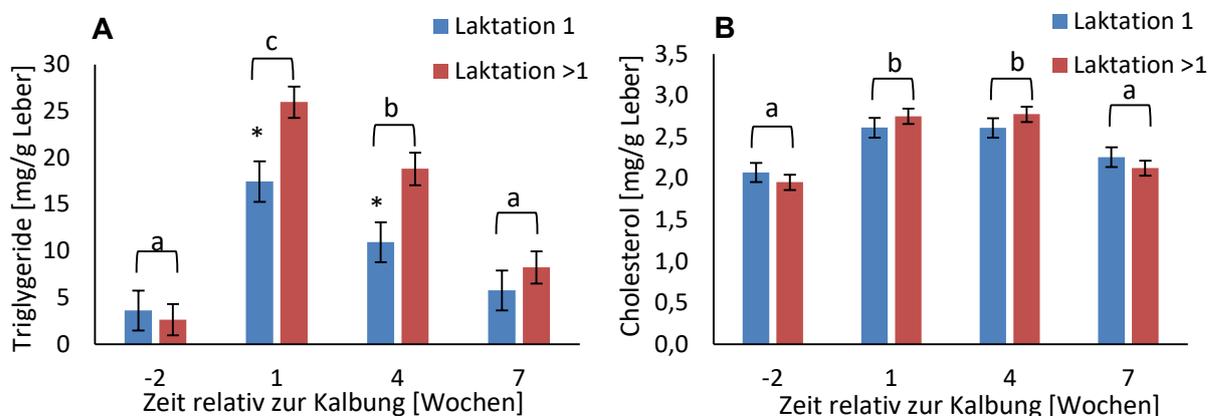
**Abbildung 3.5 Anteil der Tiere (n=50) mit Fettleber und Ketose im Zeitraum von Woche 1 bis 4 postpartum**

#### 3.3.1 Entstehung der Fettleber

##### 3.3.1.1 Lipidstoffwechsel während der Frühaktation

Die Ergebnisse der Bestimmung der Triglycerid- und Cholesterolkonzentration in der Leber sind in Abbildung 3.6 dargestellt. In der ersten Woche pp. kam es in der Leber zu einem signifikanten Anstieg der Triglycerid- und Cholesterolkonzentration ( $p < 0,001$ ). Während die TG Konzentration in der Leber in Woche 4 pp. bereits wieder rückläufig war, hielt die Erhöhung der Cholesterolkonzentration zunächst weiter an und erreichte erst in Woche 7 pp. wieder das Ausgangsniveau. Bei höher laktierenden Tieren war nach der Abkalbung ein stärkerer Anstieg der Triglycerid-Konzentration zu beobachten. So wiesen diese Tiere in

Woche 4 und 7 Wochen pp. in der Leber signifikant höhere Triglycerid-Konzentrationen als Färsen auf. Die Laktationsgruppe hatte jedoch keinen Einfluss auf die Cholesterolkonzentration in der Leber.



**Abbildung 3.6 A) Triglycerid-Konzentration und B) Cholesterolkonzentrationen in der Leber von Holstein-Kühen während der peripartalen Phase (Ismeans ± Standardfehler) (Laktation 1: n = 19, Laktation > 1: n = 31)**

a, b, c: Signifikanzniveaus Zeitpunkt, p-Wert < 0,001; \*: Signifikanzniveaus Laktation, p-Wert < 0,05

### Lipogenese

Zur Untersuchung der Ausprägung der hepatischen Lipogenese während der peripartalen Phase wurden Expressionsanalysen relevanter Gene in den Leberproben durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.31 dargestellt.

**Tabelle 3.31 Relative mRNA-Konzentration von Genen der Lipogenese in der Leber von Holstein-Kühen (n = 50) während der peripartalen Phase<sup>1</sup>**

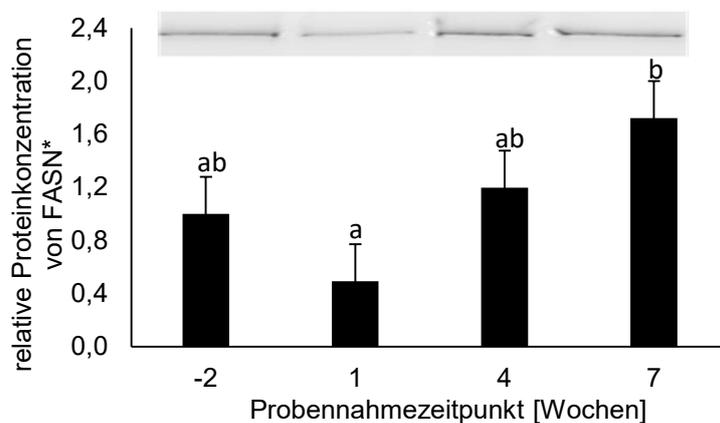
Gen <sup>2</sup>	Woche 2 ap.	Woche 1 pp.	Woche 4 pp.	Woche 7 pp.	SE	p-Wert Zeit	p-Wert Laktation
<i>ACACA</i>	1,00 <sup>ab</sup>	0,75 <sup>a</sup>	1,57 <sup>bc</sup>	2,07 <sup>c</sup>	0,19	<0,001	0,008
<i>Laktation 1</i>	0,75	0,68	1,33	1,48*	0,29		
<i>Laktation &gt;1</i>	1,25	0,83	1,80	2,66**	0,23		
<i>FASN</i>	1,00 <sup>a</sup>	0,91 <sup>a</sup>	1,37 <sup>ab</sup>	1,81 <sup>b</sup>	0,15	<0,001	0,256
<i>GPAM</i>	1,00 <sup>b</sup>	0,75 <sup>a</sup>	0,99 <sup>ab</sup>	1,03 <sup>b</sup>	0,07	0,005	0,138
<i>SLC27A1</i>	1,00	1,05	1,17	1,07	0,06	0,177	0,812
<i>SREBF1</i>	1,00 <sup>b</sup>	0,61 <sup>a</sup>	0,92 <sup>b</sup>	0,90 <sup>b</sup>	0,08	<0,001	0,130

<sup>1</sup> mRNA-Expressionen relativ zum Zeitpunkt zwei Wochen antepartum dargestellt

<sup>2</sup>*ACACA* = Acetyl-CoA-Carboxylase  $\alpha$ , *FASN* = Fettsäuresynthase, *GPAM* = Glycerol-3-phosphat-Acyltransferase, mitochondrial, *SLC27A1* = SLC-Transporter für langkettige Fettsäuren, *SREBF1* = Sterol-regulatorisches-Element-bindender Transkriptionsfaktor 1, SE = Standardfehler

a, b, c Signifikanzniveaus Zeit, \* \*\*Signifikanzniveaus Laktation, ap: antepartum, pp: postpartum

Die Expression des *Sterol-regulatorisches-Element* - bindenden Transkriptionsfaktor 1 (*SREBF1*), dem Master-Regulator der Fettsäuresynthese sowie dessen Zielgene Acetyl-CoA-Carboxylase (*ACACA*), Fettsäuresynthase (*FASN*) und Glycerol-3-phosphat-Acyltransferase (*GPAM*) waren in Woche 1 pp. (signifikant) niedriger als in Woche 2 ap. Im späteren Verlauf der Laktation wurden diese Gene wieder stärker exprimiert. In Woche 7 pp. lagen die Expressionen von *ACACA* und *FASN* oberhalb des Ausgangswertes, während bei *GPAM* und *SERBF1* das Ausgangsniveau wieder erreicht wurde. Die Expression der *FASN* konnte mittels Western Blot auf Proteinebene bestätigt werden (Abbildung 3.7). Mehrkalbskühe zeigten in Woche 7 pp. gegenüber erstlaktierenden Tieren eine erhöhte Expression der *ACACA*, während die Laktationsnummer die Expressionen der weiteren Gene nicht beeinflusste. Die Expression des SLC-Transporters für langkettige Fettsäuren (*SLC27A1*) hingegen wurde weder im Verlauf der Laktation noch in Abhängigkeit der Laktationsnummer beeinflusst.



**Abbildung 3.7 relative Proteinkonzentration von FASN in der Leber (semiquantitative Bestimmung mittels Western Blot von n = 9 Tieren)**

\*Werte sind relativ zum Zeitpunkt zwei Wochen antepartum dargestellt, (lsmeans  $\pm$  Standardfehler)  
oben: exemplarisches Bild des Western Blots

### $\beta$ -Oxidation

Um den Abbau der Fettsäuren mittels  $\beta$ -Oxidation zu betrachten, wurden die relativen mRNA-Expressionen der Acyl-CoA-Dehydrogenase (*ACADM*), der Acyl-CoA-Oxidase 1 (*ACOX*) und der Carnitin-Palmitoyl-transferase 1A (*CPT1A*) gemessen (Tabelle 3.32).

**Tabelle 3.32 Relative mRNA-Konzentration von Genen der  $\beta$ -Oxidation in der Leber von Holstein-Kühen<sup>1</sup> (n = 50)**

Gen <sup>2</sup>	Woche 2 ap.	Woche 1 pp.	Woche 4 pp.	Woche 7 pp.	SE	p-Wert Zeit	p-Wert Laktation
<i>ACADM</i>	1,00 <sup>a</sup>	1,17 <sup>ab</sup>	1,28 <sup>b</sup>	1,16 <sup>ab</sup>	0,06	0,002	0,468
<i>ACOX</i>	1,00 <sup>a</sup>	1,02 <sup>ab</sup>	1,16 <sup>b</sup>	1,15 <sup>ab</sup>	0,05	0,006	0,158
<i>CPT1A</i>	1,00 <sup>a</sup>	1,07 <sup>a</sup>	1,36 <sup>b</sup>	1,09 <sup>ab</sup>	0,08	0,003	0,382

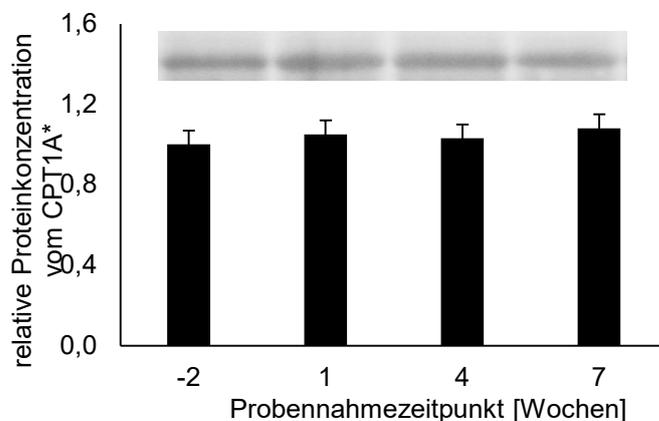
<sup>1</sup> mRNA-Expressionen relativ zum Zeitpunkt zwei Wochen antepartum dargestellt

<sup>2</sup> *ACADM* = Acyl-CoA-Dehydrogenase, *ACOX1* = Acyl-CoA-Oxidase 1, *CPT1A* = Carnitin-Palmitoyl-transferase 1A,

a, b, c Signifikanzniveaus Zeit, ap. antepartum, pp. postpartum, SE: Standardfehler

Nach der Abkalbung stiegen die Expressionen der Gene der  $\beta$ -Oxidation an. In Woche 4 nach der Abkalbung waren die Expressionen signifikant gegenüber Woche 2 ap. erhöht und waren anschließend wieder rückläufig (Tabelle 3.32). Die Laktationsnummer hatte keinen Einfluss auf die Expression dieser Gene.

Ergänzend zu den Genexpressionen wurde die Proteinkonzentration von *CPT1A* in der Leber mittels Western Blot semiquantitativ bestimmt. Der Anstieg der Proteinkonzentration nach der Abkalbung war nicht signifikant, was an der geringeren Anzahl an untersuchten Tieren (n = 9) oder der geringeren Sensitivität der Methode liegen könnte (Abbildung 3.8).



**Abbildung 3.8 relative Proteinkonzentration von CPT1A in der Leber (semiquantitative Bestimmung mittels Western Blot von n = 9 Tieren)**

\*Werte sind relativ zum Zeitpunkt zwei Wochen antepartum dargestellt (Ismeans  $\pm$  Standardfehler)

oben: exemplarisches Bild des Western Blots

### VLDL-Bildung

Triglyceride können aus der Leber in Form von VLDL ausgeschleust werden. Die Bildung von VLDL ist von der *ApoB* - Konzentration abhängig, da dieses die Hauptkomponente der

Plasmalipoproteine darstellt (Bernabucci et al. 2004). In der ersten Woche nach der Abkalbung war die mRNA-Konzentration des *ApoB* gegenüber Woche 2 ap., sowie gegenüber der späteren Laktation signifikant erniedrigt (Tabelle 3.33). Die Expression des mikrosomale Triglycerid - Transferproteins (*MTTP*), das bei dem Transport und auch dem Einbau von TG und Cholesterol in die Plasmalipoproteine eine Rolle spielt (Wetterau et al. 1991), blieb über die peripartale Phase hingegen unverändert. Die Laktationsnummer hatte keinen Einfluss auf die Expressionen von *ApoB* oder *MTTP*.

**Tabelle 3.33 Relative mRNA-Konzentration von Genen der VLDL-Bildung in der Leber von Holstein-Kühen<sup>1</sup> (n = 50)**

Gen <sup>2</sup>	Woche 2 ap.	Woche 1 pp.	Woche 4 pp.	Woche 7 pp.	SE	p-Wert Zeit	p-Wert Laktation
<i>APOB</i>	1,00 <sup>b</sup>	0,81 <sup>a</sup>	1,07 <sup>b</sup>	1,03 <sup>b</sup>	0,06	0,001	0,826
<i>MTTP</i>	1,00	1,08	1,06	0,95	0,06	0,366	0,329

<sup>1</sup> mRNA-Expressionen relativ zum Zeitpunkt zwei Wochen antepartum dargestellt

<sup>2</sup>*APOB* = Apolipoprotein B, *MTTP* = mikrosomales TG-Transferprotein

a, b, c Signifikanzniveaus Zeit (P < 0,05), ap. = antepartum, pp = postpartum, SE = Standardfehler

### 3.3.1.2 Ursachen für die Entstehung der Fettleber

Um Zusammenhänge zwischen der Entwicklung einer Fettleber und möglichen Risikofaktoren aufzudecken, erfolgte ein Vergleich der Tiergruppen mit moderater Fettleber (Leber TG  $\geq$  50 mg/g, n = 7), milder Fettleber (Leber TG 10 - 50 mg/g, n = 36) und Leber TG Konzentrationen im Normbereich (Leber TG < 10 mg/g, n = 7) hinsichtlich möglicher Einflussparameter. Zusätzlich wurden in Woche 1 pp. Korrelationsanalysen zwischen den Parametern des Fettstoffwechsels und möglichen Einflussfaktoren durchgeführt. Die Ergebnisse des Gruppenvergleichs sowie der Korrelationsanalysen werden im Folgenden beschrieben.

#### ER-Stress und Lipidstoffwechsel

In der vorliegenden Studie wurden positive Korrelationen der Triglycerid- sowie der Cholesterolkonzentration in der Leber mit den Expressionen einzelner Gene der UPR (*DNAJC3*, *HSPA5*, *PDIA4* und *CASP8*) beobachtet (Tabelle 3.34). Des Weiteren zeigten Tiere mit einer moderaten Fettleber signifikant höhere Expressionen der Gene *DDIT3*, *HSPA5* und *HERPUD1* sowie numerisch, jedoch nicht signifikant höher Expressionsraten für *DNAJC3* und *XBPIs* (Tabelle 3.35). Umgekehrt war bei Tieren mit höherem ER-Stress eine signifikante Erhöhung der Konzentration an TG und Cholesterol in der Leber feststellbar (Tabelle 3.36). Diese

Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Anreicherung von TG und Cholesterol in der Leber mit dem Auftreten von ER-Stress assoziiert ist.

**Tabelle 3.34 Korrelationen zwischen Expressionen von Genen der UPR und Parametern des Fettstoffwechsels in Woche 1 pp. (n = 50, dargestellt sind nur signifikante Korrelationen  $p < 0,05$ )**

	<b>Gene der UPR<sup>1</sup> (Korrelationskoeffizient R)</b>
TG [mg/g Leber]	<i>DNAJC3</i> (0,379), <i>HSPA5</i> (0,360)
Cholesterol [mg/g Leber]	<i>CASP8</i> (0,313), <i>DNAJC3</i> (0,541), <i>PDIA4</i> (0,368)
TG [mg/dL Plasma]	n.s.
Cholesterol [mg/dL]	<i>BAX</i> (-0,304)
<b><u>β-Oxidation</u></b>	
<i>ACADM</i>	<i>BAK</i> (-0,397), <i>CASP3</i> (0,395), <i>CASP8</i> (0,482), <i>DDIT3</i> (0,359), <i>DNAJC3</i> (0,396), <i>EDEMI</i> (0,441)
<i>ACOX</i>	<i>DDIT3</i> (-0,291), <i>PDIA4</i> (-0,288)
<i>CPT1A</i>	<i>BAK1</i> (-0,318), <i>CASP3</i> (0,322), <i>CASP8</i> (0,458), <i>DDIT3</i> (0,556), <i>EDEMI</i> (0,517), <i>HERPUD1</i> (-0,364), <i>XBPIs</i> (-0,369)
<b><u>Lipogenese</u></b>	
<i>ACACA</i>	<i>DDIT3</i> (0,401), <i>EDEMI</i> (0,519)
<i>FASN</i>	<i>CASP8</i> (0,443), <i>DDIT3</i> (0,390), <i>EDEMI</i> (0,379)
<i>GPAM</i>	<i>CASP3</i> (0,433), <i>CASP8</i> (0,490), <i>DDIT3</i> (0,381), <i>EDEMI</i> (0,518), <i>XBPIs</i> (-0,370)
<i>SLC27A1</i>	n.s.
<i>SREBF1</i>	<i>CASP3</i> (0,345), <i>CASP8</i> (0,299), <i>EDEMI</i> (0,591)
<b><u>VLDL-Ausschleusung</u></b>	
<i>APOB</i>	<i>CASP3</i> (0,502), <i>CASP8</i> (0,448), <i>DDIT3</i> (0,426), <i>EDEMI</i> (0,642)
<i>MTTP</i>	<i>CASP3</i> (0,427), <i>CASP8</i> (0,512), <i>DNAJC3</i> (0,461), <i>EDEMI</i> (0,508), <i>PDIA4</i> (0,385)

<sup>1</sup>*ATF4*, *BAK1*, *BAX*, *CASP3*, *CASP8*, *CASP9*, *HSPA5*, *DDIT3*, *EDEMI*, *PDIA4*, *HERPUD1*, *DNAJC3*, *XBPIs* <sup>2</sup>*ACACA* = Acetyl-CoA-Carboxylase  $\alpha$ , *FASN* = Fettsäuresynthase, *GPAM* = Glycerol-3-phosphat-Acyltransferase, mitochondrial, *SLC27A1* = SLC-Transporter für langkettige Fettsäuren, *SREBF1* = Sterol-regulatorisches-Element-bindender Transkriptionsfaktor 1, *ACADM* = Acyl-CoA-Dehydrogenase, *ACOX1* = Acyl-CoA-Oxidase 1, *CPT1A* = Carnitin- Palmitoyl-transferase 1A, *APOB* = Apolipoprotein B, *MTTP* = mikrosomales TG-Transferprotein, *ATF4* = aktivierender Transkriptionsfaktor 4, *BAK1* = BCL2-Antagonist 1, *BAX* = BCL-assoziertes X-Protein, *CASP* = Caspase, *DDIT3* = DNA-Schaden-induzierendes Transkript 3, *DNAJC3* = DnaJ (Hsp40) Homolog, *EDEMI* = ER-Abbau-Enhancer, *HERPUD* = Homocystein-induzierte, ER-Stress induzierte, Ubiquitin-ähnliche Domäne 1, *PDIA4* = Protein-Disulfid-Isomerase Familie A4, *HSPA5* = Hitzeschockprotein 70 kDa Protein, *XBPIs* = X-Box bindendes Protein 1 gespleißt, n.s. = nicht signifikant ( $p > 0,05$ )

Im Einklang mit diesen Beobachtungen gab es positive Korrelationen von Genen der UPR mit Genen der Lipogenese (Ausnahme inverse Korrelation von *XBPIs* und *GPAM*) (Tabelle 3.34). Tiere mit einem mittleren Level an ER-Stress hatten gegenüber Tieren mit niedrigem ER-Stress eine signifikant höhere hepatische mRNA-Konzentration der Gene *ACACA*, *FASN*, *GPAM* und

*SREBF1*, während diese Erhöhung bei Tieren mit hohem ER-Stress interessanterweise geringer ausgeprägt war. Ein Einfluss von ER-Stress auf die  $\beta$ -Oxidation konnte in der vorliegenden Studie nicht festgestellt werden, da die Gruppierung nach Ausprägung des ER-Stresses keine signifikanten Unterschiede bei den Genen der  $\beta$ -Oxidation zeigte. Außerdem traten sowohl inverse als auch positive Korrelationen zwischen Genen der UPR und der  $\beta$ -Oxidation auf. Die Expressionen von *APOB* und *MTTP*, die eine wichtige Rolle bei der Ausschleusung von VLDL spielen, zeigten positive Korrelationen mit einigen Genen der UPR. Im Einklang damit wurde bei Tieren mit moderatem und hohem ER Stress signifikant höhere Expressionen an *MTTP* festgestellt.

**Tabelle 3.35 Genexpressionen relevanter Gene der UPR zum Zeitpunkt 1 Woche pp. bei Tieren mit normalem hepatischen Fettgehalt (TG < 10 mg/g) sowie Tieren mit milder (TG 10 - 50 mg/g) oder moderater Fettleber (TG  $\geq$  50 mg/g)**

	normale Leber TG (n=7)	milde Fettleber (n=36)	moderate Fettleber (n=7)	p-Wert
<i>ATF4</i>	1,00 $\pm$ 0,07	0,87 $\pm$ 0,03	0,98 $\pm$ 0,07	0,120
<i>BAK1</i>	1,00 $\pm$ 0,13	0,78 $\pm$ 0,06	0,67 $\pm$ 0,13	0,167
<i>BAX</i>	1,00 $\pm$ 0,14	0,93 $\pm$ 0,07	0,87 $\pm$ 0,15	0,814
<i>CASP3</i>	1,00 $\pm$ 0,09	1,08 $\pm$ 0,04	0,98 $\pm$ 0,09	0,554
<i>CASP8</i>	1,00 $\pm$ 0,15	1,04 $\pm$ 0,06	1,12 $\pm$ 0,15	0,846
<i>CASP9</i>	1,00 $\pm$ 0,13	0,99 $\pm$ 0,06	0,76 $\pm$ 0,13	0,240
<i>DDIT3</i>	1,00 $\pm$ 0,15 <sup>a</sup>	1,16 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>	1,68 $\pm$ 0,16 <sup>b</sup>	0,009
<i>DNAJC3</i>	1,00 $\pm$ 0,18	1,16 $\pm$ 0,08	1,56 $\pm$ 0,20	0,100
<i>EDEMI</i>	1,00 $\pm$ 0,15	1,30 $\pm$ 0,07	1,21 $\pm$ 0,15	0,223
<i>HERPUDI</i>	1,00 $\pm$ 0,17 <sup>a</sup>	0,99 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>	1,60 $\pm$ 0,17 <sup>b</sup>	0,008
<i>HSPA5</i>	1,00 $\pm$ 0,25 <sup>a</sup>	1,09 $\pm$ 0,12 <sup>a</sup>	1,94 $\pm$ 0,25 <sup>b</sup>	0,011
<i>PDIA4</i>	1,00 $\pm$ 0,22	1,12 $\pm$ 0,10	1,04 $\pm$ 0,22	0,848
<i>XBPIs</i>	1,00 $\pm$ 0,46	0,99 $\pm$ 0,21	2,17 $\pm$ 0,47	0,077

*ATF4*= aktivierender Transkriptionsfaktor 4, *BAK1* = BCL2-Antagonist 1, *BAX* = BCL-assoziertes X-Protein, *CASP* = Caspase, *DDIT3* = DNA-Schaden-induzierendes Transkript 3, *DNAJC3* = DnaJ (Hsp40) Homolog, *EDEMI* = ER-Abbau-Enhancer, *HERPUD* = Homocystein-induzierte, ER-Stress induzierte, Ubiquitin-ähnliche Domäne 1, *PDIA4* = Protein-Disulfid-Isomerase Familie A4, *HSPA5* = Hitzeschockprotein 70 kDa Protein, *XBPIs* = X-Box bindendes Protein 1 gespleißt

**Tabelle 3.36 relative mRNA-Expression und Plasmakonzentrationen von Parametern der Inflammation zum Zeitpunkt 1 Woche pp. bei Tieren mit niedrigem, mittlerem und hohem ER-Stress Level**

(Einteilung anhand der relativen *HSPA5*-Expressionen:  $1,00 \pm 0,32$ /  $2,02 \pm 0,20$ /  $5,32 \pm 0,32$ )

	niedriger Stress (n=11)	mittlerer Stress (n=28)	hoher Stress (n=11)	p-Wert
TG [mg/g Leber]	15,0 ± 4,1 <sup>a</sup>	21,6 ± 2,6 <sup>ab</sup>	32,0 ± 4,1 <sup>b</sup>	0,019
Cholesterol [mg/g Leber]	2,4 ± 0,2 <sup>a</sup>	2,7 ± 0,1 <sup>ab</sup>	3,1 ± 0,2 <sup>b</sup>	0,040
TG [mg/dL Plasma]	8,6 ± 0,6	8,8 ± 0,4	8,8 ± 0,6	0,918
Cholesterol [mg/dL Plasma]	78,6 ± 5,8	81,9 ± 3,7	78,5 ± 6,1	0,837
<u>Lipogenese</u>				
<i>ACACA</i>	1,00 ± 0,30 <sup>a</sup>	1,99 ± 0,18 <sup>b</sup>	1,42 ± 0,28 <sup>ab</sup>	0,016
<i>FASN</i>	1,00 ± 0,33 <sup>a</sup>	2,06 ± 0,20 <sup>b</sup>	1,35 ± 0,32 <sup>ab</sup>	0,016
<i>GPAM</i>	1,00 ± 0,16 <sup>a</sup>	1,50 ± 0,10 <sup>b</sup>	1,10 ± 0,15 <sup>ab</sup>	0,013
<i>SLC27A1</i>	1,00 ± 0,12	1,02 ± 0,07	0,98 ± 0,11	0,947
<i>SREBF1</i>	1,00 ± 0,27 <sup>a</sup>	1,98 ± 0,16 <sup>b</sup>	1,13 ± 0,25 <sup>a</sup>	0,002
<u>β-Oxidation</u>				
<i>ACADM</i>	1,00 ± 0,12	1,25 ± 0,07	1,16 ± 0,11	0,210
<i>ACOX</i>	1,00 ± 0,09	1,15 ± 0,06	0,92 ± 0,09	0,070
<i>CPT1A</i>	1,00 ± 0,18	1,35 ± 0,11	1,05 ± 0,17	0,145
<u>VLDL-Ausschleusung</u>				
<i>APOB</i>	1,00 ± 0,13	1,36 ± 0,08	1,17 ± 0,13	0,069
<i>MTTP</i>	1,00 ± 0,11 <sup>a</sup>	1,36 ± 0,07 <sup>b</sup>	1,47 ± 0,11 <sup>b</sup>	0,010

*ACACA* = Acetyl-CoA-Carboxylase  $\alpha$ , *FASN* = Fettsäuresynthase, *GPAM* = Glycerol-3-phosphat-Acyltransferase, mitochondrial, *SLC27A1* = SLC-Transporter für langkettige Fettsäuren, *SREBF1* = Sterol-regulatorisches-Element-bindender Transkriptionsfaktor 1, *ACADM* = Acyl-CoA-Dehydrogenase, *ACOX1* = Acyl-CoA-Oxidase 1, *CPT1A* = Carnitin- Palmitoyl-transferase 1A, <sup>2</sup>*APOB* = Apolipoprotein B, *MTTP* = mikrosomales TG-Transferprotein

### FGF21 und Lipidstoffwechsel

Tiere mit einer moderaten Fettleber zeigten gegenüber Tieren mit normalen hepatischen TG Gehalten eine numerisch, jedoch nicht signifikante Erhöhung der *FGF21*-Expression (Tabelle 3.37). Zum Zeitpunkt 1 Woche pp. war zudem die *FGF21*-mRNA-Konzentration tendenziell mit der Konzentration an TG in der Leber korreliert ( $r = 0,251$ ,  $p = 0,085$ ). Weitere Zusammenhänge zwischen *FGF21* und dem Lipidstoffwechsel wurden in der vorliegenden Studie nicht beobachtet (Tabelle 6.13).

**Tabelle 3.37 FGF21-Konzentration bei Tieren mit normalem hepatischen Fettgehalt (TG < 10 mg/g), milder (TG 10 - 50 mg/g) oder moderater Fettleber (TG ≥ 50 mg/g) in Woche 1 pp.**

	normale Leber TG (n=7)	milde Fettleber (n=36)	moderate Fettleber (n=7)	p-Wert
<i>FGF21</i> (Genexpression)	1,00 ± 0,49	0,75 ± 0,22	1,77 ± 0,49	0,172
<i>FGF21</i> [pg/mL Plasma]	448,5 ± 254,5	694,2 ± 119,1	420,8 ± 274,9	0,510

FGF21 = Fibroblast growth factor 21

Nrf2-Aktivierung und Lipidstoffwechsel

Die hepatischen mRNA-Konzentrationen von *GPXI* und *NQOI* waren invers mit der Expression von *APOB* korreliert, was eine verminderte Kapazität der Leber zur Ausschleusung von VLDL zur Folge haben könnte. Tiere mit einer moderaten Fettleber zeigten tendenziell erhöhte Expressionen an *SOD1* und *NQOI* (Tabelle 3.38). Zwischen der Expression von Nrf2-Zielgenen und Parametern des Lipidstoffwechsels waren einzelne Korrelationen zu beobachten (Tabelle 3.39). Gene der  $\beta$ -Oxidation zeigten eine positive Beziehung zu der hepatischen mRNA-Konzentration von *CAT* und *UGT1A1*, während sie mit *GPXI* und *MT1A1* invers korrelierten, sodass kein klarer Zusammenhang zwischen Fettsäureoxidation und Nrf2-Aktivierung zu erkennen war.

Mit Ausnahme des Fettsäuretransporters *SLC27A1* zeigten hingegen alle gemessenen Expressionen von Genen der Lipogenese inverse Korrelationen zu *GPXI*, außerdem gab es weitere Zusammenhänge einzelner Gene der Lipogenese mit *MT1A1*, *NQOI* und *SOD1*. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine Aktivierung des Nrf2 mit einer verminderten Lipogenese verknüpft ist.

**Tabelle 3.38 Genexpressionen von Nrf2-Zielgenen zum Zeitpunkt 1 Woche pp. bei Tieren mit normalem hepatischem Fettgehalt (TG < 10 mg/g) sowie Tieren mit milder (TG 10 - 50 mg/g) und moderater Fettleber (TG  $\geq$  50 mg/g)**

	normale Leber TG (n=7)	milde Fettleber (n=36)	moderate Fettleber (n=7)	p-Wert
<i>CAT</i>	1,00 $\pm$ 0,1	0,95 $\pm$ 0,05	0,90 $\pm$ 0,10	0,778
<i>GPXI</i>	1,00 $\pm$ 0,12	0,87 $\pm$ 0,05	0,78 $\pm$ 0,11	0,439
<i>MT1A1</i>	1,00 $\pm$ 1,18	1,73 $\pm$ 0,54	2,87 $\pm$ 1,18	0,528
<i>NQOI</i>	1,00 $\pm$ 0,11	0,95 $\pm$ 0,05	1,24 $\pm$ 0,11	0,061
<i>SOD1</i>	1,00 $\pm$ 0,08	1,14 $\pm$ 0,04	1,27 $\pm$ 0,08	0,057
<i>UGT1A1</i>	1,00 $\pm$ 0,09	0,95 $\pm$ 0,04	0,97 $\pm$ 0,09	0,840

*CAT* = Catalase, *GPXI* = Glutathionperoxidase, *MT1A* = Metallothionein-1A, *SOD1* = Superoxid-Dismutase 1, *UGT1A1* = UDP-Glucuronosyltransferase 1 A1, *NQOI* =NAD(P)H Dehydrogenase, Quinon 1

**Tabelle 3.39 Korrelationen zwischen Expressionen von Nrf2-Zielgenen und Genen des Fettstoffwechsels zum Zeitpunkt 1 Woche pp. (n = 50, p < 0,05)**

	Korrelationskoeffizient R					
	<i>CAT</i>	<i>GPXI</i>	<i>MT1A</i>	<i>NQO1</i>	<i>SOD1</i>	<i>UGT1A1</i>
TG [mg/g Leber]	n.s.	n.s.	0,315	n.s.	n.s.	n.s.
Cholesterol [mg/g Leber]	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
TG [mg/dL Plasma]	0,288	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Cholesterol [mg/dL Plasma]	0,335	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<u>β-Oxidation</u>						
<i>ACADM</i>	n.s.	-0,408	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>ACOX</i>	0,521	n.s.	-0,373	n.s.	n.s.	0,537
<i>CPT1A</i>	n.s.	-0,434	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<u>Lipogenese</u>						
<i>ACACA</i>	n.s.	-0,291	n.s.	-0,347	n.s.	n.s.
<i>FASN</i>	n.s.	-0,346	n.s.	n.s.	-0,344	n.s.
<i>GPAM</i>	n.s.	-0,369	-0,328	n.s.	n.s.	n.s.
<i>SLC27A1</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>SREBF1</i>	n.s.	-0,294	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<u>VLDL-Ausschleusung</u>						
<i>APOB</i>	n.s.	-0,302	n.s.	-0,354	n.s.	n.s.
<i>MTTP</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

*ACACA* = Acetyl-CoA-Carboxylase  $\alpha$ , *FASN* = Fettsäuresynthase, *GPAM* = Glycerol-3-phosphat-Acyltransferase, mitochondrial, *SLC27A1* = SLC-Transporter für langkettige Fettsäuren, *SREBF1* = Sterol-regulatorisches-Element-bindender Transkriptionsfaktor 1, *ACADM* = Acyl-CoA-Dehydrogenase, *ACOX1* = Acyl-CoA-Oxidase 1, *CPT1A* = Carnitin- Palmitoyl-transferase 1A, *APOB* = Apolipoprotein B, *MTTP* = mikrosomales TG-Transferprotein, *CAT* = Catalase, *GPXI* = Glutathionperoxidase, *MT1A* = Metallothionein-1A, *SOD1* = Superoxid-Dismutase 1, *UGT1A1* = UDP-Glucuronosyltransferase 1 A1, *NQO1* = NAD(P)H Dehydrogenase, Quinon 1, n.s. = nicht signifikant (p > 0,05)

#### Energiebilanz, freie Fettsäuren und Lipidstoffwechsel

Eine stärker ausgeprägte Energiebilanz in Woche 1 pp., die mit einer höheren Konzentration an freien Fettsäuren im Plasma einherging (s.3.1.1.1) war mit einer erhöhten Konzentration an TG und Cholesterol in der Leber verknüpft (Tabelle 3.41). Tiere mit einer moderaten Fettleber zeigten gegenüber Tieren mit einer niedrigeren hepatischen TG Konzentration eine negativere Energiebilanz sowie erhöhte Konzentrationen an freien FS im Plasma (Tabelle 3.40). Des Weiteren war die Konzentration an TG im Plasma negativ mit der Energiebilanz und positiv mit der Konzentration an freien FS korreliert.

**Tabelle 3.40 Energiebilanz und Konzentration an freien Fettsäuren (NEFA) zum Zeitpunkt 1 Woche pp. bei Tieren mit normalem hepatischen Fettgehalt (TG < 10 mg/g) sowie Tieren mit milder (TG 10 - 50 mg/g) oder moderater Fettleber (TG ≥ 50 mg/g)**

	normale Leber TG (n=7)	milde Fettleber (n=36)	moderate Fettleber (n=7)	p-Wert
NEFA [μmol/L Plasma]	291,3 ± 86,3 <sup>a</sup>	440,1 ± 36,8 <sup>a</sup>	764,4 ± 79,9 <sup>b</sup>	< 0,001
Energiebilanz [MJ NEL/Tag]	-49,22 ± 8,88 <sup>a</sup>	-56,35 ± 4,64 <sup>ab</sup>	-84,26 ± 10,87 <sup>b</sup>	0,045

NEFA = nicht veresterte freie Fettsäuren

**Tabelle 3.41 Korrelationen zwischen Energiebilanz, NEFA und Parametern des Fettstoffwechsels in Woche 1 pp. (n = 50, p < 0,05)**

	Korrelationskoeffizient R	
	Energiebilanz	NEFA
TG [mg/g Leber]	-0,415	0,476
Cholesterol [mg/g Leber]	-0,391	0,571
TG [mg/dL Plasma]	-0,367	0,482
Cholesterol [mg/dL Plasma]	n.s.	n.s.

TG = Triglyceride, NEFA = nicht veresterte, freie Fettsäuren, n.s. = nicht signifikant (p > 0,05)

### LPS, Inflammation und Lipidstoffwechsel

Eine Übersicht über signifikante Korrelationen zwischen relevanten Parametern des Fettstoffwechsels und der Inflammation sind in Tabelle 3.42 aufgeführt. Die Expression des akute-Phase-Proteins *CRP* war positiv mit der Konzentration an Cholesterol in der Leber korreliert, während das negative akute Phase Protein *TTR* eine inverse Korrelation mit dem TG Gehalt der Leber zeigte. Bei einer vermehrten Expression der akuten Phase Protein codierenden Gene *CRP*, *SAA* und *HP* sowie des Gens *AOAH* zeigten Gene der  $\beta$ -Oxidation eine verminderte Expression. Im Einklang mit dieser Beobachtung war die Expression des negativ akute-Phase-Protein-codierenden Gens *RBP4* positiv mit *ACADM*, und die hepatische Expression von *TTR* sowie die Albumin-Konzentration im Plasma positiv mit *ACOX* korreliert. Des Weiteren war die mRNA Konzentration von *TTR* bei Tieren mit einer moderaten Fettleber im Vergleich zu Tieren mit einer hepatischen TG-Konzentration im Normbereich signifikant reduziert (Tabelle 3.43).

Die Expressionen von Genen der Lipogenese zeigten hingegen keinen klaren Zusammenhang zur Inflammation, da hier einzelne positive als auch inverse Korrelationen beobachtet wurden. Zwischen den Genexpressionen von *APOB* sowie *MTTP* gab es interessanterweise einzelne positive Zusammenhäng mit akute-Phase-Proteinen-(codierenden Gene). Zwischen der

Konzentration an LPS im Plasma und Parametern des Fettstoffwechsels war kein Zusammenhang zu beobachten.

**Tabelle 3.42 Korrelationen zwischen Parametern der Inflammation und Parametern des Fettstoffwechsels zum Zeitpunkt Woche 1 pp. (n = 50, dargestellt sind nur signifikante Korrelationen  $p < 0,05$ )**

	Korrelationskoeffizient R		
	positive akute Phase Proteine (codierende Gene) <sup>1</sup>	negative akute Phase Proteine (codierende Gene) <sup>2</sup>	Proinflammato- rische Gene <sup>3</sup>
<u>Leber</u>			
TG [mg/g]	n.s.	<i>TTR</i> (-0,685)	<i>PTGS2</i> (0,288)
Chol. [mg/g]	<i>CRP</i> (0,400)	n.s.	n.s.
<u>Plasma</u>			
TG [mg/dL]	n.s.	Alb. (0,341), <i>RBP4</i> (0,523)	n.s.
Chol. [mg/dL]	n.s.	n.s.	n.s.
<u><math>\beta</math>-Oxidation</u>			
<i>ACADM</i>	<i>CP</i> (-0,288), <i>SAA</i> (-0,307)	<i>RBP4</i> (0,390)	<i>AOAH</i> (-0,330)
<i>ACOX</i>	<i>HP</i> (-0,389)	<i>TTR</i> (0,319), Alb. (0,498)	n.s.
<i>CPT1A</i>	n.s.	n.s.	<i>AOAH</i> (-0,375)
<u>Lipogenese</u>			
<i>ACACA</i>	<i>SAA</i> (Plasma) (0,294)	n.s.	n.s.
<i>FASN</i>	<i>SAA</i> (-0,321), <i>SAA</i> (Plasma) (0,372)	Albumin (0,310)	n.s.
<i>GPAM</i>	<i>HP</i> (-0,395), <i>SAA</i> (-0,320), <i>SAA</i> (Plasma) (0,326)	Albumin (0,391)	<i>PTGS2</i> (0,293)
<i>SLC27A1</i>	n.s.	n.s.	n.s.
<i>SREBF1</i>	<i>SAA</i> (Plasma) (0,386)	n.s.	<i>TNF</i> (0,290)
<u>VLDL-Ausschleusung</u>			
ApoB	<i>SAA</i> (Plasma) (0,333)	n.s.	n.s.
<i>MTTP</i>	<i>CRP</i> (0,601), <i>HP</i> (0,292)	n.s.	n.s.

*ACACA* = Acetyl-CoA-Carboxylase  $\alpha$ , *FASN* = Fettsäuresynthase, *GPAM* = Glycerol-3-phosphat-Acyltransferase, mitochondrial, *SLC27A1* = SLC-Transporter für langkettige Fettsäuren, *SREBF1* = Sterol-regulatorisches-Element-bindender Transkriptionsfaktor 1, *ACADM* = Acyl-CoA-Dehydrogenase, *ACOX1* = Acyl-CoA-Oxidase 1, *CPT1A* = Carnitin- Palmitoyl-transferase 1A, *APOB* = Apolipoprotein B, *MTTP* = mikrosomales TG-Transferprotein, <sup>1</sup>*CP* = Ceruloplasmin, *CRP* = C-reaktives Protein, *HP* = Haptoglobin, *SAA* = Serumamyloid A, <sup>2</sup>*TTR* = Transthyretin, *RBP4* = Retinol-bindendes Protein 4, <sup>3</sup>*CCL2* = Chemokin-Ligand 2, *IL1B* = Interleukin 1 beta, *IL8* = Interleukin 8, *PTGS2* = Prostaglandin-Endoperoxid Synthase 2, *TNF* = Tumor-Nekrose Faktor  
n.s. = nicht signifikant ( $p > 0,05$ )

**Tabelle 3.43 Genexpressionen von Parametern der Inflammation zum Zeitpunkt 1 Woche pp. bei Tieren mit normalem hepatischen Fettgehalt (TG < 10 mg/g) sowie Tieren mit milder (TG 10 - 50 mg/g) oder moderater Fettleber (TG ≥ 50 mg/g)**

	normale Leber TG (n=7)	milde Fettleber (n=36)	moderate Fettleber (n=7)	p-Wert
<u>positive akute-Phase-Proteine-codierende Gene</u>				
<i>SAA</i>	1,00 ± 0,26	0,67 ± 0,11	0,63 ± 0,24	0,450
<i>HP</i>	1,00 ± 0,75	1,01 ± 0,33	1,65 ± 0,75	0,733
<i>CP</i>	1,00 ± 0,18	0,98 ± 0,08	1,36 ± 0,18	0,179
<i>CRP</i>	1,00 ± 0,17	1,24 ± 0,08	1,51 ± 0,17	0,126
<u>negative akute-Phase-Proteine-codierende Gene</u>				
<i>RBP4</i>	1,00 ± 0,09	1,12 ± 0,04	1,17 ± 0,09	0,366
<i>TTR</i>	1,00 ± 0,08 <sup>b</sup>	0,87 ± 0,04 <sup>b</sup>	0,52 ± 0,08 <sup>a</sup>	<0,001
<u>Proinflammatorische Gene</u>				
<i>TNF</i>	1,00 ± 0,17	0,87 ± 0,07	0,87 ± 0,15	0,765
<i>IL1b</i>	1,00 ± 0,14	0,72 ± 0,06	0,73 ± 0,12	0,188
<i>IL8</i>	1,00 ± 0,33	1,35 ± 0,14	2,01 ± 0,31	0,073
<i>PTGS2</i>	1,00 ± 0,20	1,09 ± 0,09	1,31 ± 0,20	0,520
<i>CCL2</i>	1,00 ± 0,24	0,88 ± 0,10	1,05 ± 0,22	0,726
<i>AOAH</i>	1,00 ± 0,18	0,70 ± 0,08	0,50 ± 0,18	0,144
<u>Plasmaparameter</u>				
Albumin [mg/mL]	3,0 ± 0,1	2,8 ± 0,1	3,0 ± 0,1	0,191
<i>SAA</i> [ng/mL]	304,7 ± 28,9	319,2 ± 12,7	277,8 ± 31,2	0,458
<i>RBP4</i> [ng/mL]	1345,5 ± 159,0	1544,6 ± 65,8	1262,0 ± 147,2	0,156
LPS [µg/L]	0,7 ± 0,2	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,2	0,360

*CP* = Ceruloplasmin, *CRP* = C-reaktives Protein, *HP* = Haptoglobin, *SAA* = Serumamyloid A, *TTR* = Transthyretin, *RBP4* = Retinol-bindendes Protein 4, *CCL2* = Chemokin-Ligand 2, *IL1B* = Interleukin 1 beta, *IL8* = Interleukin 8, *PTGS2* = Prostaglandin-Endoperoxid Synthase 2, *TNF* = Tumor-Nekrose Faktor, LPS = Lipopolysaccharide

### Oxidativer Stress und Lipidstoffwechsel

Zwischen den Parametern des Lipidstoffwechsels und Markern des oxidativen Stresses waren nur vereinzelte positive als auch inverse Korrelationen zu beobachten (Tabelle 3.45). Kühe mit einer moderaten Fettleber zeigten im Vergleich zu Tieren mit Leber-TG-Konzentrationen im Normbereich keine signifikant unterschiedlichen Konzentrationen an Vitaminen oder Summenparametern des oxidativen Stresses (Tabelle 3.44).

**Tabelle 3.44 Genexpressionen von Parametern des oxidativen Stresses zum Zeitpunkt 1 Woche pp. bei Tieren mit normalem hepatischem Fettgehalt (TG < 10 mg/g) sowie Tieren mit milder (TG 10 - 50 mg/g) oder moderater Fettleber (TG ≥ 50 mg/g)**

	normale Leber TG (n=7)	milde Fettleber (n=36)	moderate Fettleber (n=7)	p- Wert
$\gamma$ -Tocopherol [ $\mu\text{mol/g}$ Lipid]	0,11 $\pm$ 0,02	0,12 $\pm$ 0,01	0,10 $\pm$ 0,02	0,706
$\alpha$ -Tocopherol [ $\mu\text{mol/g}$ Lipid]	3,52 $\pm$ 0,87	5,75 $\pm$ 0,38	5,38 $\pm$ 1,03	0,073
$\beta$ -Carotin [ $\mu\text{mol/g}$ Lipid]	8,51 $\pm$ 1,86	12,86 $\pm$ 0,82	11,64 $\pm$ 2,01	0,109
Retinol [ $\mu\text{mol/g}$ Lipid]	0,63 $\pm$ 0,09	0,81 $\pm$ 0,04	0,78 $\pm$ 0,10	0,234
TEAC [mmol/L Plasma]	3,75 $\pm$ 0,17	3,64 $\pm$ 0,07	3,51 $\pm$ 0,17	0,604
TBARS [ $\mu\text{mol/L}$ ]	0,81 $\pm$ 0,07	0,85 $\pm$ 0,03	0,72 $\pm$ 0,07	0,216
Proteincarbonyle [nmol/mg Protein]	0,27 $\pm$ 0,04	0,29 $\pm$ 0,02	0,33 $\pm$ 0,04	0,566

TEAC = Trolox-äquivalente antioxidative Kapazität, TBARS = Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen

**Tabelle 3.45 Korrelationen zwischen Parametern des oxidativen Stresses und des Fettstoffwechsels in Woche 1 pp. (n = 50, dargestellt sind nur signifikante Korrelationen p < 0,05)**

	$\beta$ -Carotin	Retinol	$\alpha$ -Tocopherol	$\gamma$ -Tocopherol	TBARS	TEAC	Protein- carbonyle
TG [mg/g Leber]	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Chol. [mg/g Leber]	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
TG [mg/dL Plasma]	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	-0,490	n.s.	n.s.
Chol. [mg/dL Plasma]	n.s.	n.s.	0,306	0,570	n.s.	n.s.	n.s.
<u><math>\beta</math>-Oxidation</u>							
<i>ACADM</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	-0,309	n.s.
<i>ACOX</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>CPT1A</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<u>Lipogenese</u>							
<i>ACACA</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>FASN</i>	n.s.	0,328	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>GPAM</i>	n.s.	0,328	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0,301
<i>SLC27A1</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	-0,355	n.s.
<i>SREBF1</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<u>VLDL-Ausschleusung</u>							
<i>APOB</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>MTTP</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

*ACACA* = Acetyl-CoA-Carboxylase  $\alpha$ , *FASN* = Fettsäuresynthase, *GPAM* = Glycerol-3-phosphat-Acyltransferase, mitochondrial, *SLC27A1* = SLC-Transporter für langkettige Fettsäuren, *SREBF1* = Sterol-regulatorisches-Element-bindender Transkriptionsfaktor 1, *ACADM* = Acyl-CoA-Dehydrogenase, *ACOX1* = Acyl-CoA-Oxidase 1, *CPT1A* = Carnitin- Palmitoyl-transferase 1A, *APOB* = Apolipoprotein B, *MTTP* = mikrosomales TG-Transferprotein, TG = Triglyceride, Chol. = Cholesterol, n.s. = nicht signifikant (p > 0,05)

### 3.3.2 Ketogenese

#### 3.3.2.1 Ketonkörperbildung während der Frühlaktation

Als Marker der Ketogenese wurde die Konzentration an BHBA im Plasma bestimmt (s. 2.7.2). Die Konzentration an BHBA stieg nach der Abkalbung in Relation zu Woche 2 ap. um den Faktor 1,5 an (Abbildung 3.9). Im späteren Verlauf der Laktation war die BHBA-Konzentration wieder rückläufig, das Ausgangsniveau wurde bis Woche 7 pp. jedoch nicht wieder erreicht. Mehrkalbskühe wiesen in Woche 2 ap. sowie in Woche 1 und 4 pp. signifikant höhere BHBA-Konzentrationen als Färsen auf.

Die mRNA-Expressionen der Enzyme Acetyl-CoA-Acetyltransferase (*ACAT*) und 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-Synthase 2 (*HMGCS2*), die eine wichtige Rolle bei der Ketogenese spielen, stiegen nach der Abkalbung an (Tabelle 3.46). Während die Expression von *ACAT* in Woche 4 pp. wieder rückläufig war, wurde *HMGCS2* bis zum Ende des Versuchszeitraumes verstärkt exprimiert. Die Genexpression von *HMGCL*, eines weiteren Enzyms der Ketogenese, blieb hingegen während des gesamten Versuchszeitraumes unverändert. Die Laktationsnummer hatte keinen Einfluss auf die Expressionen der Gene der Ketogenese.

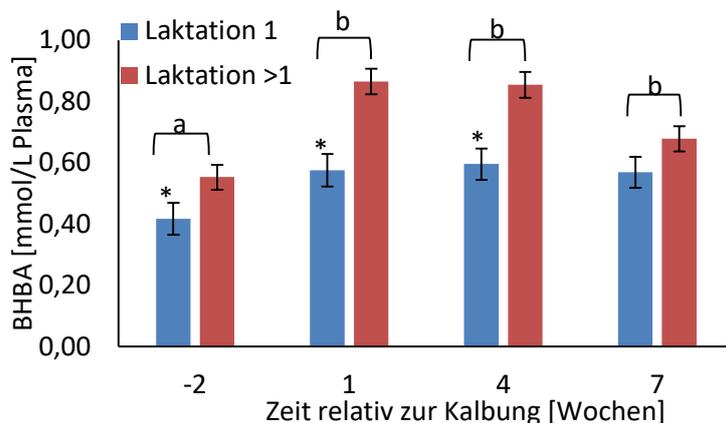


Abbildung 3.9 BHBA-Konzentrationen im Plasma von Holstein-Kühen während der peripartalen Phase (n = 50, Ismeans ± Standardfehler)

Tabelle 3.46 Relative mRNA-Konzentration von Genen der Ketogenese in der Leber von Holstein-Kühen<sup>1</sup> (n = 50)

Gen <sup>2</sup>	Woche 2 ap.	Woche 1 pp.	Woche 4 pp.	Woche 7 pp.	SE	p-Wert Zeit	p-Wert Laktation
<i>ACAT1</i>	1,00 <sup>a</sup>	1,18 <sup>b</sup>	1,03 <sup>a</sup>	1,06 <sup>a</sup>	0,04	<0,001	0,167
<i>HMGCS2</i>	1,00 <sup>a</sup>	1,39 <sup>ab</sup>	1,70 <sup>bc</sup>	2,11 <sup>c</sup>	0,14	<0,001	0,083
<i>HMGCL</i>	1,00	1,02	0,86	0,96	0,06	0,172	0,453

<sup>1</sup> mRNA-Expressionen relativ zum Zeitpunkt zwei Wochen antepartum dargestellt

<sup>2</sup> *ACAT1* = Acetyl-CoA-Acetyltransferase, *HMGCL* = 3-Hydroxymethyl-3-Methylglutaryl-CoA-Lyase, *HMGCS2* = 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-Synthase 2

a, b, c Signifikanzniveaus Zeit (P < 0,05), ap. antepartum, pp. postpartum, SE = Standardfehler

### 3.3.2.2 Einflussfaktoren auf die Ketogenese

Um Zusammenhänge zwischen dem Auftreten von Ketose und möglichen Risikofaktoren aufzudecken, wurde die Plasma BHBA-Konzentration in Woche 1 pp. mit möglichen Einflussfaktoren korreliert (n = 50). Des Weiteren wurde die Herde auf Grund der Verteilung der BHBA-Konzentrationen in Woche 1 pp. in zwei Gruppen eingeteilt (Gruppe 1: BHBA im Normbereich mit BHBA  $\leq 1,2$  mmol/L (MW  $0,67 \pm 0,03$  mmol/L, n = 43); Gruppe 2: (sub-) klinische Ketose mit BHBA  $> 1,2$  mmol/L (MW  $1,72 \pm 0,08$ , n = 7). Es erfolgte ein Vergleich der beiden Gruppen hinsichtlich möglicher Einflussfaktoren der Ketogenese.

#### ER-Stress und Ketogenese

Zwischen den Parametern der Ketogenese und der Expression von Genen der UPR waren sowohl einzelne positive als auch inverse Korrelationen zu beobachten, aus denen kein klarer Zusammenhang zwischen ER-Stress und dem Auftreten von Ketogenese erkennbar ist (Tabelle 3.47). Des Weiteren zeigten Tiere mit einem hohen Level an ER-Stress gegenüber Tieren mit niedrigem ER-Stress eine numerische, jedoch nicht signifikante Erhöhung der Parameter der Ketogenese (Tabelle 3.48). Bei Tieren mit (sub-)klinischer Ketose war die Expression von *HSPA5*, dem Master-Regulator der UPR sowie die der Downstream-Gene *HERPUD1* und *XBPIs* gegenüber Tieren mit niedrigeren BHBA-Konzentrationen erhöht (Tabelle 3.49).

**Tabelle 3.47 Korrelationen zwischen Expressionen von Genen der UPR und Parametern der Ketogenese in Woche 1 pp. (n = 50, p < 0,05)**

	Korrelationskoeffizient R			
	BHBA	<i>ACAT</i>	<i>HMGCL</i>	<i>HMGCS2</i>
<i>ATF4</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>BAK1</i>	n.s.	n.s.	0,612	n.s.
<i>BAX</i>	-0,382	n.s.	n.s.	n.s.
<i>CASP3</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>CASP8</i>	n.s.	n.s.	-0,311	0,285
<i>CASP9</i>	n.s.	n.s.	0,336	n.s.
<i>DDIT3</i>	n.s.	n.s.	-0,469	0,289
<i>DNAJC3</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>EDEMI</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>HERPUD1</i>	n.s.	n.s.	0,551	n.s.
<i>HSPA5</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>PDIA4</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>XBPIs</i>	n.s.	n.s.	0,503	n.s.

*ACAT1* = Acetyl-CoA-Acetyltransferase, *HMGCL* = 3-Hydroxymethyl-3-Methylglutaryl-CoA-Lyase, *HMGCS2* = 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-Synthase 2, BHBA = 3-Hydroxybutansäure, *ATF4* = aktivierender Transkriptionsfaktor 4, *BAK1* = BCL2-Antagonist 1, *BAX* = BCL-assoziertes X-Protein, *CASP* = Caspase, *DDIT3* = DNA-Schaden-induzierendes Transkript 3, *DNAJC3* = DnaJ (Hsp40) Homolog, *EDEMI* = ER-Abbau-Enhancer, *HERPUD* = Homocystein-induzierte, ER-Stress induzierte, Ubiquitin-ähnliche Domäne 1, *PDIA4* = Protein-Disulfid-Isomerase Familie A4, *HSPA5* = Hitzeschockprotein 70 kDa Protein, *XBPIs* = X-Box bindendes Protein 1 gespleißt, n.s. = nicht signifikant (p > 0,05)

**Tabelle 3.48 relative mRNA-Expression und Plasmakonzentrationen von Parametern der Ketogenese zum Zeitpunkt 1 Woche pp. bei Tieren mit niedrigem, mittlerem und hohem ER-Stress Level**

(Einteilung anhand der relativen *HSPA5*-Expressionen:  $1,00 \pm 0,32$ /  $2,02 \pm 0,20$ /  $5,32 \pm 0,32$ )

	niedriger Stress (n=11)	mittlerer Stress (n=28)	hoher Stress (n=11)	p-Wert
BHBA [mmol/L Plasma]	$0,722 \pm 0,135$	$0,783 \pm 0,081$	$1,003 \pm 0,129$	0,263
<u>Genexpressionen</u>				
<i>ACAT1</i>	$1,00 \pm 0,08$	$0,99 \pm 0,05$	$1,15 \pm 0,08$	0,269
<i>HMGCL</i>	$1,00 \pm 0,15$	$1,19 \pm 0,09$	$1,40 \pm 0,14$	0,148
<i>HMGCS2</i>	$1,00 \pm 0,24$	$1,60 \pm 0,14$	$1,43 \pm 0,23$	0,104

*ACAT1* = Acetyl-CoA-Acetyltransferase, *HMGCL* = 3-Hydroxymethyl-3-Methylglutaryl-CoA-Lyase, *HMGCS2* = 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-Synthase 2, BHBA = 3-Hydroxybutansäure

**Tabelle 3.49 Genexpressionen von Genen der UPR zum Zeitpunkt 1 Woche pp. bei Tieren mit normaler BHBA-Konzentration (BHBA  $\leq 1,20$  mmol/L, MW  $0,67 \pm 0,03$ ) sowie Tieren mit (sub-) klinischer Ketose (BHBA  $> 1,20$  mmol/L, MW  $1,72 \pm 0,08$ )**

	BHBA im Normbereich (n = 43)	(sub-)klinische Ketose (n = 7)	p-Wert
<i>ATF4</i>	$1,00 \pm 0,03$	$0,99 \pm 0,08$	0,936
<i>BAK1</i>	$1,00 \pm 0,07$	$0,84 \pm 0,16$	0,341
<i>BAX</i>	$1,00 \pm 0,06$	$0,84 \pm 0,15$	0,302
<i>CASP3</i>	$1,00 \pm 0,04$	$0,85 \pm 0,09$	0,114
<i>CASP8</i>	$1,00 \pm 0,06$	$1,02 \pm 0,14$	0,883
<i>CASP9</i>	$1,00 \pm 0,06$	$0,90 \pm 0,13$	0,490
<i>DDIT3</i>	$1,00 \pm 0,06$	$1,16 \pm 0,14$	0,300
<i>DNAJC3</i>	$1,00 \pm 0,06$	$1,30 \pm 0,17$	0,113
<i>EDEMI</i>	$1,00 \pm 0,05$	$0,98 \pm 0,13$	0,860
<i>HERPUDI</i>	$1,00 \pm 0,07^a$	$1,47 \pm 0,18^b$	0,019
<i>HSPA5</i>	$1,00 \pm 0,10^a$	$1,67 \pm 0,23^b$	0,011
<i>PDIA4</i>	$1,00 \pm 0,08$	$1,20 \pm 0,20$	0,344
<i>XBPIs</i>	$1,00 \pm 0,20^a$	$2,24 \pm 0,46^b$	0,018

*ATF4* = aktivierender Transkriptionsfaktor 4, *BAK1* = BCL2-Antagonist 1, *BAX* = BCL-assoziertes X-Protein, *CASP* = Caspase, *DDIT3* = DNA-Schaden-induzierendes Transkript 3, *DNAJC3* = DnaJ (Hsp40) Homolog, *EDEMI* = ER-Abbau-Enhancer, *HERPUDI* = Homocystein-induzierte, ER-Stress induzierte, Ubiquitin-ähnliche Domäne 1, *PDIA4* = Protein-Disulfid-Isomerase Familie A4, *HSPA5* = Hitzeschockprotein 70 kDa Protein, *XBPIs* = X-Box bindendes Protein 1 gespleißt

### FGF21 und Ketogenese

Die hepatische mRNA- sowie die Plasmakonzentration von FGF21 war nicht mit den Parametern der Ketogenese korreliert (Anhang, Tabelle 6.14). Von (sub-)klinischer Ketose betroffene Tiere zeigten gegenüber Tieren mit BHBA-Konzentrationen im Normbereich keine

signifikanten Unterschiede in der FGF21-Expression oder der FGF21-Konzentration im Plasma (Tabelle 3.50).

**Tabelle 3.50 Genexpressionen und Plasma Proteinkonzentration von FGF21 bei Tieren mit normaler BHBA-Konzentration (BHBA  $\leq$  1,20 mmol/L, MW  $0,67 \pm 0,03$ ) sowie Tieren mit (sub-) klinischer Ketose (BHBA  $>$  1,20 mmol/L, MW  $1,72 \pm 0,08$ )**

	BHBA im Normbereich (n = 43)	(sub-)klinische Ketose (n = 7)	p-Wert
<i>FGF21</i> (Genexpression)	1,00 $\pm$ 0,24	1,83 $\pm$ 0,59	0,197
<i>FGF21</i> [pg/mL Plasma]	642 $\pm$ 112	539 $\pm$ 258	0,715

FGF21 = Fibroblast growth factor 21

### Nrf2-Aktivierung und Ketogenese

Bei Tieren mit einer (sub-)klinischen Ketose war die Expression der Nrf2-Zielgene *NQO1* und *SOD1* signifikant gegenüber Tieren mit niedrigeren BHBA-Konzentrationen gesteigert (Tabelle 3.51). Zwischen den hepatischen mRNA-Konzentrationen der in der Ketogenese relevanten Gene *ACAT* und *HMGCL* und der Expression von Nrf-2-Zielgenen waren in Woche 1 pp. einige positive Korrelationen zu beobachten (Tabelle 3.52). Die Ergebnisse deuten stark auf einen Zusammenhang zwischen Ketogenese und Nrf2-Aktivierung hin.

**Tabelle 3.51 Genexpressionen von Nrf2-Zielgene zum Zeitpunkt 1 Woche pp. bei Tieren mit normaler BHBA-Konzentration (BHBA  $\leq$  1,20 mmol/L, MW  $0,67 \pm 0,03$ ) sowie Tieren mit (sub-)klinischer Ketose (BHBA  $>$  1,20 mmol/L, MW  $1,72 \pm 0,08$ )**

	BHBA im Normbereich (n = 43)	(sub-)klinische Ketose (n = 7)	p-Wert
<i>CAT</i>	1,00 $\pm$ 0,04	0,96 $\pm$ 0,11	0,697
<i>GPXI</i>	1,00 $\pm$ 0,05	0,84 $\pm$ 0,13	0,275
<i>MT1A1</i>	1,00 $\pm$ 0,30	2,15 $\pm$ 0,80	0,185
<i>NQO1</i>	1,00 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>	1,33 $\pm$ 0,11 <sup>b</sup>	0,009
<i>SOD1</i>	1,00 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	1,26 $\pm$ 0,07 <sup>b</sup>	0,001
<i>UGT1A1</i>	1,00 $\pm$ 0,04	1,02 $\pm$ 0,09	0,819

*CAT* = Catalase, *GPXI* = Glutathionperoxidase, *MT1A* = Metallothionein-1A, *SOD1* = Superoxid-Dismutase 1, *UGT1A1* = UDP-Glucuronosyltransferase 1 A1, *NQO1* =NAD(P)H Dehydrogenase, Quinon 1

**Tabelle 3.52 Korrelationen zwischen Expressionen der Nrf2-Zielgene und Parametern der Ketogenese in Woche 1 pp. (n = 50, p < 0,05)**

	Korrelationskoeffizient R			
	BHBA	<i>ACAT</i>	<i>HMGCL</i>	<i>HMGCS2</i>
<i>CAT</i>	n.s.	0,406	0,445	n.s.
<i>GPXI</i>	n.s.	n.s.	0,641	n.s.
<i>MTIA1</i>	n.s.	n.s.	0,299	n.s.
<i>NQO1</i>	n.s.	0,706	0,476	n.s.
<i>SOD1</i>	0,358	0,468	0,307	n.s.
<i>UGTIA1</i>	n.s.	0,379	0,567	n.s.

*CAT* = Catalase, *GPXI* = Glutathionperoxidase, *MTIA* = Metallothionein-1A, *SOD1* = Superoxid-Dismutase 1, *UGTIA1* = UDP-Glucuronosyltransferase 1 A1, *NQO1* = NAD(P)H Dehydrogenase, Quinon 1, *ACAT1* = Acetyl-CoA-Acetyltransferase, *HMGCL* = 3-Hydroxymethyl-3-Methylglutaryl-CoA-Lyase, *HMGCS2* = 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-Synthase 2, BHBA = 3-Hydroxybutansäure, n.s. = nicht signifikant (p > 0,05)

#### Energiebilanz, freie Fettsäuren und Ketogenese

Die Konzentration an freien FS im Plasma von Tieren mit (sub-)klinischer Ketose war im Vergleich zu Tieren mit BHBA-Konzentrationen im Normbereich signifikant erhöht, während die negative Energiebilanz bei diesen Tieren stärker ausgeprägt ist (Tabelle 3.53). Im Einklang mit diesen Beobachtungen korrelierten der Gehalt an BHBA im Plasma sowie die hepatische mRNA-Konzentration von *ACAT* in Woche 1 pp. positiv mit der Konzentration an freien Fettsäuren im Plasma (Tabelle 3.54).

**Tabelle 3.53 Energiebilanz und Konzentration an freien Fettsäuren zum Zeitpunkt 1 Woche pp. bei Tieren mit normaler BHBA-Konzentration (BHBA ≤ 1,20 mmol/L, MW 0,67 ± 0,03) sowie Tieren mit (sub-)klinischer Ketose (BHBA > 1,20 mmol/L, MW 1,72 ± 0,08)**

	BHBA im Normbereich (n = 43)	(sub-)klinische Ketose (n = 7)	p-Wert
NEFA [µmol/L Plasma]	399 ± 29 <sup>a</sup>	865 ± 69 <sup>b</sup>	<0,001
Energiebilanz [MJ NEL/Tag]	-55,8 ± 4,1 <sup>a</sup>	-84,4 ± 10,6 <sup>b</sup>	0,018

NEFA = nicht veresterte freie Fettsäuren, BHBA = 3-Hydroxybutansäure

**Tabelle 3.54 Korrelationen zwischen Energiebilanz, NEFA und Parametern der Ketogenese in Woche 1 pp. (n = 50, p < 0,05)**

	Korrelationskoeffizient R			
	BHBA	<i>ACAT</i>	<i>HMGCL</i>	<i>HMGCS2</i>
NEFA	0,539 (p < 0,001)	0,506 (p < 0,001)	n.s.	n.s.
Energiebilanz	-0,362 (p = 0,063)	n.s.	n.s.	n.s.

NEFA = nicht veresterte freie Fettsäuren, BHBA = 3-Hydroxybutansäure, *ACAT1* = Acetyl-CoA-Acetyltransferase, *HMGCL* = 3-Hydroxymethyl-3-Methylglutaryl-CoA-Lyase, *HMGCS2* = 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-Synthase 2

LPS, Inflammation und Ketogenese

Die Expression des negative akute-Phase-Protein-codierenden Gens *TTR* war bei Tieren mit (sub-)klinischer Ketose signifikant erniedrigt. Inverse Korrelationen der *HMGCL* Expression mit *HP*, *CP*, *TNF*, *Il1b* sowie eine positive Korrelation von *HMGCL* mit *RBP4* im Plasma konnten zudem beobachtet werden (Tabelle 3.55). Des Weiteren zeigte *ACAT* eine inverse Korrelation zu *TNF* und *CCL2*. Die mRNA-Konzentrationen der akute-Phase-Proteine-codierenden Gene *CP* und *CRP* sowie die Expression des proinflammatorischen Gens *Il8* waren bei Tieren mit (sub-)klinischer Ketose zudem im Vergleich zu Tieren mit BHBA-Konzentrationen im Normbereich tendenziell erhöht (Tabelle 3.56).

Zwischen der Konzentration von LPS im Plasma und der Konzentration an BHBA sowie den Genexpressionen der der Ketogenese konnte kein Zusammenhang festgestellt werden.

**Tabelle 3.55 Korrelationen zwischen Entzündungsmarkern und Parametern des Fettstoffwechsels zum Zeitpunkt Woche 1 pp. (n = 50, dargestellt sind nur signifikante Korrelationen  $p < 0,05$ )**

	Korrelationskoeffizient R			
	BHBA	<i>ACAT</i>	<i>HMGCL</i>	<i>HMGCS2</i>
<u>positive akute-Phase-Proteine-codierende Gene</u>				
<i>SAA</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>HP</i>	n.s.	n.s.	0,291	n.s.
<i>CP</i>	n.s.	n.s.	0,477	n.s.
<i>CRP</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<u>negative akute-Phase-Proteine-codierende Gene</u>				
<i>RBP4</i>	0,471	n.s.	n.s.	n.s.
<i>TTR</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<u>Proinflammatorische Gene</u>				
<i>TNF</i>	n.s.	-0,319	0,318	n.s.
<i>IL1b</i>	n.s.	n.s.	0,339	n.s.
<i>IL8</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>PTGS2</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>CCL2</i>	n.s.	-0,389	n.s.	n.s.
<i>AOAH</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<u>Plasmaparameter</u>				
Albumin [mg/mL]	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>SAA</i> [ng/mL]	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>RBP4</i> [ng/mL]	n.s.	n.s.	-0,314	n.s.
LPS [ $\mu$ g/L]	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

*CP* = Ceruloplasmin, *CRP* = C-reaktives Protein, *HP* = Haptoglobin, *SAA* = Serumamyloid A, <sup>2</sup>*TTR* = Transthyretin, *RBP4* = Retinol-bindendes Protein 4, <sup>3</sup>*CCL2* = Chemokin-Ligand 2, *IL1B* = Interleukin 1 beta, *IL8* = Interleukin 8, *PTGS2* = Prostaglandin-Endoperoxid Synthase 2, *TNF* = Tumor-Nekrose Faktor, BHBA = 3-Hydroxybutansäure, *ACAT1* = Acetyl-CoA-Acetyltransferase, *HMGCL* = 3-Hydroxymethyl-3-Methylglutaryl-CoA-Lyase, *HMGCS2* = 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-Synthase 2, n.s. = nicht signifikant ( $p > 0,05$ )

**Tabelle 3.56 Genexpressionen von Parametern der Inflammation zum Zeitpunkt 1 Woche pp. bei Tieren normaler BHBA-Konzentration (BHBA  $\leq$  1,20 mmol/L, MW  $0,67 \pm 0,03$ ) sowie Tieren mit (sub-)klinischer Ketose (BHBA  $>$  1,20 mmol/L, MW  $1,72 \pm 0,08$ )**

	BHBA im Normbereich (n = 43)	(sub-)klinische Ketose (n = 7)	p-Wert
<u>positive akute-Phase-Proteine-codierende Gene</u>			
<i>SAA</i>	1,00 $\pm$ 0,16	1,06 $\pm$ 0,37	0,887
<i>HP</i>	1,00 $\pm$ 0,30	1,61 $\pm$ 0,73	0,443
<i>CP</i>	1,00 $\pm$ 0,08	1,37 $\pm$ 0,18	0,072
<i>CRP</i>	1,00 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>	1,32 $\pm$ 0,15 <sup>b</sup>	0,050
<u>negative akute-Phase-Proteine-codierende Gene</u>			
<i>RBP4</i>	1,00 $\pm$ 0,03	1,13 $\pm$ 0,08	0,157
<i>TTR</i>	1,00 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>	0,61 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup>	<0,001
<u>Proinflammatorische Gene</u>			
<i>TNF</i>	1,00 $\pm$ 0,07	0,91 $\pm$ 0,17	0,639
<i>IL1b</i>	1,00 $\pm$ 0,07	0,90 $\pm$ 0,16	0,570
<i>IL8</i>	1,00 $\pm$ 0,10	1,52 $\pm$ 0,24	0,052
<i>PTGS2</i>	1,00 $\pm$ 0,08	1,10 $\pm$ 0,19	0,635
<i>CCL2</i>	1,00 $\pm$ 0,10	0,82 $\pm$ 0,23	0,469
<i>AOAH</i>	1,00 $\pm$ 0,10	0,68 $\pm$ 0,24	0,235
<u>Plasmaparameter</u>			
Albumin [mg/mL]	2,83 $\pm$ 0,05	2,98 $\pm$ 0,13	0,262
<i>SAA</i> [ng/mL]	314 $\pm$ 12	298 $\pm$ 32	0,654
<i>RBP4</i> [ng/mL]	1527 $\pm$ 61	1210 $\pm$ 158	0,068
LPS [ $\mu$ g/L]	0,45 $\pm$ 0,07	0,48 $\pm$ 0,17	0,851

*CP* = Ceruloplasmin, *CRP* = C-reaktives Protein, *HP* = Haptoglobin, *SAA* = Serumamyloid A, *TTR* = Transthyretin, *RBP4* = Retinol-bindendes Protein 4, *CCL2* = Chemokin-Ligand 2, *IL1B* = Interleukin 1 beta, *IL8* = Interleukin 8, *PTGS2* = Prostaglandin-Endoperoxid Synthase 2, *TNF* = Tumor-Nekrose Faktor, *LPS* = Lipopolysaccharide

### Oxidativer Stress und Ketogenese

Einzelne inverse Korrelationen zwischen der hepatischen Expression von *HMGCL* mit der Konzentration an  $\alpha$ -Tocopherol,  $\beta$ -Carotin und Retinol im Plasma (Tabelle 3.58) sowie eine verringerte Konzentration an  $\gamma$ -Tocopherol bei Tieren mit (sub-)klinischer Ketose (Tabelle 3.57) könnten auf einen schwachen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von oxidativem Stress und der Entstehung der Ketose hinweisen. Allerdings war die Konzentration an TBARS im Plasma invers mit der BHBA-Konzentration verknüpft. Weitere Marker des oxidativen Stresses zeigten keinen Zusammenhang zu Parametern der Ketogenese.

**Tabelle 3.57 Genexpressionen von Parametern des oxidativen Stresses zum Zeitpunkt 1 Woche pp. bei Tieren normaler BHBA-Konzentration (BHBA  $\leq$  1,20 mmol/L, MW  $0,67 \pm 0,03$ ) sowie Tieren mit (sub-)klinischer Ketose (BHBA  $>$  1,20 mmol/L, MW  $1,72 \pm 0,08$ )**

	BHBA im Normbereich (n = 43)	(sub-)klinische Ketose (n = 7)	p-Wert
$\gamma$ -Tocopherol [ $\mu$ mol/g Lipid]	$0,12 \pm 0,01^b$	$0,07 \pm 0,02^a$	0,026
$\alpha$ -Tocopherol [ $\mu$ mol/g Lipid]	$5,25 \pm 0,34$	$5,19 \pm 0,99$	0,954
$\beta$ -Carotin [ $\mu$ mol/g Lipid]	$11,81 \pm 0,75$	$12,15 \pm 1,99$	0,875
Retinol [ $\mu$ mol/g Lipid]	$0,76 \pm 0,04$	$0,82 \pm 0,09$	0,530
TEAC [mmol/L Plasma]	$3,66 \pm 0,07$	$3,44 \pm 0,16$	0,219
TBARS [ $\mu$ mol/L]	$0,86 \pm 0,03^b$	$0,66 \pm 0,06^a$	0,006
Proteincarbonyle [nmol/mg Protein]	$0,30 \pm 0,02$	$0,31 \pm 0,04$	0,665

TEAC = Trolox-äquivalente antioxidative Kapazität, TBARS = Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen

**Tabelle 3.58 Korrelationen zwischen Parametern des oxidativen Stresses und Parametern der Ketogenese in Woche 1 pp. (n = 50, p < 0,05)**

	Korrelationskoeffizient R			
	BHBA	<i>ACAT</i>	<i>HMGCL</i>	<i>HMGCS2</i>
$\gamma$ -Tocopherol [ $\mu$ mol/g Lipid]	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
$\alpha$ -Tocopherol [ $\mu$ mol/g Lipid]	n.s.	n.s.	-0,310	n.s.
$\beta$ -Carotin [ $\mu$ mol/g Lipid]	n.s.	n.s.	-0,286	n.s.
Retinol [ $\mu$ mol/g Lipid]	n.s.	n.s.	-0,363	n.s.
TEAC [mmol/L Plasma]	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
TBARS [ $\mu$ mol/L]	-0,458	-0,286	n.s.	n.s.
Proteincarbonyle [nmol/mg Protein]	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

BHBA = 3-Hydroxybutansäure, ACAT1 = Acetyl-CoA-Acetyltransferase, HMGCL = 3-Hydroxymethyl-3-Methylglutaryl-CoA-Lyase, HMGCS2 = 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-Synthase 2, TEAC = Trolox-äquivalente antioxidative Kapazität, TBARS = Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen, n.s. = nicht signifikant (p > 0,05)

### 3.3.3 Zusammenhang zwischen Fettstoffwechsel und Ketogenese

Die Daten der vorliegenden Studie zeigten in Woche 1 pp. signifikante Korrelationen zwischen der BHBA-Konzentration im Plasma und dem TG- sowie Cholesterolgehalt in der Leber ( $r = 0,522$ ,  $p < 0,001$ ;  $r = 0,404$ ,  $p = 0,007$ ). Des Weiteren war die BHBA-Konzentration sowie die Expression des bei der Ketogenese relevanten Gens *ACAT* bei Tieren mit moderater Fettleber im Vergleich zu Tieren mit einer niedrigeren hepatischen TG Konzentration erhöht (Tabelle 3.59). Diese Ergebnisse deuten zusammen mit der Beobachtung, dass 71% der Tiere mit einer moderaten Fettleber zusätzlich eine subklinische Ketose entwickelten (s. Abschnitt 3.3) auf einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Fettleber und Ketose hin.

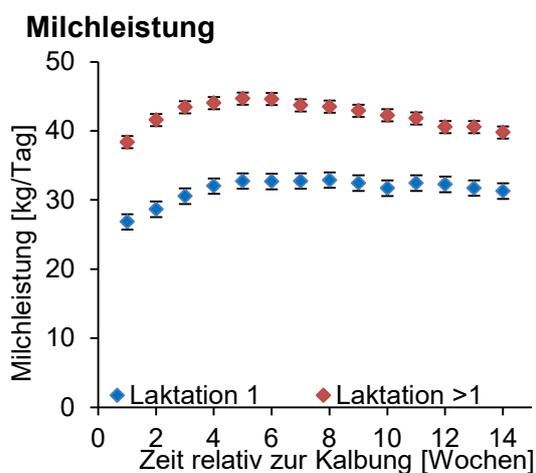
**Tabelle 3.59 Genexpressionen von Parametern der Ketogenese zum Zeitpunkt 1 Woche pp. bei Tieren mit normalem hepatischen Fettgehalt (TG < 10 mg/g) sowie Tieren mit milder (TG 10 - 50 mg/g) oder moderater Fettleber (TG ≥ 50 mg/g)**

	normale Leber TG (n=7)	milde Fettleber (n=36)	moderate Fettleber (n=7)	p- Wert
BHBA	0,61 ± 0,11 <sup>a</sup>	0,73 ± 0,05 <sup>a</sup>	1,21 ± 0,14 <sup>b</sup>	0,003
ACAT1	1,00 ± 0,10 <sup>a</sup>	1,10 ± 0,05 <sup>a</sup>	1,54 ± 0,10 <sup>b</sup>	0,001
HMGCL	1,00 ± 0,13	0,86 ± 0,06	0,94 ± 0,13	0,594
HMGCS2	1,00 ± 0,19	0,91 ± 0,09	0,92 ± 0,19	0,915

BHBA = 3-Hydroxybutansäure, ACAT1 = Acetyl-CoA-Acetyltransferase, HMGCL = 3-Hydroxymethyl-3-Methylglutaryl-CoA-Lyase, HMGCS2 = 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-Synthase

### 3.4 Einfluss auf die Milchleistung

Die durchschnittliche tägliche Milchleistung der Herde in den ersten 15 Wochen nach der Abkalbung ist in Abbildung 3.10 dargestellt. Die Milchleistung nahm in den ersten Wochen pp. kontinuierlich zu und blieb DNA ab Woche fünf pp. nahezu konstant. Sie war zudem abhängig von der Laktationsgruppe. Färsen wiesen während des gesamten Versuchszeitraums eine signifikant niedrigere Milchleistung auf als höherlaktierende Tiere (Tabelle 3.60).



**Abbildung 3.10 Milchleistung von Kühen in der peripartalen Phase (Laktation 1: n = 19, Laktation > 1: n = 31, dargestellt sind Ismeans ± Standardfehler)**

**Tabelle 3.60 Milchleistung in Abhängigkeit der Laktationsnummer**

Laktationsnummer	Milchleistung [kg/100 Tage]
1 (n = 19 Tiere)	3140 ± 101 <sup>a</sup>
>1 (n = 31 Tiere)	4227 ± 79 <sup>b</sup>

a, b: Signifikanzniveaus (p < 0,001)

### 3.4.1 ER-Stress, FGF21, Nrf2-Aktivierung und Milchleistung

In der vorliegenden Studie waren in Woche 1 pp. keine Korrelationen zwischen der Milchleistung und der mRNA-Expression von *FGF21* oder Genen der UPR zu beobachten (Anhang, Tabelle 6.15). Die Milchleistung der Tiere mit einem hohen Level an ER-Stress unterschied sich nicht von der Milchleistung der Tiere mit niedrigem ER-Stress (Tabelle 3.61). Mit Ausnahme einer positiven Korrelation der durchschnittlichen täglichen Milchleistung mit *CAT* in Woche 1 pp. ( $r = 0,360$ ,  $p = 0,011$ ) waren Nrf2-Zielgene ebenfalls nicht mit der Milchleistung korreliert (Anhang, Tabelle 6.16).

**Tabelle 3.61 Milchleistung bei Tieren mit niedrigem, mittlerem und hohem ER-Stress Level (Einteilung anhand der relativen *HSPA5*-Expressionen:  $1,00 \pm 0,32$ /  $2,02 \pm 0,20$ /  $5,32 \pm 0,32$ )**

	niedriger Stress (n=11)	mittlerer Stress (n=28)	hoher Stress (n=11)	p-Wert
Milchleistung [kg/Tag] <sup>1</sup>	$36,3 \pm 2,2$	$32,9 \pm 1,4$	$34,6 \pm 2,2$	0,417
Milchleistung [kg/100 Tage]	$3993,0 \pm 208,8$	$3720,7 \pm 130,8$	$3872,2 \pm 208,8$	0,521

<sup>1</sup>Durchschnittliche tägliche Milchleistung von Tag 7-13 pp.

### 3.4.2 Energiebilanz, freie Fettsäuren und Milchleistung

Eine höhere Milchleistung war mit dem Auftreten einer stärker negativen Energiebilanz sowie einer höheren Konzentration an freien Fettsäuren im Plasma in Woche 1 pp. verknüpft. Sowohl die tägliche Milchleistung (Tag 7-13 pp.) als auch die 100 Tage-Laktation waren invers mit der Energiebilanz und positiv mit der Konzentration an freien Fettsäuren korreliert (Tabelle 3.62).

**Tabelle 3.62 Korrelationen zwischen der Energiebilanz sowie der Konzentration an freien Fettsäuren im Plasma in Woche 1 pp. und der Milchleistung (n = 50, p < 0,05)**

	Korrelationskoeffizient R	
	Milchleistung [kg/Tag] <sup>1</sup>	Milchleistung [kg/100 Tage]
NEFA [ $\mu\text{mol/L}$ Plasma]	0,442 ( $p = 0,003$ )	0,314 ( $p = 0,034$ )
Energiebilanz [MJ NEL/Tag]	-0,421 ( $p = 0,016$ )	-0,407 ( $p = 0,021$ )

<sup>1</sup>Durchschnittliche tägliche Milchleistung von Tag 7-13 pp.

### 3.4.3 LPS, Inflammation und Milchleistung

Die durchschnittlich tägliche Milchleistung (Tag 7-13 pp.) sowie die 100 Tage Laktation waren invers mit der mRNA-Konzentration des positiv akute-Phase-Protein-codierenden Gens *HP* korreliert ( $r = -0,378$ ,  $p = 0,007$ ;  $r = -0,346$ ,  $p = 0,014$ ). Des Weiteren zeigte die Milchleistung eine positive Korrelation zu dem negativ akute-Phase-Proteinen-codierenden Gen *RBP4* sowie zu der Albumin-Konzentration im Plasma. Allerdings war auch eine inverse Korrelationen zwischen *TTR* und der Milchleistung zu beobachten (Tabelle 3.63). Die Konzentration an LPS

im Plasma und weitere Entzündungsparameter zeigten keinen Zusammenhang mit der Milchleistung (Anhang, Tabelle 6.17).

**Tabelle 3.63 Korrelationen zwischen der Milchleistung und den negativ akute-Phase-Proteinen (codierenden Genen) in Woche 1 pp. (n = 50, p < 0,05)**

	Korrelationskoeffizient R	
	Milchleistung [kg/Tag] <sup>1</sup>	Milchleistung [kg/100 Tage]
<i>RBP4</i> (Genexpression)	0,423 (p = 0,003)	0,363 (p = 0,011)
<i>TTR</i> (Genexpression)	-0,298 (p = 0,049)	-0,354 (p = 0,018)
Albumin [mg/mL Plasma]	0,389 (p = 0,008)	0,377 (p = 0,011)

*TTR* = Transthyretin, *RBP4* = Retinol-bindendes Protein 4

<sup>1</sup>Durchschnittliche tägliche Milchleistung von Tag 7-13 pp.

#### 3.4.4 Oxidativer Stress und Milchleistung

Die Konzentrationen der Vitamine  $\gamma$ -Tocopherol,  $\alpha$ -Tocopherol,  $\beta$ -Carotin und Retinol im Plasma in Woche 1 pp. waren positiv mit der Milchleistung korreliert (Tabelle 3.64). Ein positiver oxidativer Status könnte demnach zu einer Verbesserung der Milchleistung beitragen.

**Tabelle 3.64 Korrelationen zwischen Parametern des oxidativen Stresses in Woche 1 pp. und der Milchleistung (n = 50, p < 0,05)**

	Korrelationskoeffizient R	
	Milchleistung [kg/Tag] <sup>1</sup>	Milchleistung [kg/100 Tage]
$\gamma$ -Tocopherol [ $\mu$ mol/g Lipid]	0,346	0,314
$\alpha$ -Tocopherol [ $\mu$ mol/g Lipid]	0,450	0,465
$\beta$ -Carotin [ $\mu$ mol/g Lipid]	0,291	0,285
Retinol [ $\mu$ mol/g Lipid]	0,457	0,409
TEAC [mmol/L Plasma]	n.s.	n.s.
TBARS [ $\mu$ mol/L]	n.s.	n.s.
Proteincarbonyl [nmol/mg Protein]	n.s.	n.s.

TEAC = Trolox-äquivalente antioxidative Kapazität, TBARS = Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen, n.s. = nicht signifikant (p > 0,05)

<sup>1</sup>Durchschnittliche tägliche Milchleistung von Tag 7-13 pp.

#### 3.4.5 Calcium-, Vitamin D- Stoffwechsel und Milchleistung

Höhere Konzentrationen an Calcium im Plasma waren mit einer höheren Milchleistung verknüpft, während die Phosphatkonzentration invers mit der Milchleistung korrelierte (Tabelle 3.65). Weitere Parameter des Calcium- und Vitamin D- Stoffwechsels zeigten keinen Zusammenhang zur Milchleistung (Anhang, Tabelle 6.18).

**Tabelle 3.65 Korrelationen zwischen der Milchleistung und der Konzentration an Calcium und Phosphat im Plasma in Woche 1 pp. (n = 50, p < 0,05)**

	Korrelationskoeffizient R	
	Milchleistung [kg/Tag] <sup>1</sup>	Milchleistung [kg/100 Tage]
Calcium	0,477 (p = 0,001)	0,478 (p = 0,001)
Phosphat	-0,502 (p < 0,001)	-0,551 (p < 0,001)

<sup>1</sup>Durchschnittliche tägliche Milchleistung von Tag 7-13 pp.

### 3.4.6 Fettstoffwechsel, Ketogenese und Milchleistung

Kühe mit einer moderat ausgeprägten Fettleber zeigten gegenüber Tieren mit einer niedrigeren hepatischen TG-Konzentration eine tendenziell höhere durchschnittliche tägliche Milchleistung an Tag 7-13 pp. Die 100 Tage-Laktation war bei diesen Tieren signifikant erhöht. Zudem war die 100 Tage-Laktation mit der Konzentration an TG in der Leber in Woche 1 pp. korreliert (r = 0,300, p = 0,036).

**Tabelle 3.66 Milchleistung bei Tieren mit normalem hepatischen Fettgehalt (TG < 10 mg/g) sowie Tieren mit milder (TG 10 - 50 mg/g) oder moderater Fettleber (TG ≥ 50 mg/g)**

	normale Leber TG (n=7)	milde Fettleber (n=36)	moderate Fettleber (n=7)	p-Wert
Milchleistung <sup>1</sup> [kg/Tag]	27,9 ± 2,7	34,7 ± 1,2	36,6 ± 2,7	0,049
Milchleistung [kg/100 Tage]	3208 ± 246 <sup>a</sup>	3882 ± 109 <sup>b</sup>	4070 ± 246 <sup>b</sup>	0,030

<sup>1</sup>Durchschnittliche tägliche Milchleistung von Tag 7-13 pp.

Die Konzentration an BHBA im Plasma war sowohl mit der täglichen Milchleistung als auch mit der 100 Tage Laktation korreliert (r = 0,572, p < 0,001; r = 0,558, p < 0,001). Im Einklang mit diesen Beobachtungen war die Milchleistung bei Tieren mit (sub-)klinischer Ketose tendenziell erhöht (Tabelle 3.67).

**Tabelle 3.67 Milchleistung bei Tieren mit normaler BHBA-Konzentration (BHBA ≤ 1,20 mmol/L, MW 0,67 ± 0,03) sowie Tieren mit (sub-)klinischer Ketose (BHBA > 1,20 mmol/L, MW 1,72 ± 0,08)**

	BHBA im Normbereich (n = 43)	(sub-)klinische Ketose (n = 7)	p-Wert
Milchleistung [kg/Tag] <sup>1</sup>	33,17 ± 1,13	38,10 ± 2,77	0,106
Milchleistung [kg/100 Tage]	3732 ± 104	4243 ± 255	0,070

BHBA = 3-Hydroxybutansäure, <sup>1</sup>Durchschnittliche tägliche Milchleistung von Tag 7-13 pp.

## 4 Diskussion

### 4.1 Stoffwechsellanpassungen der Milchkuh während der peripartalen Phase

#### 4.1.1 Energiebilanz und Fettmobilisation

In der Literatur ist das Auftreten einer negativen Energiebilanz in Folge der einsetzenden Laktation bei Kühen ausführlich beschrieben (Block et al. 2001; Butler und Smith 1989; Vries und Veerkamp 2000). Mit der einsetzenden Laktation steigt der Energiebedarf der Tiere drastisch an, während die Futteraufnahme nur langsam gesteigert wird. Energieaufnahme und Energiebedarf geraten aus dem Gleichgewicht und der Organismus gerät in einen Zustand der negativen Energiebilanz. Auch in der vorliegenden Studie konnte das Auftreten einer negativen Energiebilanz beobachtet werden, wobei diese in Woche 1 pp. mit -56 MJ NEL/Tag am stärksten ausgeprägt war (Abbildung 3.1). Im Einklang mit der Literatur (Grummer 1995) kam es bereits ab Woche 3 vor der Abkalbung zu einem leichten Rückgang der Energieaufnahme, der durch endokrine Veränderungen verursacht sein könnte (Grummer et al. 1990).

Zur Kompensation der NEB werden vermehrt Fettsäuren aus dem Fettgewebe freigesetzt. Die Konzentration an freien Fettsäuren im Plasma der untersuchten Tiere dieser Studie ist in Woche 1 pp. bei Mehrkalbskühen um Faktor 4,1 und bei Färsen um Faktor 2,6 in Bezug zu Woche 2 ap. erhöht (Abbildung 3.2). Diese Erhöhung ist mit bereits beschriebenen Beobachtungen vergleichbar (Barletta et al. 2017; Hammon et al. 2009; Adewuyi et al. 2005). Bei einer stärker ausgeprägten negativen Energiebilanz werden vermehrt Fettsäuren aus dem Fettgewebe mobilisiert. Die Konzentration an freien Fettsäuren bei den untersuchten Tieren der vorliegenden Studie korrelierte in Woche 1 pp. direkt mit der negativen Energiebilanz.

Die Konzentration an Triglyceriden im Plasma ist im Gegensatz zur NEFA-Konzentration postpartum jedoch signifikant niedriger als in Woche 2 ap. Die Cholesterolkonzentration im Plasma ist bereits in Woche 2 ap. sowie Woche 1 pp. gegenüber der späteren Laktation reduziert (Abbildung 3.3). Die verringerten Konzentrationen an Triglyceriden und Cholesterol im Plasma in Woche 1 pp. stehen im Einklang mit in der Literatur beschriebenen Ergebnissen (Kessler et al. 2014). Eine Erklärung für diese Beobachtungen kann ein erhöhter Transfer von TG und Cholesterol in die Milch sowie eine möglicherweise verringerte Kapazität der Leber zur Ausschleusung von TG und Cholesterol in der Frühaktation sein (Kessler et al. 2014).

#### 4.1.2 Inflammation in der Frühlaktation

Das Auftreten eines Inflammations-ähnlichen Zustandes, insbesondere die Induktion der akuten-Phase-Reaktion, ist bei frühlaktierenden Milchkühen beschrieben (s. Einleitung). So konnten Gessner et al. (2013) beispielsweise eine Erhöhung der hepatischen mRNA-Konzentration von *TNF*, *CRP*, *HP* und *SAA* in Woche 1 pp. gegenüber Woche 3 ap. feststellen, während Trevisi et al. (2012) bei frühlaktierenden Milchkühen eine Erhöhung der HP- und CP-Konzentration im Plasma beschreiben. In der vorliegenden Studie war die Expression der APP codierenden Gene *HP* und *SAA* in der Leber in Woche 1 pp. gegenüber Woche 2 ap. erhöht, während die hepatische mRNA-Konzentration des negativ APP codierenden Gens *TTR* verringert war (Tabelle 3.1). Eine höhere hepatische Expression des APP codierenden Gens *CP* sowie eine gegenüber der späteren Laktation erhöhte Konzentration an *SAA* im Plasma sind bereits in Woche 2 ap. und Woche 1 pp. zu beobachten. Im Einklang dazu waren die Konzentrationen der negativen APP Albumin und RBP4 im Plasma in Woche 2 ap. und 1 pp. reduziert (Tabelle 3.2).

Die hepatischen Expressionen der analysierten proinflammatorischen Gene (Cytokine) war in der vorliegenden Studie in Woche 1 pp. im Vergleich zu den anderen Prüfzeitpunkten nicht erhöht. Für *CCL2* und *IL8* war ein Anstieg in Woche 4 und 7 pp. zu beobachten. Die kontroversen Beobachtungen bezüglich der Expressionen der APP codierenden und proinflammatorischen Gene könnten evtl. mit unterschiedlichen Produktionsorten erklärbar sein. Cytokine werden von verschiedenen Zelltypen, v.a. aber von Makrophagen und Mastzellen produziert (Ametaj et al. 2005; Bradford et al. 2015), während APP vorwiegend in der Leber exprimiert werden. So wäre es denkbar, dass die hepatische mRNA-Konzentration von APP in Folge einer gesteigerten Expression von proinflammatorischen Genen in anderen Organen wie z. B. in Milchdrüse und Uterus, durch Beeinträchtigungen während der Kalbung, Infektionen oder die verstärkte Freisetzung von pro-inflammatorischen Cytokinen während der gesteigerten Fettsäuremobilisation (Khan et al. 2015) erhöht wird, ohne dass die proinflammatorischen Gene selbst stärker in der Leber exprimiert werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie weisen insgesamt auf das Vorliegen eines hepatischen Entzündungsprozesses während der peripartalen Phase hin. Allerdings war die Erhöhung der inflammatorischen Parameter postpartum im Vergleich zu den Studien von Gessner et al. (2013) und Trevisi et al. (2012) schwächer ausgeprägt. Dies könnte mit einem unterschiedlichen Herdenmanagement während der Tierversuche und verschiedenen

Einflussfaktoren wie z. B. einem unterschiedlichen Stresslevel erklärbar sein (weitere Diskussion in Abschnitt 4.9).

#### Energiebilanz, freie Fettsäuren und Inflammation

In der vorliegenden Studie konnte kein Zusammenhang zwischen Inflammation und dem Auftreten einer negativen Energiebilanz oder der Konzentration an freien Fettsäuren im Plasma festgestellt werden. Andere Faktoren wie z. B. mikrobielle Komponenten, oxidativer Stress, Gewebeschädigungen oder Infektionen spielen demnach bei der Entstehung der Inflammation in der Frühlaktation eine größere Rolle (s. 1.1.2).

Interessanterweise war die hepatische mRNA-Konzentration des negativen APPs *RBP4* mit einer stärker ausgeprägten negativen Energiebilanz, sowie einer höheren Konzentration an freien Fettsäuren im Plasma assoziiert. *RBP4*, das in erster Linie als Transporter für Retinol fungiert, wurde als Adipokin identifiziert und kann eine Insulin-Resistenz induzieren (Maher 2013). In der Literatur wird zudem ein Einfluss des physiologischen Status von Milchkühen auf die hepatische *RBP4* Expression beschrieben (Rezamand et al. 2012). Die Rolle des *RBP4* in der Frühlaktation bedarf jedoch noch weiteren Untersuchungen.

#### Lipopolysaccharide

In der peripartalen Phase steht der Organismus der Milchkuh einer Reihe von Stoffwechsellanpassungen gegenüber, was ihn besonders anfällig für Infektionen wie z. B. Endometritis oder Mastitis macht. Im Verlauf dieser Erkrankungen, die von gram-negativen Bakterien wie z.B. *E. Coli* ausgelöst werden, kommt es zu einer Freisetzung von bakteriellen Endotoxinen (Lipopolysacchariden) (Vels et al. 2009). Auch eine subakuten Pansenazidose oder eine Störung der intestinalen Barrierefunktion nach der Abkalbung können eine verstärkte Aufnahme von LPS in den Blutkreislauf fördern (s. 1.1.2). In der Leber können LPS den NF $\kappa$ B aktivieren, der wiederum die Transkription von proinflammatorischen und APP - codierenden Genen induziert (Whiteside und Israel 1997; Sun und Andersson 2002; Pahl 1999). Die Eigenschaft von LPS, Inflammation auszulösen, ist allgemein bekannt (Vels et al. 2009; Hoeben et al. 2000; Hiss et al. 2004). So erzielten Vels et al. beispielsweise durch eine LPS-Infusion bei Milchkühen eine Steigerung der hepatischen Expression von proinflammatorischen und APP-codierenden Genen (Vels et al. 2009).

Da es aus technischen Gründen (begrenztes Probenmaterial) in der vorliegenden Studie nicht möglich war, die LPS Konzentration über den gesamten Versuchszeitraum zu messen, wurde sich hier auf den Zeitpunkt Woche 1 pp., an dem das höchste Auftreten an LPS erwartet wurde, beschränkt. Die Konzentration an LPS im Plasma zeigte zu diesem Zeitpunkt eine positive

Korrelation mit der hepatischen mRNA-Konzentration von HP (s. 3.1.2.2). Weitere Korrelationen zwischen Parametern der Inflammation und LPS wurden nicht beobachtet. In Zusammenhang mit den in der Literatur beschriebenen Beobachtungen ist trotzdem anzunehmen, dass LPS zu einer Induktion der Inflammation in der Frühlaktation beitragen können. Allerdings deuten die geringen Korrelationen mit Entzündungsmarkern in der vorliegenden Studie darauf hin, dass weitere Faktoren eine größere Rolle bei der Induktion der hepatischen Inflammation in der Frühlaktation spielen. So ist beispielsweise eine Aktivierung der Inflammation in Folge von oxidativem oder ER-Stress möglich (s. 4.1.3 und 4.2).

Die Acyloxyacyl-Hydrolase (AOAH) ist ein Enzym, das selektiv die sekundären Acylketten der Lipid A Region der LPS hydrolysiert und somit die Toxizität der LPS herabsetzt (Munford und Hall 1986; Kitchens et al. 1992). Die hepatische mRNA-Konzentration des *AOAH*-codierenden Gens ist in Woche 1 pp. gegenüber Woche 2 ap. signifikant reduziert (Tabelle 3.3). Dies könnte darauf hinweisen, dass frühlaktierende Milchkühe eine geringere Kapazität zur Detoxifizierung der LPS haben. Um dieses Phänomen näher zu beschreiben sind weitere Untersuchungen nötig, bei denen z. B. die Enzymaktivität von AOAH während der peripartalen Phase bestimmt werden könnte. Auf Grund des begrenzten Probenmaterials waren diese Analysen im Rahmen der vorliegenden Studie nicht möglich.

#### 4.1.3 Oxidativer Stress

Zur Beurteilung des oxidativen Stresses während der Frühlaktation wurden oxidative und antioxidative Parameter im Plasma gemessen. Als oxidative Parameter wurden TBARS (ein Indikator der Lipidoxidation) sowie Proteincarbonyle (Produkte der Proteinoxidation) betrachtet. Gleichzeitig wurden antioxidative Vitamine und die Trolox-äquivalente antioxidative Kapazität (TEAC) bestimmt. In der vorliegenden Studie wurde in Woche 1 pp eine signifikante Reduktion der Vitamine ( $\beta$ -Carotin, Retinol und  $\alpha$ -Tocopherol) gegenüber Woche 2 ap. beobachtet, die im späteren Verlauf der Laktation wieder rückläufig war, während die Konzentration an  $\gamma$ -Tocopherol in Woche 2 ap. und Woche 1 pp. im Vergleich zu Woche 4 und 7 pp. reduziert war. Die TEAC, die als Summenparameter die oxidative Kapazität des Plasmas beschreibt, ist in Woche 1 pp. ebenfalls verringert, während TBARS und Proteincarbonyle in Woche 2 ap. sowie die Proteincarbonyle zusätzlich in Woche 1 pp. im Gegensatz zur späteren Laktation erhöht waren. Die Ergebnisse weisen insgesamt darauf hin, dass nach der Abkalbung vermehrt oxidativer Stress auftritt. Bereits vor der Abkalbung kommt es zu einer Reihe von Stoffwechsellanpassungen, die zu einer gesteigerten Oxidation von

Lipiden und Proteinen führen könnten. Oxidativer Stress und/ oder eine reduzierte antioxidative Abwehr während der Früh lactation der Milchkuh werden im Einklang mit den Beobachtungen der vorliegenden Studie in der Literatur beschrieben (Castillo et al. 2005; Calderon et al. 2007; Sharma et al. 2011). In der peripartalen Phase kommt es zu einer verstärkten Bildung von ROS, während die antioxidative Abwehr geschwächt ist (s. 1.1.3).

#### Oxidativer Stress und Inflammation

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von oxidativem Stress und Inflammation in Woche 1 pp. (Tabelle 3.6). So wurden sowohl inverse Korrelationen zwischen den Konzentrationen an Retinol,  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Tocopherol mit Expressionen von akute-Phase-Proteine-codierenden Genen als auch positive Korrelationen zwischen der  $\gamma$ -Tocopherol-Konzentration und den Expressionen der negativen akute-Phase-Protein-codierenden Gene *RBP4* und *TTR* sowie zwischen Retinol und *RBP4* beobachtet. Einerseits kann es während des Entzündungsprozesses zur vermehrten Bildung von ROS kommen (Shi et al. 2015; Ringseis et al. 2015), andererseits können ROS den Nuklearfaktor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) aktivieren und somit Inflammation fördern (Pillarsetti und Saxena 2004), sodass oxidativer Stress und Inflammation sich gegenseitig verstärken.

#### Oxidativer Stress, Energiebilanz und NEFA

Des Weiteren wurde beobachtet, dass die TEAC im Plasma mit stärkerer Ausprägung der negativen Energiebilanz abnimmt (3.1.3.1). Ein Zusammenhang zwischen oxidativem Stress und NEB wurde auch in der Literatur beschrieben (Pedernera et al. 2010). Eine stärkere NEB führt zur vermehrter Freisetzung und Oxidation von Lipiden, was wiederum eine erhöhte Freisetzung von ROS zur Folge hat und so zu einer Verstärkung des oxidativen Stresses beitragen könnte.

#### **4.1.4 Calcium- und Vitamin D- Stoffwechsel**

Mit der einsetzenden Laktation steigt der Calcium-Bedarf der Milchkuh drastisch an (DeGaris und Lean 2008). Um ausreichend Calcium bereitzustellen und den Verlust über die Milch auszugleichen, sind eine Reihe von Stoffwechsellanpassungen notwendig (s. 1.1.4). Schlagen diese Anpassungen fehl, kann es zur Entwicklung von Milchfieber, einer weiteren bedeutenden Stoffwechselerkrankung in der Früh lactation, kommen. Serologisch ist dieser Zustand durch Calciumkonzentrationen von  $< 2,0$  mmol/L gekennzeichnet (Reinhardt et al. 2011). In der Literatur ist eine Reduktion des Calciumspiegels in den ersten Tagen nach der Abkalbung

bereits ausführlich beschrieben (Caixeta et al. 2017a; Reinhardt et al. 2011; Goff 2008). In der vorliegenden Studie war es auf Grund des begrenzten Probenmaterials nicht möglich, die Parameter des Calcium- und Vitamin D- Stoffwechsels über den gesamten Zeitverlauf zu analysieren, sodass ausschließlich Proben aus Woche 1 pp. betrachtet wurden. Auffällig in der vorliegenden Studie war, dass Mehrkalbskühe gegenüber Färsen signifikant höhere Konzentrationen an Calcium- sowie niedrigere Konzentrationen an Phosphat aufwiesen (Tabelle 3.13), während in der Literatur beschrieben ist, dass das Auftreten von Milchfieber mit zunehmender Laktationsnummer ansteigt (Caixeta et al. 2017a; Reinhardt et al. 2011). Eine Ursache für diese Diskrepanz könnte der späte Zeitpunkt der Probennahme (Woche 1 pp.) in der vorliegenden Studie sein. In den Studien von Caixeta und Reinhardt erfolgte die Probennahme innerhalb der ersten drei Tage pp., da die Reduktion des Calciumspiegels in diesem Zeitraum am stärksten ausgeprägt ist. In Woche 1 pp., in der die Probennahme in der vorliegenden Studie erfolgte, hat sich der Calciumspiegel wieder weitgehend regeneriert. So zeigten alle Tiere bereits wieder Calciumkonzentrationen von  $> 2,0$  mmol/L. Es wäre möglich, dass die Regeneration bei Kühen schneller vonstattengeht als bei Färsen, was die höheren Calciumkonzentrationen der Kühe in Woche 1 pp. erklären könnte. Die Korrelationsanalysen in Woche 1 pp. können dennoch Hinweise auf eine mögliche Assoziation des Calcium- und Vitamin D Stoffwechsels mit anderen Stoffwechselwegen in der Frühaktation geben.

#### Energiebilanz, freie Fettsäuren und Calciumstoffwechsel

In der vorliegenden Studie war in Woche 1 pp. eine inverse Korrelation zwischen der Konzentration an Calcium und der Energiebilanz in Woche 1 pp. zu beobachten (3.1.6.1). Zudem korrelierte die Konzentration an freien Fettsäuren im Plasma positiv mit der Calciumkonzentration sowie invers mit der Phosphatkonzentration. Eine Ursache für diese Beobachtungen könnte die positive Korrelation zwischen der Calciumkonzentration im Plasma und der Milchleistung sowie die inverse Korrelation zwischen der Phosphatkonzentration und der Milchleistung sein (3.4.5). Tiere mit einer hohen Milchleistung weisen eine stärker ausgeprägte negative Energiebilanz sowie höhere NEFA-Konzentrationen im Plasma auf (3.4.2).

#### Oxidativer Stress, Calcium- und Vitamin D- Stoffwechsel

Zwischen den Parametern des oxidativen Stresses und den Parametern des Calcium- und Vitamin D-Stoffwechsels waren nur vereinzelte Korrelationen zu beobachten, was keinen klaren Zusammenhang zwischen den Stoffwechselwegen erkennen lässt. Die inverse Korrelation zwischen Retinol und Phosphat sowie eine positive Korrelation zwischen dem

Nrf2-Zielgen *GPX1* und Phosphat in Woche 1 pp. könnten evtl. auf eine Verbindung zwischen einer erhöhten Phosphatkonzentration und oxidativem Stress hindeuten.

#### Calcium-, Vitamin D- Stoffwechsel, LPS und Inflammation

Die Konzentration an LPS im Plasma ist in der vorliegenden Studie invers mit der Konzentration an Calcium korreliert (s. Tabelle 3.14). In Gegenwart von LPS scheint die Adaption an einen erhöhten Calcium-Bedarf negativ beeinflusst zu werden. Ähnliche Beobachtungen machten Kvidera et al. (2017), die bei Kühen nach einer Behandlung mit LPS eine Reduktion der Calciumkonzentration im Serum um 46% feststellten. Die Gruppe postulierte, dass die Reduktion von Calcium in Gegenwart von LPS auf die Beteiligung von Calcium an der Aktivierung des Immunsystems zurückzuführen sein könnte (Kvidera et al. 2017b). Eine erhöhte LPS-Konzentration ging in der vorliegenden Studie mit einer gesteigerten Konzentration an Parathormon einher. PTH wird in Folge von niedrigen Calciumkonzentrationen freigesetzt. Demnach könnte die Korrelation von PTH und LPS als eine Reaktion auf den niedrigeren Calciumspiegel verstanden werden.

In der vorliegenden Studie sind neben dem LPS-Gehalt die hepatischen Expressionen von *SAA* und *HP* negativ mit dem Calciumgehalt korreliert, während die Expression des negativen APP-codierenden Gens *RBP4* positiv mit der Calciumkonzentration zusammenhängt. Umgekehrt geht eine erhöhte Konzentration an Phosphat mit einer vermehrten *SAA* Expression, sowie einer verminderten *RBP4* mRNA-Konzentration einher. Im Einklang mit diesen Beobachtungen wurden bei Kühen mit Milchfieber gegenüber gesunden Tieren erhöhte Plasmakonzentrationen an *SAA* festgestellt (Ametaj et al. 2003). Die Ergebnisse weisen insgesamt darauf hin, dass der Calciumgehalt im Plasma durch Inflammation negativ beeinflusst wird, während die Phosphat Konzentration bei Entzündung ansteigt. Die beobachteten positiven Assoziationen zwischen HVD3 und der Expression von *SAA*, und *CP* sowie die inverse Beziehung zwischen HVD3 und der *RBP4*-Konzentration im Plasma könnten eine Anpassung, an die mit der Inflammation einhergehende erniedrigte Calciumkonzentration darstellen, mit dem Ziel, den Calciumspiegel wieder zu regenerieren.

## 4.2 Auftreten und Ursachen von ER-Stress in der Frühlaktation

Gessner et al. (2014) beschreiben das Auftreten von ER-Stress in der Frühlaktation bei Milchkühen (n=13). Die Gruppe konnten zeigen, dass die Expression von *HSPA5 (BIP)*, einem wichtigen Regulator der UPR, sowie die Expressionen einiger Zielgene aller drei ER-Stress Transduktoren bei frühlaktierenden Kühen (Woche 3 ap.) gegenüber der späten Trächtigkeit signifikant erhöht ist (1,9 - 4fach). Der Ausgangswert wurde für die meisten Gene zum Ende des Versuchszeitraums (14 Wochen pp.) nicht wieder erreicht. In der vorliegenden Studie konnten diese Beobachtungen nur teilweise reproduziert werden (Tabelle 3.15). Die hepatischen Expressionen von *HSPA5*, dem Master Regulator der UPR, sowie die der *CASP9* waren in Woche 1 pp. gegenüber Woche 2 ap. erhöht (Faktor 1,27 bzw. 1,13). Die mRNA-Konzentrationen von *BAK1*, *HERPUDI* und *XBPIs* waren in Woche 2 ap. sowie Woche 1 pp. gegenüber Woche 4 und 7 pp. gesteigert, während bei *ATF4*, *BAX*, *CASP8*, *CASP9*, *DDIT3*, *PDIA4* und *DNAJC3* keine signifikante Veränderung über den Zeitverlauf festgestellt werden konnte. Ein Vergleich der vorliegenden Studie mit der Studie von Gessner et al. (2014) ist auf Grund des unterschiedlich gewählten Bezugspunktes (-2 Wochen vs. -3 Wochen ap.) erschwert. Die erhöhten Expressionen von *BAK*, *HERPUD* und *XBPIs* in Woche 2 ap. und Woche 1 pp. gegenüber Woche 4 und 7 pp. in der vorliegenden Studie könnten darauf hinweisen, dass das Auftreten von ER-Stress bereits vor der Abkalbung beginnt. Dementsprechend ist der Unterschied zwischen Woche 2 ap. und Woche 1 pp. nicht so stark ausgeprägt wie der Unterschied von Woche 3 ap. auf Woche 1 pp., der von Gessner et al. betrachtet wurde.

Drong et al. untersuchten 60 Milchkühe von Tag 42 ap. bis Tag 56 pp. (Drong et al. 2017). Die Expressionen von *HSPA5*, *ATF4*, und *FGF21* waren in Woche 1 pp. gegenüber Woche 2 ap. erhöht, während für *DDIT3* kein Zeitabhängigkeit festgestellt werden konnte. Diese Ergebnisse konnten mit Ausnahme von *ATF4* in der vorliegenden Studie reproduziert werden. Da verschiedene Faktoren für die Entstehung und Ausprägung von ER-Stress während der Frühlaktation verantwortlich sein können, kann das Herdenmanagement dabei eine wichtige Rolle spielen. Deshalb sind weitere (Herden-übergreifende) Untersuchungen nötig, um den Beginn und das generelle Auftreten von ER-Stress während der peripartalen Phase zu untersuchen.

Trotz des insgesamt niedrigen Expressionsunterschiedes von Genen der UPR zwischen Woche 2 ap. und Woche 1 pp. in der untersuchten Tiergruppe, gibt es deutliche Schwankungen zwischen den einzelnen Tieren. Demnach können eine Korrelationsanalyse sowie die Einteilung der Tiere anhand der Ausprägung des ER-Stresses Rückschlüsse auf mögliche individuelle Risikofaktoren für ER-Stress liefern. Die Einteilung der Tiere erfolgte anhand der

hepatischen *HSPA5*-mRNA-Konzentration in Woche 1 pp., da *HSPA5* als Masterregulator des ER-Stresses gilt. Die Gruppen mit niedriger, mittlerer und hoher *HSPA5*-mRNA-Konzentration unterscheiden sich zudem signifikant in der Expression der meisten übrigen Gene der UPR (*ATF4*, *DNAJC3*, *EDEMI*, *HERPUDI*, *PDIA4* und *XBP1s*) (Tabelle 3.16). Die Expressionsunterschiede der Apoptose induzierenden Gene *BAX*, *CASP3*, 8 und 9 sowie *DDIT3* unterscheiden sich numerisch, wenn auch nicht signifikant zwischen den Gruppen mit niedrigem und hohem ER-Stress. Die Einteilung anhand der *HSPA5* mRNA-Konzentration ist demnach gut geeignet, um das Ausmaß des ER-Stresses insgesamt widerzuspiegeln.

In der Literatur werden verschiedene Ursachen von ER-Stress beschrieben wie z. B. freie Fettsäuren (Fu et al. 2012; Wei et al. 2006; Wang et al. 2006), Inflammation (Chae et al. 2012; Kanki et al. 2009) oder reaktive Sauerstoffspezies (Cao und Kaufman 2014). Da es sich dabei um Gegebenheiten handelt, die in der Leber von frühlaktierenden Milchkühen auftreten, wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss dieser Parameter auf das Auftreten von ER-Stress in der Frühlaktation untersucht und im Folgenden diskutiert.

#### Energiebilanz, freie Fettsäuren und ER-Stress

Bei Stoffwechselstörungen wie Adipositas und Diabetes, in deren Zusammenhang hohe NEFA-Konzentrationen im Plasma nachweisbar sind, wurde das Auftreten von ER-Stress in der Leber beschrieben (Cnop et al. 2012). Daher wurde in dieser Arbeit eine erhöhte Konzentration an NEFA im Plasma in Folge der negativen Energiebilanz nach der Abkalbung als möglicher Auslöser für die Entstehung von ER-Stress bei frühlaktierenden Milchkühen betrachtet. Es konnte jedoch kein eindeutiger Zusammenhang zwischen dem Auftreten von ER-Stress und der Konzentration an NEFA in Woche 1 pp. festgestellt werden (3.2.1). In Zellversuchen wurde gezeigt, dass gesättigte Fettsäuren ER-Stress auslösen können (Wei et al. 2006; Wang et al. 2006), während ungesättigte Fettsäuren keinen ER-Stress induzieren (Geng et al. 2013). Die Arbeitsgruppe postulierte, dass die Fettsäure-Zusammensetzung einen größeren Einfluss auf das Entstehen von ER-Stress hat als die totale Fettsäurekonzentration. In Plasma und Leber von Rindern stellen Palmitin-, Öl-, Stearin- und Linolsäure die Hauptfettsäuren dar (Rukkwamsuk et al. 2000). Inwiefern das Verhältnis aus gesättigten zu ungesättigten Fettsäuren in Rindern geeignet ist ER-Stress auszulösen, ist bislang nicht geklärt. Nach den Ergebnissen der vorliegenden Studie zu urteilen, scheint eine erhöhte NEFA Konzentration in der Frühlaktation jedoch nicht die Ursache für das Auftreten von ER-Stress zu sein. Dies steht im Einklang mit der Hypothese, dass die Entstehung von ER-Stress evtl. bereits ap. beginnt (s.o.) und die NEFA Konzentrationen erst pp. drastisch ansteigt. Des Weiteren zeigen die Ergebnisse der

vorliegenden Studie keinen Zusammenhang zwischen der negativen Energiebilanz und ER-Stress.

### LPS und ER-Stress

In der Leber werden LPS von Toll-like Rezeptoren (TLR) erkannt, was eine Induktion einer mikrobiellen Stress-Antwort zur Folge hat, die u. a. die Produktion von pro-inflammatorischen Cytokinen aktiviert (Cláudio et al. 2013). Diese mikrobielle Stress-Antwort weist sowohl Gemeinsamkeiten als auch Unterschiede mit der UPR auf, sodass ein Zusammenhang nicht ausgeschlossen werden kann (Cláudio et al. 2013). So führt eine Aktivierung von TLR2 und 4 beispielsweise zu einer Aktivierung von IRE1 $\alpha$  und XBP1, während die Transkription von BiP (HSPA5) vermindert ist (Martinon et al. 2010). Die erhobenen Daten der vorliegenden Studie zeigten in Woche 1 pp. eine Korrelation zwischen der LPS-Konzentration im Plasma und der hepatischen mRNA-Konzentration von *ATF4*, während weitere Expressionen von Genen der UPR nicht mit LPS korreliert waren. Tiere mit einem hohen Level an ER-Stress weisen im Vergleich zu Tieren mit einem niedrigeren Level an ER-Stress höhere LPS-Konzentrationen im Plasma auf, wobei der Unterschied jedoch nicht signifikant ist (Tabelle 3.18). LPS könnten demnach bei frühlaktierenden Milchkühen über den ATF4-Weg zum Entstehen des ER-Stresses beitragen, scheinen jedoch auf Grund der fehlenden Korrelationen mit weiteren Genen der UPR nicht die Hauptursache für das Auftreten von ER-Stress in der Frühlaktation zu sein. Ein indirekter Einfluss von LPS über die Induktion einer Inflammation auf die Entstehung von ER-Stress wäre ebenfalls möglich.

### Inflammation

Ein möglicher Zusammenhang von Inflammation und dem Auftreten von ER-Stress ist in der Literatur bereits beschrieben. Dabei wird Inflammation einerseits als Auslöser für ER-Stress betrachtet, andererseits kann ER-Stress selbst wiederum die Inflammation begünstigen.

So gibt es Studien, die pro-inflammatorische Cytokine wie TNF und IL1 $\beta$  als Auslöser von ER-Stress identifizieren (Chae et al. 2012; Kanki et al. 2009). Xue et al. beobachteten in Fibrosarkom-Zellen eine Induktion der UPR durch TNF, die über ROS vermittelt wird (Xue et al. 2005). In  $\beta$ -Zellen des Pankreas führten IL1 $\beta$ , TNF und IFN $\gamma$  in Gegenwart von Stickstoffmonoxid zu einer Erhöhung des ER-Stresses (Kacheva et al. 2011). Bei Interleukin 1 - Rezeptor Typ 1 - Knockout - Mäusen hingegen kam es zur Downregulation relevanter Proteine der UPR (Roos et al. 2009).

Die über ER-Stress induzierte Inflammation wird vor allem über eine Aktivierung des NF $\kappa$ B vermittelt. Dieser Transkriptionsfaktor transloziert im aktiven Zustand vom Cytosol in den

Nucleus und reguliert dort die Transkription einer Vielzahl an immun-, inflammations-, und wachstumsrelevanten Genen (Serasanambati und Chilakapati 2016). So beobachteten Yamazaki et al. bei Zellen, die durch ein Zytotoxin gestresst wurden, eine Aktivierung des NFκB über den ATF6-Weg (Yamazaki et al. 2009). Urano et al. zeigten, dass der in Folge der UPR phosphorylierte IRE1α mit seiner cytosolischen Seite an das Adapterprotein TNF-Rezeptor-assoziiertes-Faktor 2 (TRAF2) bindet (Urano et al. 2000). In Folge dessen kommt es über eine Aktivierung von c-Jun N-terminalen Kinasen (JNK) und NFκB zur Bildung von proinflammatorischen Cytokinen. Ebenfalls wird in der Literatur eine Aktivierung des NFκB über den PERK-Weg beschrieben (Deng et al. 2004; Jiang et al. 2003).

Des Weiteren kann die Aktivierung von Akute-Phase-Proteinen direkt über ER-Stress induziert werden. Das hepatische cAMP-Responseelement-bindende Protein (ein Leber spezifischer Transkriptionsfaktor) wird bei ER-Stress gespalten, was die Transkription von Akute-Phase-Proteinen-codierenden Genen wie *CRP* und *SAA* induziert (Zhang et al. 2006).

In der vorliegenden Studie konnten in Woche 1 pp. positive Korrelationen zwischen den mRNA-Konzentrationen der APP - codierenden Gene *SAA*, *HP*, *CP* und *CRP* mit hepatischen Expressionen von Genen aller drei Transduktionswege der UPR beobachtet werden. Die Expressionen des negativen Akute-Phase-Protein-codierenden Genes *TTR* war invers mit *HSPA5* und *PDIA4* korreliert (Tabelle 3.21). Tiere mit einem hohen Level an ER-Stress wiesen zudem signifikant höhere mRNA-Konzentrationen an *HP*, *CP* und *CRP* auf als Tiere mit einem niedrigeren Level an ER-Stress (Tabelle 3.20). Des Weiteren zeigten die mRNA-Konzentrationen der proinflammatorischen Gene *TNF*, *IL1b* und *PTGS2* positive Korrelationen zu einigen Genen der UPR (Tabelle 3.22). Die gemessenen Konzentrationen von *SAA*, *HP*, *RBP4* und Albumin im Plasma korrelierten bis auf eine Ausnahme (*RBP4* und *DDIT3* mit  $r = 0,305$ ,  $p = 0,042$ ) jedoch nicht mit den Expressionen von Genen der UPR.

Die Ergebnisse deuten insgesamt stark auf einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von ER-Stress und dem Vorliegen eines hepatischen Entzündungsprozesses bei frühlaktierenden Milchkühen hin. Eine Beziehung zwischen einem systemischen Entzündungsprozess und dem Auftreten von ER-Stress in der Leber ist auf Grund der fehlenden Korrelationen zwischen Genen der UPR und der Konzentration an Entzündungsmarkern im Plasma hingegen nicht nachweisbar. Die pro-inflammatorischen Gegebenheiten, die in der Leber frühlaktierender Kühe herrschen, könnten zu einem Entstehen von ER-Stress beitragen. Die Möglichkeit einer Induktion des Entzündungsprozesses über den NFκB-Weg in Folge der UPR kann die bestehende Inflammation weiter verstärken.

### Oxidativer Stress und ER Stress

In Einklang mit der Literatur zeigten die Daten der vorliegenden Studie, dass oxidativer Stress in der Frühlaktation bei Milchkühen auftritt (s. 4.1.3). Ein Zusammenhang von ER-Stress und oxidativem Stress wurde in der Literatur bereits diskutiert (Hotamisligil 2010). Exogene Oxidantien wie ROS-Bildner, Peroxide und Produkte der Lipidoxidation, die in der Frühlaktation der Milchkuh vermehrt gebildet werden, können die Proteinfaltung im ER beeinträchtigen und somit ER-Stress induzieren (Cao und Kaufman 2014). So kann beispielsweise 7-Ketocholesterol in glatten Gefäßmuskelzellen die UPR aktivieren (Pedruzzi et al. 2004). Eine weitere Studie beschreibt eine Begünstigung der Phosphorylierung von eIF2 $\alpha$  durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bei einer L929 Tumor-Zelllinie, wohingegen für PERK und XBP1 keine Effekte beobachtet werden konnten (Xue et al. 2005). Darüber hinaus wurde festgestellt, dass ER-Stress bei fettleibigen Mäusen mit mitochondrialen DNA Schädigung und oxidativem Stress assoziiert ist (Yuzefovych et al. 2013). In *in-vivo* Studien führte eine Fütterung mit antioxidativen Substanzen wie z. B. polyphenolhaltige Pflanzen(-extrakten) zu einer Reduktion von ROS und ER-Stress (Rodriguez et al. 2015; Zhang et al. 2009), was ein weiteres Indiz für einen Zusammenhang zwischen oxidativem Stress und ER-Stress sein könnte.

Fehlgefaltete Proteine im ER, die im Zusammenhang mit ER-Stress auftreten, können wiederum die Entstehung von oxidativem Stress fördern. In Folge des ER-Stresses können ROS über verschiedene Mechanismen gebildet werden. U.a. können eine Proteinefehlfaltung und die Reduktion von Disulfidbindungen ein Defizit an GSH hervorrufen, was die Bildung neuer ROS begünstigt (Hayes und Dinkova-Kostova 2014). Des Weiteren kann CHOP (DDIT3) über die Induktion der Transkription von Ero1 $\alpha$  die ROS Produktion fördern (Cao und Kaufman 2014). Beim Auftreten von ER-Stress kommt es außerdem zu einer vermehrten Freisetzung von Ca<sup>2+</sup>-Ionen aus dem ER. Die Ca<sup>2+</sup>-Ionen werden von den Mitochondrien aufgenommen und fördern dort die Produktion von ROS (Szabadkai und Rizzuto 2004).

Entsprechend den oben genannten Ausführungen liegt die Vermutung nahe, dass der oxidative Stress bei frühlaktierenden Milchkühen mit dem Auftreten von ER-Stress assoziiert ist. In der vorliegenden Studie zeigen einzelne antioxidative Parameter inverse Zusammenhänge mit Genen der UPR (Tabelle 3.23). So sind die Konzentrationen an Retinol,  $\beta$ -Carotin, und  $\alpha$ -Tocopherol im Plasma in Woche 1 pp. invers mit der Expression von *BAK1* korreliert, während Retinol zusätzlich inverse Korrelationen zu *PDIA4* und *XBPIs* zeigt. Des Weiteren wurden Korrelationen zwischen den Parametern des oxidativen Stresses (TBARS und Proteincarbonyle) mit einzelnen Expressionen von Genen der UPR beobachtet, was dafür sprechen würde, dass das Auftreten von ER-Stress mit dem Auftreten von oxidativem Stress

im Zusammenhang steht. Allerdings sind auf der anderen Seite auch einzelne positive Korrelationen zwischen der hepatischen mRNA-Konzentration von Genen der UPR (*DDIT3*, *CASP3* und *EDEMI*) zu beobachten, während Tiere mit hohem und niedrigem Level an ER-Stress keine Unterschiede in ihren antioxidativen und oxidativen Markern aufweisen. Demzufolge kann anhand der Daten der vorliegenden Studie keine klare Aussage zu einem Zusammenhang zwischen ER-Stress und oxidativem Stress bei frühlaktierenden Milchkühen getroffen werden. Eine Ursache für die widersprüchlichen Ergebnisse könnte die Aktivierung von Nrf2 in Folge des ER-Stresses sein. Zielgene des Nrf2 eliminieren ROS, sodass der oxidative Stress sinkt.

#### Calcium-, Vitamin D- Stoffwechsel und ER-Stress

Eine der Hauptaufgaben des ERs neben der Proteinsynthese stellt seine Funktion als intrazelluläre Calciumspeicher dar. Eine Störung der Calcium-Homöostase z. B. induziert durch die Hemmung der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase des sarko- und endoplasmatischen Retikulums (SERCA) mittels Thapsigargin führt zu einer Induktion von ER-Stress (Breckenridge et al. 2003). Demnach liegt die Vermutung nahe, dass der Calciumstoffwechsel in der Frühlaktation mit dem Auftreten von ER-Stress im Zusammenhang stehen könnte. In der vorliegenden Studie waren bei Tieren mit einem hohen Level an ER-Stress im Gegensatz zu Tieren mit einem niedrigen Level an ER-Stress jedoch keine signifikanten Unterschiede von Parametern des Calcium- und Vitamin D-Stoffwechsels zu beobachten (s. Tabelle 3.25). Des Weiteren waren keine Korrelationen zwischen der Calcium- Konzentration und der hepatischen mRNA-Konzentration von Genen der UPR in Woche 1 pp. feststellbar. Demnach konnte in der vorliegenden Studie kein Zusammenhang zwischen dem Calciumstoffwechsel und dem Auftreten von ER-Stress in der Frühlaktation festgestellt werden.

Die Konzentration an Phosphat korrelierte jedoch interessanterweise positiv mit der Expression der bei der Induktion der Apoptose relevanten Genen *BAK1*, *BAX* und *CASP9*. Eine Erhöhung der Phosphatkonzentration konnte bereits in Zusammenhang mit Inflammation und oxidativem Stress beobachtet werden (s. 4.1.4). Demnach scheint eine Erhöhung der Phosphatkonzentration mit dem Auftreten verschiedener Stressfaktoren assoziiert zu sein.

#### Fazit

Aus den vorliegenden Daten lässt sich Inflammation (ggf. in Verbindung mit LPS) als mögliche Hauptursache für ER-Stress identifizieren, während NEFA, oxidativer Stress sowie der Calciumstoffwechsel keinen oder nur einen geringen Einfluss auf ER-Stress zu haben scheinen.

### 4.3 FGF21

Im Einklang mit der Literatur (Schlegel et al. 2012a; Schoenberg et al. 2011; Carriquiry et al. 2009) kam es in der vorliegenden Studie nach der Abkalbung zu einem starken signifikanten Anstieg (Faktor 16) der hepatischen FGF21-mRNA-Konzentration (Tabelle 3.10). Auch die Konzentration an FGF21 im Plasma war in Woche 1 pp. gegenüber Woche 2 ap. erhöht, allerdings war diese Erhöhung auf Grund der hohen tierindividuellen Schwankungen nicht signifikant. FGF21 rückt in seiner Rolle als Stoffwechselregulator und Stresshormon, in den letzten Jahren immer mehr ins Interesse der Forschung (s. 1.2.2). Da die peripartale Phase der Milchkühe sowohl mit einer Vielzahl von Stoffwechsellanpassungen als auch mit verschiedensten Arten von Stress einhergeht, ist anzunehmen, dass FGF21 eine wichtige Rolle bei der Anpassung an diese Gegebenheiten spielt.

#### FGF21, Energiebilanz und freie Fettsäuren

Da FGF21 ein Zielgen des PPAR $\alpha$  darstellt (Lundåsen et al. 2007) und PPAR $\alpha$  durch Fettsäuren aktiviert wird (Loor et al. 2005), wäre eine Beziehung zwischen FGF21 und der Konzentration an freien Fettsäuren im Plasma denkbar. Im Einklang mit dieser Hypothese führte eine Intralipid-Infusion bei Milchkühen in einer positiven Energiebilanz über einen Anstieg an NEFA im Plasma zu einer deutlichen Erhöhung der hepatischen *FGF21*-mRNA-Konzentration sowie der FGF21 Konzentration im Plasma (Caixeta et al. 2017b). Anhand der Daten der vorliegenden Studie konnten in Woche 1 pp. allerdings keine Zusammenhänge zwischen der Energiebilanz oder der Konzentration an NEFA mit der hepatischen FGF21-Expression oder des FGF21 Gehaltes im Plasma festgestellt werden (3.1.5.1).

#### FGF21 und UPR

Die Daten der vorliegenden Studie zeigen, dass die hepatische *FGF21*-mRNA-Konzentration bei frühlaktierenden Kühen in Woche 1 pp. signifikant mit den Expressionen von *ATF4* und *HSPA5*, zwei in der UPR relevanten Gene, korreliert ist (Tabelle 3.27). Des Weiteren zeigen Tieren mit einem hohen Level an ER-Stress eine um den Faktor 6,7 höhere *FGF21* Expression als Tiere mit einem niedrigen Level an ER-Stress. Demnach liegt die Vermutung nahe, dass die gesteigerte Expression von FGF21 bei frühlaktierenden Milchkühen mit ER-Stress assoziiert ist. Eine Induktion von *FGF21* über die UPR ist auch in der Literatur beschrieben (Kim et al. 2015; Jiang et al. 2014; Schaap et al. 2013). So zeigten Schaap et al. beispielsweise, dass eine Induktion von ER Stress *in vitro* und *in vivo* über den PERK/ eIF2 $\alpha$ / ATF4-Weg zu einer gesteigerten Expression von FGF21 führt (Schaap et al. 2013). Diese Gruppe stellte fest, dass das *FGF21*-Gen in seiner Promotorregion ein spezifisches Aminosäure-response Element

besitzt, das von *ATF4* aktiviert werden kann (Schaap et al. 2013). Außerdem kann *ATF4* die Expression von  $\beta$ -Klotho, dem Co-Rezeptor von *FGF21* erhöhen (Dong et al. 2015). Jiang et al. (2014) beschreiben zudem eine Aktivierung der *FGF21*-Expression über den IRE1 $\alpha$ -XBP1-Weg. Es ist daher wahrscheinlich, dass die Induktion von *FGF21* bei frühlaktierenden Milchkühen u.a. durch ER-Stress vermittelt wird.

#### FGF21, Inflammation, LPS und oxidativer Stress

Des Weiteren konnten in der vorliegenden Studie Korrelationen zwischen der *FGF21*-Expression in der Leber und den APP-codierenden Genen *HP* und *CP* sowie eine schwache positive Korrelation ( $r = 0,282$ ) zu der Konzentration an LPS im Plasma beobachtet werden (Tabelle 3.11). Sowohl die mRNA-Konzentration der negativen APP-codierenden Gene *RBP4* und *TTR* als auch die Retinol- und  $\gamma$ -Tocopherol-Konzentration im Plasma waren invers mit der hepatischen *FGF21* Expression korreliert (Tabelle 3.11). Dies kann darauf hinweisen, dass Inflammation und oxidativer Stress ebenfalls zu einer gesteigerten Expression an *FGF21* bei frühlaktierenden Kühen beitragen. Im Einklang mit dieser Hypothese konnten Akbar et al. (2015) bei Milchkühen mit einer durch LPS induzierten Inflammation erhöhte *FGF21*-Konzentrationen im Serum nachweisen, während Gariani et al. (2013) bei Menschen mit Sepsis oder Inflammation ebenfalls erhöhte *FGF21* - Konzentrationen feststellten. Ein Zusammenhang zwischen *FGF21* und oxidativem Stress wird ebenfalls in der Literatur diskutiert (Gómez-Sámano et al. 2017; Planavila et al. 2013).

Beim Menschen wird *FGF21* als Stresshormon betrachtet (Nishimura et al. 2000; Gómez-Sámano et al. 2017). Die Daten der vorliegenden Studie weisen darauf hin, dass *FGF21* auch bei frühlaktierenden Milchkühen eine Rolle bei der Anpassung an Stress, z. B. in Form von ER-Stress, Inflammation und/ oder oxidativem Stress spielen kann.

Der molekulare Mechanismus der Beziehung zwischen Inflammation, oxidativem Stress und *FGF21* ist noch unklar, der Zusammenhang zwischen ER-Stress und *FGF21* hingegen ist gut beschrieben. Da Inflammation und oxidativer Stress ER-Stress auslösen könnten, könnte ER-Stress eine mögliche Verbindung zwischen Inflammation, oxidativem Stress und einer *FGF21*-Induktion bei frühlaktierenden Milchkühen sein.

#### 4.4 Nrf2-Weg

Der redox-sensitive Transkriptionsfaktor Nrf2, der u.a. in Folge von oxidativem oder ER-Stress aktiviert werden kann, reguliert die Transkription zahlreicher cytoprotektiver und antioxidativer Gene (s.1.2.1). Gessner et al. (2013) beobachteten eine gesteigerte mRNA-Konzentration verschiedener Nrf2-Zielgene in der Leber frühlaktierender Milchkühe. Die Gruppe postulierte, dass Nrf2 in dieser Stoffwechselphase eine wichtige Rolle für den Schutz der Leber vor ROS und Inflammation darstellen könnte. In der vorliegenden Studie war entgegen den Ergebnissen von Gessner et al. (2013) postpartum nur die hepatische *MT1A* Expression signifikant erhöht, während bei weiteren Nrf2-Zielgenen (*CAT*, *GPX1*, *NQO1*, *SOD1* und *UGT1A1*) in Woche 1 pp. gegenüber Woche 2 ap. kein Unterschied feststellbar war (Tabelle 3.7). Eine Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse könnte der im Vergleich zu Gessner *et al.* deutlich schwächer ausgeprägte ER-Stress pp., oder auch der unterschiedliche Bezugspunkt Woche 3 ap. vs. Woche 2 ap. sein (s.4.2).

##### Nrf2-Aktivierung, Energiebilanz und freie Fettsäuren

In der vorliegenden Studie konnten bis auf eine einzelne Korrelation zwischen der hepatischen *NQO1* Expression und der Konzentration an freien Fettsäuren im Plasma keine weiteren Zusammenhänge von NEB, NEFA und einer Aktivierung des Nrf2 festgestellt werden. Dies steht im Einklang mit den Beobachtungen von Gessner et al. (2013), die ebenfalls keine Korrelationen zwischen Nrf2-Zielgenen und der Konzentration an NEFA feststellen konnten. Demnach scheinen die negative Energiebilanz, sowie die NEFA Konzentration keinen Einfluss auf eine Nrf2-Aktivierung in der Leber frühlaktierender Milchkühe zu haben.

##### Nrf2-Aktivierung und Inflammation

Bei den durchgeführten Untersuchungen dieser Studie wurden einige positive Korrelationen zwischen Nrf2-Zielgenen und APP codierenden sowie proinflammatorischen Genen beobachtet (Tabelle 3.8). Während des Entzündungsprozesses werden reaktive Sauerstoffspezies freigesetzt, die zu einer Aktivierung des Nrf2 führen können (Nguyen et al. 2004). Des Weiteren können in Folge der UPR sowohl der entzündungsfördernde NFκB, sowie der antiinflammatorische Nrf2 Weg aktiviert werden, was eine gleichzeitige Hochregulation von inflammatorischen und Nrf2-Zielgenen erklären kann (Cullinan et al. 2003, Li et al. 2015). Auf der anderen Seite sind in der vorliegenden Studie auch einzelne inverse Korrelationen zwischen Entzündungsmarkern und der Expression der Nrf2-Zielgene zu beobachten, während die Expressionen der negativen APP-codierenden Gene *RBP4* und *TTR* überwiegend positiv

mit Nrf2-Zielgenen korreliert. Eine Erklärung für die kontroversen Beobachtungen ist es, dass eine Aktivierung von Nrf2 während des Entzündungsprozesses eine zytoprotektive Funktion hat (Kim et al. 2010). So zeigten Ergebnisse einer Studie, dass eine Nrf2-Aktivierung während der Inflammation zur Zytoprotektion von Hepatozyten beiträgt, indem die Entzündungsreaktionen vermindert wird (Osburn et al. 2008). Nrf2-Zielgene reduzieren ROS, die zur Verstärkung der Inflammation beitragen würden (Pillarisetti und Saxena 2004).

#### Nrf2-Aktivierung und oxidativer Stress

In der vorliegenden Studie sind die Genexpressionen einiger Nrf2-Zielgene in Woche 1 pp. invers mit den Konzentrationen an Vitaminen im Plasma, oder dem Summenparameter TEAC korreliert (Tabelle 3.9). Da die verringerte Konzentration an Vitaminen und TEAC ein Zeichen für das vermehrte Auftreten von oxidativem Stress und somit auch ROS im Organismus ist, deuten diese Ergebnisse daraufhin, dass eine Induktion des Nrf2-Weges in der Früh lactation der Milchkuh u.a. durch oxidativen Stress vermittelt wird. Eine Aktivierung von Nrf2 in Folge von oxidativem Stress wurde in der Literatur bereits beschrieben (Taguchi et al. 2011; Nguyen et al. 2004). Die Zielgene des Nrf2 können ROS reduzieren und haben demnach eine antioxidative und zytoprotektive Wirkung im Organismus.

#### Nrf2-Aktivierung und ER-Stress

In der Literatur wird eine Aktivierung des Nrf2-Weges über die UPR diskutiert. Die Aktivierung von Nrf2 in Folge der UPR wird dabei hauptsächlich über den PERK-Weg vermittelt (Cullinan et al. 2003; Cullinan und Diehl 2004; Schröder und Kaufman 2005).

Die Genexpressionsanalysen der vorliegenden Studie in Woche 1 pp. zeigten überwiegend positive Korrelationen zwischen Genen der UPR und Nrf2-Zielgenen (Tabelle 3.29), was eine Induktion des Nrf2 über die UPR bei früh lactierenden Kühen wahrscheinlich macht. Zudem weisen Tiere mit hohem ER-Stress im Vergleich zu Tieren mit einem niedrigeren Level an ER-Stress eine signifikant höhere hepatische *MT1A* mRNA-Konzentration, sowie eine tendenziell höhere *GPX1* Expression auf (Tabelle 3.30). Auffällig sind jedoch inverse Korrelationen der Expression von *DDIT3* mit den Nrf2-Zielgenen *UGT1A1*, *GPX1*, *CAT*, *NQO1* sowie die inverse Korrelation von *EDEMI* und *NQO1*. Auch Cullinan und Diehl stellten im Zellversuch in Einklang mit diesen Beobachtungen eine inverse Korrelation zwischen der *DDIT3* Expression und Nrf2 fest, obwohl sie Nrf2 als einen von ER-Stress induzierten Transkriptionsfaktor identifizierten (Cullinan und Diehl 2004). Die Gruppe konnte zeigen, dass eine Nrf2 Überexpression die *DDIT3* Konzentration während der UPR verringert. Da der Nrf2-Weg eine zytoprotektive Funktion hat, während *DDIT3* die Apoptose induziert (Oyadomari und Mori

2004), ist eine inverse Regulation plausibel. Denkbare Mechanismen dafür wären eine Repression der *DDIT3* Expression durch den Nrf2 oder die Nrf2-Zielgene (Cullinan und Diehl 2004).

#### Nrf2-Aktivierung und FGF21

Bis auf eine einzelne inverse Korrelation zwischen den hepatischen mRNA-Konzentrationen von *CAT* und *FGF21* war bei den untersuchten Tieren in Woche 1 pp. keine Beziehung zwischen einer Aktivierung von Nrf2 und FGF21 zu beobachten. Somit ergibt sich aus den Daten kein direkter Zusammenhang zwischen FGF21 und einer Nrf2-Aktivierung bei frühlaktierenden Kühen.

### **4.5 Entstehung der Fettleber**

Im Einklang mit der Literatur (Bobe et al. 2004; Ametaj et al. 2005; Herdt 1988) wurde in der vorliegenden Studie ein starker signifikanter Anstieg der hepatischen Triglycerid- und Cholesterolkonzentration in Woche 1 pp. gegenüber Woche 2 ap. beobachtet (Abbildung 3.6). 72% der untersuchten Tiere wiesen postpartum eine milde Fettleber mit hepatischen TG Konzentrationen im Bereich von 10-50 mg/g auf, während 14% eine moderate Fettleber mit 5 - 100 mg/g TG entwickelten (s. 3.3). Diese Arbeit soll nähere Erkenntnisse zu den Faktoren liefern, die das Entstehen einer Fettleber in der Frühaktation begünstigen.

#### NEB, NEFA und Fettleber

In Folge der negativen Energiebilanz kommt es zur Freisetzung von Fettsäuren aus dem Fettgewebe. Je ausgeprägter die NEB, desto mehr NEFA werden freigesetzt (s. 1.1.1). So konnte auch in der vorliegenden Studie eine inverse Korrelation zwischen der Energiebilanz und der Konzentration an NEFA im Plasma beobachtet werden (s. 3.3.1.2). Tiere mit einer moderaten Fettleber zeigten im Gegensatz zu Tieren mit normalen Leberfettwerten eine ausgeprägtere negative Energiebilanz, sowie signifikant höhere Konzentrationen an NEFA im Plasma. Des Weiteren war die Konzentration an NEFA im Plasma mit den hepatischen Konzentrationen an TG und Cholesteroll korreliert (s. 3.3.1.2). Die Konzentration der in Folge der negativen Energiebilanz freigesetzten Fettsäuren steht demnach in einem starken Zusammenhang mit der Entstehung der Fettleber. Allerdings scheint eine durch Futterrestriktion induzierte NEB in der späteren Laktation (um Tag 100 pp.) im Gegensatz zur NEB in der Frühaktation nur zu einer geringen Erhöhung der Konzentrationen an freien Fettsäuren im Plasma zu führen, während die Fettsäuremobilisation vergleichbar ist (Gross et

al. 2011; Gross et al. 2013). Zudem entwickelten die Futter-restriktierten Tiere keine Fettleber. Auch tritt zwar bei nahezu allen hochleistenden Milchkühen in der Früh-laktation eine NEB auf, jedoch entwickeln nicht alle Tiere eine Stoffwechselerkrankung. Daher liegt die Vermutung nahe, dass neben der negativen Energiebilanz weitere tierindividuelle Faktoren während der Früh-laktation eine Rolle spielen, die die Kapazität der Leber freie Fettsäuren aufzunehmen, Triglyceride abzubauen, neue TG zu synthetisieren, oder sie als VLDL auszuschleusen, beeinträchtigen.

#### $\beta$ -Oxidation in der Früh-laktation

Nach der Abkalbung steht die Leber vor der Herausforderung, die vermehrt einströmenden Fettsäuren abzubauen. In der vorliegenden Studie kam es postpartum zu einer Erhöhung der Konzentration an Genen der  $\beta$ -Oxidation (*ACOX*, *ACADM* und *CPT1A*), die in Woche 4 pp. am stärksten ausgeprägt war (Tabelle 3.32). Im Einklang mit diesen Ergebnissen stehen Beobachtungen verschiedener Arbeitsgruppen, die ebenfalls einen Anstieg der Expressionen von Genen der  $\beta$ -Oxidation nach der Abkalbung feststellten (Loor et al. 2005; Graber et al. 2010; Schäff et al. 2012; Schlegel et al. 2012b). In den Studien von Schlegel und Loor wird zudem parallel eine erhöhte Expression des Peroxisomen-Proliferator-aktivierten-Rezeptors  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) beschrieben. In der Leber können aufgenommenen Fettsäuren den hepatischen PPAR $\alpha$  aktivieren (Loor et al. 2005), der wiederum die Expression von Genen der  $\beta$ -Oxidation induzieren kann (Contreras et al. 2013) (s.1.1.1). In der vorliegenden Studie ist die Erhöhung der mRNA-Konzentration von Genen der  $\beta$ -Oxidation in Woche 4 pp am stärksten ausgeprägt, während der Anstieg von Woche 2 ap. auf Woche 1 pp. nicht signifikant ist. Dies könnte auf eine verzögerte Anpassung der Leber an das erhöhte Einströmen von NEFA pp. hinweisen. Die verzögerte Anpassung könnte evtl. mit dem Auftreten eines Inflammations-ähnlichen Zustandes in Woche 1 pp. zusammenhängen (s. 4.5 Inflammation und Lipidstoffwechsel).

#### Lipogenese in der Früh-laktation

In der Leber und im Gastrointestinaltrakt finden bei Wiederkäuern nur insgesamt 8% der Gesamtlipogenese des Körpers statt (Hayirli 2006). Demnach spielt die hepatische Lipogenese bei der Milchkuh unter normalen physiologischen Bedingungen nur eine geringe Rolle. Das Hauptsubstrat für die hepatische TG - Bildung stellen in die Leber aufgenommene NEFA dar (Grummer 1993). Allerdings könnte die hepatische Lipogenese auf Grund der Stoffwechselanpassungen während der peripartalen Phase einen Beitrag zur Lipidakkumulation in der Leber leisten.

In der vorliegenden Studie waren die mRNA-Konzentrationen des *SREBF1* sowie die des *SREBF1*-Zielgens *GPAM* in Woche 1 pp. signifikant gegenüber Woche 2 ap. und dem späteren Verlauf der Laktation verringert (Tabelle 3.31). Die hepatischen Expressionen von *ACACA* und *FASN* waren in Woche 2 ap. und Woche 1 pp. im Vergleich zur späteren Laktation erniedrigt. Diese Beobachtungen konnten auf Proteinebene für *FASN* bestätigt werden. Im Einklang mit diesen Ergebnissen stellten Kessler et al. eine signifikante Reduktion der Expression von *SREBF1* in Woche 1 pp. gegenüber Woche 3 ap. fest (Kessler et al. 2014). Eine verringerte hepatische mRNA-Konzentration an *GPAM* in der Frühaktation wurde ebenfalls bereits beschrieben (Graber et al. 2010; Loor et al. 2006). Ursache für die reduzierte Lipogenese in der Frühaktation könnte eine niedrigere Insulinkonzentration in den ersten Tagen nach der Abkalbung sein (Graber et al. 2010), da *SREBF1* durch Insulin stimuliert wird (Daemen et al. 2013).

#### VLDL-Bildung in der Frühaktation

Der Export von Triglyceriden und Cholesterol aus der Leber erfolgt in Form von Very-low-density Lipoproteinen (VLDL) (Katoh 2002). Bei der VLDL-Bildung werden die TG zunächst an das Protein ApoB-100 gebunden, während das mikrosomale Triglyceride Transferprotein (MTTP) für Transport, Akkumulation und Bindung der TG an ApoB zuständig ist (Kulinski et al. 2002). In der Literatur ist eine Verringerung der ApoB-Konzentration im Plasma von frühaktierenden Kühen gegenüber der Trächtigkeit und späteren Laktation beschrieben (Katoh 2002; Marcos et al. 1990). Des Weiteren wurde eine verringerte hepatische Proteinkonzentrationen an ApoB bei laktierenden Kühen in Woche 1 - 4 pp. im Vergleich zu trockenstehendem Tieren festgestellt (Gruffat et al. 1997). Bernabucci et al. beobachteten zudem an Tag 3 pp. gegenüber Tag 35 ap. eine Reduktion der ApoB 100-mRNA-Konzentration (Bernabucci et al. 2004). Im Einklang mit dieser Studie war die hepatische mRNA-Konzentration an ApoB bei den in dieser Arbeit untersuchten Tieren in Woche 1 pp. gegenüber Woche 2 ap. und der späteren Laktation reduziert, wohingegen für MTTP in Übereinstimmung mit Kessler (Kessler et al. 2014) keine Änderung über den Zeitverlauf festgestellt wurde (Tabelle 3.33).

Die verminderte Expression an ApoB in Woche 1 pp. könnte bei frühaktierenden Milchkühen zu einer Limitierung der VLDL-Bildung führen und somit die Fähigkeit der Leber TG und Cholesterol auszuschleusen reduzieren. Ein Zusammenhang zwischen einer Reduktion der ApoB 100-Konzentration und dem Auftreten einer Fettleber bei Kühen wird in diversen Studien beschrieben (Marcos et al. 1990; Rayssiguier et al. 1988). Als Ursache wird neben einer erniedrigten ApoB-Expression auch eine posttranslationale Regulation über eine verringerte

Translationsrate oder auch eine erhöhte Degeneration u.a. in Folge von Stress diskutiert (Gruffat et al. 1997).

### ER Stress und Lipidstoffwechsel

In der vorliegenden Studie wurden in Woche 1 pp. positive Korrelationen der Triglycerid-, und Cholesterolkonzentration mit der hepatischen mRNA-Expression einzelner Gene der UPR (*HSPA5*, *DNAJC3*, *PDIA4* und *CASP8*) beobachtet (Tabelle 3.34). Des Weiteren zeigten Tiere mit einer moderaten Fettleber signifikant höhere Expressionen der Gene *DDIT3*, *HERPUD1* und *HSPA5* ( $p < 0,05$ ) sowie tendenziell signifikant höhere Expressionen an *DNAJC3* und *XBPIs* ( $p \leq 0,100$ ) (Tabelle 3.35). Umgekehrt war bei Tieren mit höherem ER-Stress eine signifikante Erhöhung der Konzentration an TG und Cholesterol in der Leber feststellbar (Tabelle 3.36). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Anreicherung von TG und Cholesterol in der Leber und somit die Entwicklung einer Fettleber bei frühlaktierenden Milchkühen mit dem Auftreten von ER-Stress im Zusammenhang steht.

Das ER stellt das wichtigste Zellorganell der Lipidsynthese dar. Die Rolle von ER-Stress bei der Entstehung einer Nicht-alkoholischen Fettleber (NAFLD) beim Menschen ist bereits beschrieben (Pagliassotti 2012; Zhang et al. 2014). So konnten Puri et al. beispielsweise eine gesteigerte Phosphorylierung des ER-Stress Transduktors eIF2a in der Leber von Probanden mit NAFLD beobachten, wobei die Expression von Downstream-Genen wie *ATF4* und *CHOP* (*DDIT3*) jedoch nicht erhöht war (Puri et al. 2008).

Der Mechanismus des Zusammenhangs zwischen Fettleber und ER-Stress ist noch nicht vollständig geklärt. Im Nagermodell wurde gezeigt, dass ER-Stress die Lipogenese steigern, und die  $\beta$ -Oxidation, sowie die VLDL-Ausschleusung im Gegensatz dazu vermindern kann (Lee et al. 2012; Ota et al. 2008). So beobachteten Lee et al. (2012), dass pharmakologisch induzierter ER-Stress bei Mäusen eine gesteigerte Aktivierung von SREBP-1a und SREBR 1c sowie einigen SREBP-Zielgenen bewirkt, während die Expressionen von Genen der  $\beta$ -Oxidation und Lipolyse vermindert waren. Des Weiteren kam es bei diesen Mäusen zu einem Anstieg der hepatischen TG Konzentration sowie der Entwicklung einer nicht alkoholischen Steatohepatitis. Umgekehrt führte die Deletion des ER-Stress-Transduktors PERK zu einer Hemmung der Expression von *FASN* und weiteren lipogenen Enzymen in der Milchdrüse von Mäusen (Bobrovnikova-Marjon et al. 2008). Außerdem wurde beobachtet, dass *ATF4*-knockout Mäusen vor Diät-induzierter Adipositas und hepatische Steatose geschützt sind und in der Leber sowie im weißen Fettgewebe reduzierte Expressionen von Genen der Lipogenese (*SREBF*, *ACACA*, *FASN*) aufweisen (Wang et al. 2010; Xiao et al. 2013).

In der vorliegenden Studie zeigten sich im Einklang mit diesen Beobachtungen überwiegend positive Korrelationen von Genen der UPR mit Genen der Lipogenese (Tabelle 3.34). Tieren mit einem mittleren Level an ER-Stress wiesen signifikant höhere mRNA-Konzentrationen aller gemessenen Gene der Lipogenese (mit Ausnahme von *SLC27A1*) auf, als Tiere mit einem niedrigen Level an ER-Stress (Tabelle 3.36). Bei Tieren mit stark ausgeprägtem ER-Stress waren die Expressionsunterschiede zu den Tieren mit niedrigem ER-Stress jedoch nicht signifikant, was an der geringeren Tierzahl ( $n=11$  Tiere mit hohem ER-Stress vs.  $n = 28$  Tiere mit mittlerem ER-Stress) liegen könnte. Diese Beobachtung kann aber auch darauf hindeuten, dass bei den Tieren mit hohem ER-Stress neben einer gesteigerten Lipogenese weitere Faktoren hinzukommen, die einen größeren Einfluss auf die Entwicklung einer Fettleber haben (s. u.). Die Daten lassen insgesamt darauf schließen, dass ER-Stress in der Früh lactation bei hochleistenden Milchkühen die Lipogenese in der Leber fördern könnte. Allerdings ist die Lipogenese in der Leber der Milchkühe nur gering ausgeprägt und in Woche 1 pp. zudem noch im Vergleich zu Woche 2 ap. und der späteren Laktation reduziert, sodass die durch ER-Stress induzierte Lipogenese wahrscheinlich nur einen geringen Anteil an der Lipidakkumulation in der Früh lactation hat.

Ein Einfluss von ER-Stress auf die  $\beta$ -Oxidation konnte in der vorliegenden Studie nicht festgestellt werden. Tiere mit einem hohen Level an ER-Stress zeigten im Vergleich zu Tieren mit einem niedrigen Level an ER-Stress keine signifikant unterschiedlichen Expressionsraten bei Genen der  $\beta$ -Oxidation (Tabelle 3.36). Außerdem traten sowohl negative als auch positive Korrelationen zwischen Genen der UPR und Genen der  $\beta$ -Oxidation auf (Tabelle 3.34). Neben ER-Stress gibt es in der Früh lactation demzufolge weitere Faktoren, wie z. B. die Aktivierung von PPAR $\alpha$ , die die Expression von Genen der  $\beta$ -Oxidation möglicherweise stärker beeinflussen.

Interessanterweise konnten in der vorliegenden Studie einige positive Korrelationen zwischen den mRNA-Konzentrationen von Genen der UPR und *APOB* sowie *MTTP* beobachtet werden (Tabelle 3.34). Die Expression von *MTTP* war zudem bei Tieren mit mittlerem und hohem ER-Stress gegenüber Tieren mit einem niedrigen Level an ER-Stress signifikant gesteigert ( $p < 0,05$ ), während die ApoB Expression bei diesen Tieren tendenziell erhöht war ( $p < 0,10$ ) (Tabelle 3.36). Die gesteigerte Expression an *MTTP* und *APOB* könnte bei früh lactierenden Milchkühen eine Reaktion auf die durch ER-Stress gesteigerte Lipogenese sein, mit dem Ziel die Anreicherung von Lipiden in der Leber zu vermindern. Es gibt bereits Studien, die einen Zusammenhang zwischen der VLDL-Bildung und den verschiedenen ER-Transduktionswegen untersuchen. So wurde festgestellt, dass der ER-Stress Transduktor IRE1a für eine effiziente Sekretion von Apolipoproteinen nach einer Störung der ER-Homöostase erforderlich ist (Zhang

et al. 2011). Des Weiteren wurde eine Beeinträchtigung der Assemblierung von Triglyceridreichen VLDL nach einer IRE1-Deletion beschrieben (Wang et al. 2012). Allerdings wäre auch eine erhöhte posttranslationale Degradation des ApoB-Proteins in Folge von ER-Stress denkbar, da ER-Stress mit der Fehlfaltung von Proteinen einhergeht. So zeigten Qiu et al. (2009), dass ER-Stress in HepG2-Zellen u. a. über eine Aktivierung des PERK-Weges zu einer verstärkten Degradation von ApoB führt, während andere Leberproteine wie Albumin deutlich geringer beeinflusst wurden. Ursache für die Anfälligkeit von ApoB gegenüber Fehlfaltung kann das hohe Molekulargewicht des Proteins oder die N-verknüpfte Glykosylierungsstelle am N-Terminus sein (Qiu et al. 2009). Ota et al. (2008) beobachteten, dass bei Mäusen, bei denen ER-Stress durch eine Ölsäure-Infusion induziert wurde, die ApoB Sekretion bei moderater Exposition zunächst gesteigert wurde und es bei längerer Exposition jedoch zu einer Degradation von ApoB kam. Auf Grund des begrenzten Probenmaterials war eine Untersuchung der Proteinkonzentration von ApoB in der vorliegenden Studie nicht möglich, sodass hier keine Aussagen über eine mögliche posttranslationale Degradation gemacht werden können.

Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass ER-Stress bei frühlaktierenden Kühen mit der Entstehung einer Fettleber assoziiert sein dürfte. In Folge der UPR kommt es zu einer gesteigerten Lipogenese, die jedoch in der Leber nur eine geringe Rolle spielt, während der Einfluss von ER-Stress auf die  $\beta$ -Oxidation anhand der vorliegenden Daten nicht eindeutig zu klassifizieren ist. Interessanterweise ist die mRNA-Konzentration von *ApoB* und *MTTP* positiv mit ER-Stress verknüpft, was das Ausschleusen von TG und Cholesterol als VLDL aus der Leber fördern könnte. Um zu beurteilen, inwieweit dieser Effekt auf Proteinebene durch eine mögliche Fehlfaltung und Degradation von ApoB beeinträchtigt wird, sind weitere Untersuchungen nötig.

#### FGF21 und Lipidstoffwechsel

FGF21 spielt als Stoffwechselregulator eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der Energie-Homöostase im Organismus (s. 1.2.2). In der vorliegenden Studie war die mRNA-Konzentration von FGF21 in Woche 1 pp. tendenziell mit der Konzentration an TG in der Leber korreliert ( $p < 0,10$ ). Tiere mit moderater Fettleber zeigten gegenüber Tieren mit normalen Leberfettwerten eine numerisch höhere FGF21 Expression ( $p = 0,172$ ) (Tabelle 3.37). Korrelationen zwischen FGF21 und dem Gehalt an Triglyceriden in der Leber frühlaktierender Milchkühe wurden im Einklang mit den Ergebnissen dieser Studie auch in der Literatur beschrieben (Schlegel et al. 2013; Schoenberg et al. 2011). FGF21 ist ein Zielgen des PPAR $\alpha$ ,

der wiederum durch Fettsäuren aktiviert wird (Badman et al. 2007) . Im Nagermodell wurde gezeigt, dass FGF21 die hepatische Gluconeogenese, Fettsäureoxidation und Ketogenese fördern kann (Badman et al. 2007). Eine Behandlung mit rekombinantem FGF21 führte in einem Mausmodell mit alkoholischer Fettleber zu einer Verminderung der Fettleber (Zhu et al. 2014). Es wird angenommen, dass FGF21 die Fettsäureakkumulation in der Leber vermindert (Maratos-Flier 2017). FGF21 wird bei frühlaktierenden Kühen in Folge einer PPAR $\alpha$  Aktivierung oder aber als Folge von Inflammation und ER-Stress verstärkt exprimiert (4.3). Auf Grund der Ergebnisse ist anzunehmen, dass FGF21 für den Lipidstoffwechsel frühlaktierender Kühe von Bedeutung ist und somit eine wichtige Rolle bei den Stoffwechsellanpassungen während der peripartalen Phase spielt. Kürzlich beobachteten Caixeta *et al.* (2019) zudem eine Reduktion der hepatischen TG-Konzentration um 50% bei frühlaktierenden Kühen, die mit einem Bolus an humanem FGF21 behandelt wurden im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. Die mRNA-Expression von Genen des Fettsäurestoffwechsels wurde jedoch nicht beeinträchtigt. Die Gruppe postulierte, dass FGF21 möglicherweise den Zustrom von aus dem Fettgewebe stammenden Fettsäuren in die Leber vermindert (Caixeta et al. 2019).

#### Nrf2-Aktivierung und Lipidstoffwechsel

In der vorliegenden Studie wiesen Tiere mit einer moderaten Fettleber gegenüber Tieren mit Leber TG-Konzentrationen im Normbereich eine tendenziell höhere Expression an *NQO1* und *SOD1* in Woche 1 pp. auf (Tabelle 3.38). Zudem war eine positive Korrelation zwischen *MT1A1* und der Konzentration an TG in der Leber zu beobachten (Tabelle 3.39). Da Nrf2 in Folge von ER-Stress aktiviert werden kann und ER-Stress mit der Entstehung der Fettleber verknüpft ist, sind die beobachteten schwachen Zusammenhänge von Nrf2 und der TG-Konzentration in der Leber wahrscheinlich auf die Verbindung zu ER-Stress zurückzuführen. Interessanterweise zeigten Nrf2-Zielgene einige inverse Korrelationen mit Genen der Lipogenese, sowie der Expression von *ApoB*, während ER-Stress mit Lipogenese und *ApoB* Konzentration positiv korrelierte. Bei Nrf2 handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, der die Transkription von antioxidativen und cytoprotektiven Genen reguliert und in Folge von ER- und oxidativem Stress aktiviert werden kann. Bei Nagetieren ist durch Nrf2 eine Downregulation von Genen beschrieben, die zu einer hepatischen Steatose führen (Chambel et al. 2015). Yates et al. (2009) beschreiben eine Repression von Genen der Lipogenese nach Nrf2-Aktivierung, was im Einklang mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie steht. Eine Steigerung der Expression von Genen der  $\beta$ -Oxidation sowie der Expression von *ApoB* und *MTTP* infolge einer Nrf2-Aktivierung wurde im Mausmodell ebenso beschrieben (Sharma et

al. 2018). Dies steht im Kontrast mit der in der vorliegenden Studie beobachteten inversen Korrelation zwischen ApoB und *GPXI* sowie ApoB und *NQO1*. Eine Aktivierung von Nrf2 während der Früh lactation könnte eine protektive Anpassung zum Schutz der Leber vor Cytokinen und oxidativem Stress sein, der in dieser Phase verstärkt auftritt. Um die Frage zu klären, ob Nrf2 durch die gleichzeitige Reduktion der Lipogenese und der hepatischen ApoB-mRNA-Konzentration einen positiven oder negativen Beitrag zur Lipidakkumulation in der Leber leistet, sind weitere Untersuchungen nötig.

#### Oxidativer Stress und Lipidstoffwechsel

Tiere mit einer moderaten Fettleber zeigten im Vergleich zu Tieren mit Leberfettwerten im Normbereich in Woche 1 pp. keine Unterschiede in den Parametern des oxidativen Stresses (Tabelle 3.44). Zudem waren keine Korrelationen zwischen der hepatischen Cholesterol- oder TG-Konzentration mit Parametern des oxidativen Stresses zu beobachten (Tabelle 3.45). Sowohl positive als auch inverse Korrelationen zwischen Parametern des oxidativen Stresses und den mRNA-Konzentrationen von Genen des Lipidstoffwechsels traten nur vereinzelt auf. Anhand der Daten der vorliegenden Studie ist somit kein direkter Zusammenhang zwischen oxidativem Stress und der Entstehung der Fettleber bei früh lactierenden Milchkühen erkennbar.

#### Inflammation und Lipidstoffwechsel

Tiere mit einer moderaten Fettleber wiesen im Vergleich zu Tieren mit Leber TG Werten im Normbereich in Woche 1 pp. eine tendenziell signifikant höhere hepatische *IL8* - mRNA-Konzentration ( $p < 0,10$ ) sowie eine signifikant niedrigere *TTR* Expression auf ( $p < 0,05$ ) (Tabelle 3.43). Alle übrigen Parameter der Inflammation waren nicht unterschiedlich ausgeprägt. Des Weiteren war die Expression des APP *CRP* positiv mit der Cholesterolkonzentration in der Leber korreliert, während das proinflammatorische Gen *PTGS2* eine positive Korrelation und das negative APP *TTR* eine inverse Korrelation mit der hepatischen Konzentration an TG zeigten (Tabelle 3.42). Insgesamt war demnach nur ein schwacher Zusammenhang zwischen Parametern der Inflammation und der Lipidakkumulation in der Leber zu beobachten, was darauf hindeuten kann, dass der inflammationsähnliche Zustand nicht hauptsächlich für das Entstehen einer Fettleber bei früh lactierenden Kühen ist. Allerdings ist eine Beteiligung der Inflammation z. B. über die Induktion von ER-Stress auch nicht ausgeschlossen. In der Literatur gibt es Studien, die Beziehungen zwischen Entzündungsparametern und der Entstehung einer Fettleber bei früh lactierenden Kühen beschreiben. So konnten Ametaj et al. beispielsweise Korrelationen zwischen der hepatischen Gesamtlipidkonzentration mit der SAA und HP Konzentration im Plasma zum Zeitpunkt 3, 8

und 12 Tage pp. beobachten (Ametaj et al. 2005) . Des Weiteren führte eine regelmäßige Injektion von TNF bei Holstein Kühen zu einer Steigerung der hepatischen TG Konzentration (Abuajamieh et al. 2016; Yuan et al. 2013; Trevisi et al. 2012; Bradford et al. 2009).

In der vorliegenden Studie war darüber hinaus eine deutliche Beziehung zwischen APP und der mRNA-Konzentration von Genen der  $\beta$ -Oxidation zu erkennen (Tabelle 3.42). Die  $\beta$ -Oxidation scheint bei zunehmender Inflammation unterdrückt zu werden. Ähnliche Beobachtungen machten Zhao et al., die eine Verminderung der hepatischen Fettsäure-Oxidation sowie eine gesteigerte Lipogenese bei fettreich ernährten Mäusen nach systemisch induzierter Inflammation feststellten (Zhao et al. 2015). In der vorliegenden Studie war zwischen Lipogenese und Inflammation bei frühlaktierenden Kühen jedoch kein klarer Zusammenhang erkennbar. Des Weiteren waren interessanterweise einzelne positive Korrelationen zwischen APP mit ApoB und MTTP zu beobachten (Tabelle 3.42). In der Literatur ist eine Induktion der hepatischen ApoB-mRNA sowie eine gesteigerte VLDL Sekretion durch proinflammatorische Cytokine oder auch LPS in Hepatozyten und im Mausmodell beschrieben (Aspichueta et al. 2006; Song et al. 2017; Bartolomé et al. 2008). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Inflammation in der Frühaktation bei Milchkühen ebenso eine Steigerung der VLDL-Sekretion zu Folge haben könnte.

#### 4.6 Entstehung von Ketose in der Frühaktation

Ketose ist eine häufig auftretende Stoffwechselerkrankung bei hochleistenden Milchkühen. Als Indikator für das Auftreten der Ketose wird die BHBA-Konzentration im Plasma herangezogen. Eine Erhöhung der Plasma BHBA-Konzentration wird bei Milchkühen vor allem in der Frühaktation beschrieben (Walsh et al. 2007; Doepel et al. 2002). Die Kapazität des Zitronensäurezyklus reicht in dieser Phase nicht aus, um das bei der  $\beta$ -Oxidation entstehende Acetyl-CoA vollständig abzubauen. Daher kommt es zu einer verstärkten Bildung von Ketonkörpern (1.1.1). In Einklang mit den Literaturdaten wurde in der vorliegenden Studie postpartum eine Erhöhung der Plasma BHBA Konzentration beobachtet, die in den Wochen 1 und 4 pp. am stärksten ausgeprägt und im späteren Verlauf der Laktation DNA wieder rückläufig war (Abbildung 3.9). Das Ausgangsniveau von Woche 2 ap wird bis Woche 7 pp. jedoch nicht mehr erreicht. Zudem waren die Expressionen der für die Ketogenese relevanten Genen *ACAT1* und *HMGCS2* pp. signifikant erhöht. Während die mRNA-Konzentration von *ACAT* in Woche 1 pp. am stärksten ausgeprägt war, war bei der *HMGCS2* Konzentration ein Anstieg von Woche 2 ap. bis Woche 7 pp. zu beobachten (Tabelle 3.46).

20% der untersuchten Tiere entwickelten im Versuchszeitraum pp. eine subklinische Ketose mit BHBA Konzentrationen von 1,2 - 3,0 mM/L Plasma, während bei 2% eine klinische Ketose festgestellt wurde (BHBA > 3,0 mmol/L Plasma). Verglichen mit Literaturdaten nach denen bei 40% der hochleistenden Milchkühe während der Früh lactation eine subklinische und bei 20% eine klinische Ketose auftritt (McArt et al. 2012; Gillund et al. 2001), ist die Ketoserate in der vorliegenden Studie relativ gering, was an dem guten Herdenmanagement liegen könnte (s. Abschnitt 4.9). Mehrkalbskühe wiesen zudem in Woche 1 und 4 pp. signifikant höhere Plasma BHBA Konzentrationen auf als erstlaktierende Tiere. Diese Beobachtung steht in Einklang mit verschiedenen Studien, in denen postpartum ebenfalls signifikant höhere BHBA Konzentrationen bei Kühen als bei Färsen beobachtet wurden (Duffield et al. 1997; Santos et al. 2001; Wathes et al. 2007). Die unterschiedlichen Stoffwechselforgänge bei Mehrkalbskühen und Färsen werden im Abschnitt 4.8 ausführlicher diskutiert.

#### NEB, NEFA und Ketose

In der vorliegenden Studie war eine erhöhte Konzentration an BHBA im Plasma in Woche 1 pp. mit einer stärkeren Ausprägung der NEB sowie einer erhöhten Konzentration an freien Fettsäuren im Plasma assoziiert, während die hepatische mRNA-Konzentration von *ACAT1* positiv mit dem NEFA Gehalt im Plasma korrelierte (Tabelle 3.54). Des Weiteren hatten Tiere mit einer (sub-) klinischen Ketose im Gegensatz zu Tieren mit einem normalem BHBA-Level signifikant höhere NEFA Konzentrationen im Plasma. Auch die NEB war bei diesen Tieren deutlich stärker ausgeprägt (Tabelle 3.53). In Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen werden Korrelationen zwischen NEFA und BHBA bei früh lactierenden Milchkühen auch in der Literatur beschrieben (Wathes et al. 2007; Seifi et al. 2007). Die freien Fettsäuren, die in der Früh lactation vermehrt in die Leber einströmen, werden zu Acetyl-CoA abgebaut, welches auf Grund der begrenzten Verfügbarkeit von Oxalacetat nicht vollständig über den Zitronensäurezyklus verstoffwechselt werden kann (s. 1.1.1). Acetyl-CoA wird somit verstärkt zu Ketonkörpern wie z. B. Acetoacetat,  $\beta$ -Hydroxybutansäure (BHBA) und Aceton abgebaut (van Knegsel et al. 2005; White 2015). NEFA führen in der Leber zu einer Aktivierung des PPAR $\alpha$  (Lor et al. 2005), der wiederum die Expression von Genen der Ketogenese induzieren kann (Contreras et al. 2013).

Auch eine Beziehung zwischen BHBA, NEFA und der negativen Energiebilanz ist hinreichend belegt (Ospina et al. 2010). Allerdings gibt es auch Studien, die nur einen schwachen Zusammenhang zwischen NEFA und BHBA beschreiben (McCarthy et al. 2015), was auf eine Beteiligung weiterer Faktoren an der Entstehung der Ketose hindeuten kann.

### ER-Stress und Ketogenese

Tiere mit (sub-) klinischer Ketose wiesen in der vorliegenden Studie im Vergleich zu Tieren mit BHBA-Konzentrationen im Normbereich in Woche 1 pp. signifikant höhere hepatische Expressionen an *HSPA5*, dem Master-Regulator der UPR, sowie der Downstream-Gene *HERPUD1* und *XBP1s* auf (Tabelle 3.49). Auf der anderen Seite waren bei Tieren mit einem hohen Level an ER-Stress im Gegensatz zu Tieren mit einem niedrigeren Level an ER-Stress eine numerisch, jedoch nicht signifikant erhöhte BHBA-Konzentrationen im Plasma feststellbar ( $1,0 \pm 0,1$  mmol/L vs.  $0,7 \pm 0,1$  mmol/L,  $p = 0,263$ ) (Tabelle 3.48). Auf Grund dieser Ergebnisse ist ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von ER-Stress und Ketogenese denkbar. Allerdings gibt es nur einzelne positive als auch inverse Korrelationen zwischen Parametern der Ketogenese und der mRNA-Konzentration von Genen der UPR (Tabelle 3.47), sodass hier keine klare Verbindung erkennbar ist. Da sowohl ER-Stress und Lipidstoffwechsel als auch Ketogenese und Lipidstoffwechsel im Zusammenhang stehen (s. o.), ist es denkbar, dass die beobachteten vereinzelt Zusammenhänge zwischen ER-Stress und Ketogenese über den gemeinsamen Bezug zum Lipidstoffwechsel erklärbar sind. Auch wäre eine über FGF21 vermittelte Induktion der Ketogenese in Folge der UPR denkbar (s. FGF21 und Ketogenese).

### FGF21 und Ketogenese

Ein Zusammenhang zwischen FGF21 und der Ketogenese ist bei Nagetieren bereits gut untersucht (Badman et al. 2007; Potthoff et al. 2009). So zeigten beispielsweise transgene Mäuse eine gesteigerte Ketogenese in Folge einer FGF21 Überexpression (Inagaki et al. 2007). Chen et al. (2019) stellten fest, dass die Konzentration von FGF21 im Plasma bei Kühen mit subklinischer Ketose (BHBA 1,2-1,6 mmol/L) positiv mit der BHBA Konzentration korreliert ist, während bei Tieren mit BHBA Konzentrationen  $< 1,2$  mmol/L keine Korrelationen zu beobachten waren. Des Weiteren beobachtete die Arbeitsgruppe eine tendenzielle Reduktion der FGF21-Konzentration bei BHBA Konzentrationen von  $> 1,6$  mmol/L. Als Ursache dafür postulierten sie mögliche Leberverletzungen, die bei diesen Tieren durch Inflammation hervorgerufen worden sein könnten (Chen et al. 2018). In einem Experiment mit Kühen, bei denen durch Futterrestriktion eine Ketose ausgelöst wurde, stellten Akbar et al. an Tag 5 pp. eine gesteigerte FGF21 Expression in der Leber gegenüber einer Kontrollgruppe fest, während sich die FGF21 Konzentration im Serum nicht signifikant unterschied (Akbar et al. 2015). Schlegel et al. (2012a) beschreiben zudem eine positive Korrelation zwischen der Genexpression von FGF21 und *HMGCS2*, welches das Schlüsselenzym der Ketogenese codiert. Da sowohl *FGF21* als auch *HMGCS2* Zielgene von PPAR $\alpha$  darstellen, wäre eine

simultane Induktion in Folge einer PPAR $\alpha$  Aktivierung durch NEFA in der Frühlaktation durchaus plausibel, ebenso ist eine direkte Induktion der Ketogenese über FGF21 (Fisher und Maratos-Flier 2016) denkbar.

In der vorliegenden Studie war die hepatische FGF21 mRNA-Konzentration in Woche 1 pp. bei Tieren mit einer (sub-)klinischen Ketose im Vergleich zu Tieren mit normalen BHBA-Gehalten numerisch, jedoch noch signifikant erhöht (Tabelle 3.50). Des Weiteren konnten keine Korrelationen zwischen der hepatischen FGF21 mRNA-Konzentration oder der FGF21-Konzentration im Plasma mit Parametern der Ketogenese beobachtet werden. Trotz der fehlenden Korrelationen kann ein Zusammenhang zwischen FGF21 und der Entstehung der Ketogenese bei frühlaktierenden Milchkühen nicht ausgeschlossen werden. Die fehlenden Korrelationen weisen jedoch darauf hin, dass neben FGF21 weitere Faktoren eine Rolle bei der Induktion der Ketogenese in der Frühlaktation spielen.

#### Nrf2-Aktivierung und Ketogenese

In der vorliegenden Studie waren in Woche 1 pp. einige positive Korrelationen zwischen Nrf2-Zielgenen und den mRNA-Konzentrationen von Genen der Ketogenese sowie eine Korrelation der BHBA Konzentration mit *SOD1* zu beobachten (Tabelle 3.52). Zudem wiesen Tiere mit einer (sub-) klinischen Ketose in Woche 1 pp. signifikant höhere mRNA-Expressionen der NRF2-Zielgene *NQO1* und *SOD1* auf (Tabelle 3.51). Dies lässt darauf schließen, dass eine Aktivierung von Nrf2 in der Frühlaktation mit der Entstehung von Ketogenese assoziiert ist. Nrf2 wird in der Frühlaktation in Folge von ER-Stress, oxidativem Stress oder aber auch Inflammation aktiviert (s. 4.4). Die positiven Korrelationen zwischen Parametern der Ketogenese und Nrf2-Zielgenen könnten demnach mit einem höheren Stresslevel erklärbar sein, der im Zusammenhang mit einer erhöhten BHBA Konzentration im Plasma auftritt. Die Aktivierung der NRF2-Zielgene kann als adaptive Anpassung an den auftretenden Stress verstanden werden und trägt zur Aufrechterhaltung der Leberfunktion bei.

#### LPS, Inflammation und Ketogenese

Ein Zusammenhang zwischen Inflammation und dem Auftreten von Ketose bei Milchkühen in der Frühlaktation wird in der Literatur diskutiert. So wurden in einer Studie bei Tieren mit klinisch diagnostizierter Ketose im Vergleich zu gesunden Tieren signifikant erhöhte HP, SAA, und LBP Konzentrationen im Plasma pp. festgestellt, während diese Tiere bereits vor der Abkalbung eine erhöhte LPS - Konzentration aufwiesen (Abuajamieh et al. 2016). Auch wird eine Erhöhung von IL6, TNF und IL-1 $\beta$  im Blut bei von Ketose betroffenen Tieren beschrieben (Zhang et al. 2018). Im Einklang mit diesen Ergebnissen wurden in der vorliegenden Studie bei

Tieren mit (sub-) klinischer Ketose tendenziell signifikant erhöhte hepatische mRNA-Expressionen von *CP*, *CRP* und *IL8* beobachtet, während die mRNA-Konzentration des negative APP codierenden Gens *TTR* signifikant reduziert war (Tabelle 3.56). Des Weiteren korrelierte die mRNA-Konzentration des bei der Ketose relevanten Gens *HMGCL* positiv mit den Expressionen von *CP*, *HP*, *TNF* und *IL1 $\beta$* , sowie invers mit der RBP4 Konzentration im Plasma (Tabelle 3.55). Allerdings waren keine Korrelationen zwischen der BHBA-Konzentration im Plasma und APP codierenden oder proinflammatorischen Genen zu beobachten, was daran liegen könnte, dass nur ein geringer Teil (14%) der untersuchten Tiere in Woche 1 pp. von (sub-)klinischer Ketose betroffen war und erhöhte BHBA-Werte aufwies. Die vorliegenden Ergebnisse könnten trotzdem auf einen Zusammenhang zwischen Inflammation und der Entstehung von Ketose in der Frühlaktation hinweisen, allerdings kann Inflammation nicht als Hauptfaktor für die Entstehung von Ketogenese bei frühlaktierenden Milchkühen identifiziert werden.

#### Oxidativer Stress und Ketogenese

In der Literatur gibt es Hinweise darauf, dass oxidativer Stress in der Frühlaktation mit der Entstehung der Ketose assoziiert sein könnte. Es wurde beobachtet, dass Tiere mit BHBA Konzentrationen von  $< 1,2$  mmol/L signifikant geringere Konzentrationen an Vitamin C und E im Plasma aufwiesen, als Tiere mit BHBA Konzentrationen von  $< 0,6$  mmol/L (Li et al. 2016). Des Weiteren wurden Korrelationen zwischen der BHBA-Konzentration im Plasma und den Konzentrationen an Vitamin E und C beschrieben (Li et al. 2016). Darüber hinaus zeigten Bernabucci et al., dass die Konzentration von NEFA und BHBA im Plasma von Kühen positiv mit der Konzentration an ROS korrelieren (Bernabucci et al. 2005). In der vorliegenden Studie konnten jedoch nur einzelne inverse Korrelationen zwischen Vitaminkonzentrationen und der hepatischen mRNA-Konzentration von dem an der Ketose beteiligten Gen *HMGCL* festgestellt werden, während die Konzentration an TBARS invers mit der Expression von *ACAT* sowie der BHBA Konzentration korrelierte. Anhand dieser Ergebnisse kann kein direkter Zusammenhang zwischen oxidativem Stress in der Frühlaktation und der Ketogenese festgestellt werden.

#### Beziehung zwischen Fettleber und Ketose

In der vorliegenden Studie entwickelten 71% der Tiere mit einer moderaten Fettleber zusätzlich eine (sub-)klinische Ketose. Zudem waren bei Tieren mit einer moderaten Fettleber im Gegensatz zu Tieren mit hepatischen TG Konzentrationen von  $< 50$  mg/g signifikant höhere BHBA-Konzentrationen im Plasma, sowie eine gesteigerte Expression an *ACAT* in Woche 1 pp. feststellbar (Tabelle 3.59). Des Weiteren korrelierte die BHBA Konzentration im Plasma

in Woche 1 pp. sowohl mit der TG als auch der Cholesterolkonzentration in der Leber (s. 3.3.3). Insgesamt weisen diese Beobachtungen auf einen Zusammenhang zwischen der Entstehung von Fettleber und Ketose hin. Auch in der Literatur wird eine Beziehung zwischen Fettleber und Ketose diskutiert, so wird Ketose u. a. als eine Folge der Fettleber betrachtet (Grummer 1993; Drackley 1999). Dies weist darauf hin, dass es auch bei den Ursachen der beiden Stoffwechselerkrankungen Gemeinsamkeiten gibt. So stehen beiden Erkrankungen beispielsweise im Zusammenhang mit einer stark ausgeprägten negativen Energiebilanz sowie einer erhöhte Konzentration an freien Fettsäuren im Plasma.

### Fazit

Ketose tritt bei frühlaktierenden Kühen meist im Zusammenhang mit der hepatischen Lipidose auf. Beiden Stoffwechselerkrankungen liegt eine stark ausgeprägte negative Energiebilanz sowie eine erhöhte Konzentration an freien Fettsäuren im Plasma zugrunde. Des Weiteren wurden in der vorliegenden Studie Verbindungen zwischen dem Auftreten von Ketose und ER-Stress oder Inflammation festgestellt. Außerdem konnte ein deutlicher Zusammenhang der Aktivierung des Nrf2-Wegs und der Ketogenese beobachtet werden. Während der Früh lactation auftretender Stress in Form von ER-Stress oder Inflammation könnte somit eine Rolle bei der Entstehung der Ketose in der Früh lactation spielen. Die Aktivierung des Nrf2-Weges ist eine adaptive Anpassung an diesen Stress mit dem Ziel die Leber vor schädigenden Einflüssen zu schützen.

## **4.7 Einfluss auf die Milchleistung**

Eine verringerte Milchleistung stellt bei der Haltung hochleistender Milchkühe ein wirtschaftliches Problem dar. Daher ist es von großer Bedeutung Faktoren, die einen negativen Einfluss auf die Leistung haben, zu identifizieren und nach Möglichkeit zu minimieren. Aus diesem Grund wurden die in der vorliegenden Arbeit betrachteten Parameter auf einen möglichen Einfluss auf die Milchleistung hin untersucht. Die 100 Tage-Milchleistung der in dieser Studie eingeschlossenen Tiere betrug 3140 kg/100 Tage (Färsen, n=19), bzw. 4227 kg/100 Tage (Tiere mit Parität  $\geq 2$ ; n=31) und ist mit anderen in der Literatur beschriebenen Kuhherden vergleichbar (Trevisi et al. 2012; Gessner et al. 2014). Dabei zeigten Färsen im gesamten betrachteten Zeitraum (Woche 1-16 pp.) eine signifikant niedrigere Milchleistung als höherlaktierende Tiere (Diskussion s. Abschnitt 4.8).

### ER-Stress, Nrf2-Aktivierung, FGF21 und Milchleistung

In der vorliegenden Studie konnten keine Zusammenhänge zwischen der Milchleistung und dem Auftreten von ER-Stress, der Expression des Stresshormons FGF21 oder einer Aktivierung des Nrf2-Weges in Woche 1 pp. beobachtet werden. Daher scheinen diese Parameter keinen direkten Einfluss auf die Milchleistung zu haben. Auch konnten keine Hinweise auf eine Verknüpfung dieser Parameter mit der Milchleistung in der Literatur gefunden werden.

### Inflammation und Milchleistung

Die inverse Korrelationen der 100 Tage Milchleistung und der durchschnittlichen täglichen Milchleistung (Tag 7-13 pp.) mit der Expression des akute-Phase-Proteins *HP* sowie die positive Korrelation zu dem negativ APP codierenden Gen *RBP4* und der Albuminkonzentration in Woche 1 pp. in der vorliegenden Studie (Tabelle 3.63) könnten auf eine inverse Beziehung zwischen Milchleistung und Inflammation hindeuten. Eine reduzierte Milchleistung bei Tieren mit stärker ausgeprägter Inflammation wurde auch in der Literatur beschrieben (Bertoni et al. 2008; Huzzey et al. 2015; Zebeli und Ametaj 2009). So konnten Huzzey et al. beispielsweise eine Assoziation zwischen einer gesteigerten HP Konzentration im Plasma und der Reduktion der Milchleistung beobachten (Huzzey et al. 2015), während Zebeli et al (2009) bei erhöhten CRP Konzentrationen im Plasma eine Verminderung der Milchleistung beschreiben.

### Oxidativer Stress und Milchleistung

Die Konzentrationen der Vitamine  $\alpha$ -Tocopherol,  $\gamma$ -Tocopherol,  $\beta$ -Carotin und Retinol im Plasma in Woche 1 pp. sind positiv mit der Milchleistung korreliert (Tabelle 3.64). Ein besserer antioxidativer Status geht demnach mit einer gesteigerten Milchleistung einher. Antioxidantien wie z. B. die oben beschriebenen Vitamine tragen zu einer Reduktion radikaler Sauerstoffspezies bei. ROS sind geeignet Inflammation zu verstärken oder Schädigungen an DNA, Proteinen und Lipiden hervorzurufen, was sich negativ auf die Milchleistung auswirken könnte. Sordillo und Aitken postulierten im Einklang mit diesen Beobachtungen, dass die Milchleistung durch eine optimale Versorgung der Tiere mit antioxidativen Mikronährstoffen bis zu einem bestimmten Grad optimiert werden kann (Sordillo und Aitken 2009).

### Calcium-, Vitamin D Stoffwechsel und Milchleistung

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass erhöhte Konzentrationen an Calcium und verminderte Konzentrationen an Phosphat im Plasma mit einer gesteigerten durchschnittlichen

täglichen Milchleistung (Tag 7-13 pp.) sowie einer höheren 100 Tage Laktation verknüpft sind (Tabelle 3.65). Ähnliche Beobachtungen machten Chapinal et al. (2012), die Zusammenhänge zwischen niedrigen Calciumkonzentrationen prä- sowie postpartum und einer Reduktion der Milchleistung feststellten. Zudem führte die Verabreichung eines Calciumbolus nach der Abkalbung bei Kühen, die bereits in der vorhergehenden Laktation eine hohe Milchleistung aufwiesen, im Gegensatz zu Tieren mit einer hohen vorhergehenden Milchleistung ohne Ca-Behandlung in der aktuellen Laktation zu einer um 2,9 kg höheren Milchleistung im 1. Milchtest (Oetzel und Miller 2012). Eine Phosphorzufuhr oberhalb des Phosphorbedarfs hingegen, führte im Vergleich zu einer bedarfsgerechten Phosphorzufuhr zu einer Reduktion der Milchleistung um 1,5 kg/Tag im Zeitraum von 5 - 12 Wochen pp. (Carstairs et al. 1981). Eine Supplementation von Calcium nach der Abkalbung kann die Milchleistung demnach positiv beeinflussen, während eine Phosphat-Überdosierung sich negativ auf die Milchleistung auswirken könnte.

#### Energiebilanz, freie Fettsäuren und Milchleistung

Die Daten der vorliegenden Studie zeigen, dass eine höhere Milchleistung mit einer stärker ausgeprägten negativen Energiebilanz sowie einer höheren Konzentration an freien Fettsäuren in Woche 1 pp. assoziiert ist (Tabelle 3.62). Tiere mit einer höheren Milchleistung haben einen höheren Energiebedarf, was die inverse Korrelation von Milchleistung und Energiebilanz erklärt. Zur Kompensation des erhöhten Energiebedarfs müssen diese Tiere vermehrt Fett aus dem Fettgewebe freisetzen, was eine Erhöhung der Konzentration an freien Fettsäuren im Blut zur Folge hat. Im Einklang mit diesen Ergebnissen beobachteten Chapinal et al. (2012) einen Zusammenhang zwischen niedrigen NEFA-Konzentrationen in Woche 1, 2 und 3 pp. mit einem Milchverlust während der ersten vier DHIA- (Diary Herd Improvement Asociacion) Tests, wohingegen sie bei höherlaktierenden Kühen mit erhöhten NEFA Konzentrationen im 1. DHIA-Test eine reduzierte Milchleistung feststellten. Ähnliche Beobachtungen machten Ospina et al. (2010) in einer Studie in der Färsen mit hohen Konzentrationen an NEFA in den ersten 2 Wochen pp. eine höhere 305 Tage Laktation aufwiesen, während bei höherlaktierenden Tieren eine gegenteilige Beziehung beobachtet wurde.

Die kontroversen Ergebnisse weisen darauf hin, dass eine stärker ausgeprägte negative Energiebilanz und erhöhte NEFA Konzentrationen im Plasma einerseits als natürliche Folge einer erhöhten Milchproduktion angesehen werden können, andererseits scheint eine über ein bestimmtes Level erhöhte Konzentration an NEFA unter bestimmten Bedingungen aber auch geeignet zu sein die Milchleistung (kurzzeitig) zu reduzieren.

### Fettstoffwechsel, Ketogenese und Milchleistung

Tiere mit einer moderat ausgeprägten Fettleber zeigten in dieser Studie gegenüber Tieren mit hepatischen TG Konzentrationen im Normbereich eine tendenziell erhöhte durchschnittliche tägliche Milchleistung (Tag 7-13 pp.), während die 100 Tage Laktation signifikant erhöht war (Tabelle 3.66). Des Weiteren war eine positive Korrelation der 100 Tage Laktation mit der hepatischen TG Konzentration in Woche 1 pp. zu beobachten (s.3.4.6). Wie bereits im Abschnitt „Energiebilanz, freie Fettsäuren und Milchleistung“ diskutiert, haben Tiere mit höherer Milchleistung einen größeren Energiebedarf. Sie mobilisieren dem zu Folge mehr Fett aus dem Fettgewebe, was sich in erhöhten NEFA Konzentrationen im Plasma bemerkbar macht. Die Konzentration an NEFA ist direkt mit der hepatischen TG Konzentration korreliert, was die beobachtete positive Assoziation zwischen Milchleistung und hepatischer TG Konzentration erklärt. Ein ähnlicher Zusammenhang war in der vorliegenden Studie zwischen der Milchleistung und der BHBA Konzentration zu beobachten. Die BHBA Konzentration im Plasma war positiv mit der täglichen Milchleistung in Woche 1 pp., sowie der 100 Tage Laktation korreliert. Tiere mit (sub-) klinischer Ketose wiesen zudem eine tendenziell höhere Milchleistung als Tiere mit BHBA Konzentrationen im Normbereich (Tabelle 3.67). Auch diese Beobachtungen sind mit der stärker ausgeprägten Energiebilanz, die mit einer höheren Milchleistung einhergeht, zu erklären.

In der Literatur ist der Zusammenhang zwischen einer erhöhten BHBA Konzentration mit der Milchleistung bei Kühen nicht eindeutig geklärt. Duffield et al. (2009) zeigten, dass Tiere mit einem BHBA Gehalt über  $\geq 1,2$  mmol/L in der 1. Woche pp. eine geringere 305 Tage Laktation hatten, während Tiere in der 2. Woche pp. mit steigenden BHBA Konzentrationen gleichzeitig eine höhere Milchleistung aufwiesen. Die höchste Steigerung der Milchleistung war bei 1,0 mmol/L BHBA zu beobachten, höhere Konzentrationen waren mit einer geringeren Steigerung der Leistung verbunden, wobei die Steigerung der Gesamtmenge der 305 Tage Laktation bis 2,0 mmol/L BHBA noch oberhalb von 100 kg lag. Des Weiteren wird in einer Studie im Zusammenhang mit erhöhten BHBA Konzentrationen eine Steigerung der Milchleistung bei Färsen beschrieben, während bei höherlaktierenden Kühen ein gegenteiliger Effekt beobachtet wurde (Ospina et al. 2010).

Zusammenfassend führt eine gesteigerte Milchleistung zu einer stärker ausgeprägten NEB, die mit erhöhten NEFA Konzentrationen im Plasma, sowie erhöhten TG Konzentrationen in der Leber sowie höheren BHBA Konzentrationen im Plasma einhergeht. Es ist zudem möglich, dass TG- und BHBA-Konzentrationen oberhalb eines bestimmten Schwellenwertes, evtl. auch durch entstehende Folgekrankheiten, die Milchleistung negativ beeinflussen. In der

vorliegenden Studie konnte ein negativer Einfluss auf die Milchleistung auf Grund des allgemein guten Gesundheitsstatus der Tiere jedoch nicht beobachtet werden.

### Fazit

Aus wirtschaftlichen Gründen ist es sinnvoll, die Milchleistung hochleistender Tiere zu steigern. Dabei ist es wichtig Faktoren, die sich negativ auf die Milchleistung auswirken können wie z. B. Inflammation und oxidativer Stress oder Calciummangel, zu minimieren. Eine bedeutende Maßnahme kann dabei eine Fütterung mit ausreichend antioxidativen Mikronährstoffen sowie Calcium sein. Bei der Optimierung der Milchleistung ist zudem eine Anpassung des Organismus an die Anforderungen einer erhöhten Milchleistung zu berücksichtigen. Schlägt die Anpassung fehl, kann es in Folge der mit der erhöhten Milchleistung einhergehenden NEB zu einer Anreicherung der hepatischen TG Konzentration sowie einer gesteigerten Ketogenese kommen, woraus sich Stoffwechselerkrankungen wie Fettleber und Ketose entwickeln können.

## **4.8 Einfluss der Parität**

Färsen und Mehrkalbskühe unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Anpassungsfähigkeit an die Laktation. So zeigten Mehrkalbskühe in der vorliegenden Studie in Woche 1 pp und 4 pp gegenüber erstlaktierenden Tieren signifikant höhere Konzentrationen an Triglyceriden in der Leber. Die BHBA-Konzentration im Plasma dieser Tiere war zudem in Woche 2 ap. sowie 1 und 4 pp. erhöht. Mehrkalbskühe zeichnen sich durch eine höhere Energieaufnahme während des gesamten Versuchszeitraums aus. Antepartum schlägt sich dies in einer positiveren Energiebilanz nieder. In den ersten Wochen nach der Abkalbung ist die negative Energiebilanz von Tieren in einer höheren Laktation hingegen deutlich stärker ausgeprägt, was mit einem höheren Energieverbrauch in Folge einer höheren Milchleistung zu erklären ist. Eine stärkere negative Energiebilanz ist mit einer erhöhten Mobilisation an Fettsäuren aus dem Fettgewebe verbunden. Somit ist der Anstieg der NEFA-Konzentration im Plasma pp. bei diesen Tieren größer als bei Färsen, auch wenn die Plasmakonzentrationen sich nur numerisch und nicht signifikant unterschieden. Ähnliche Beobachtungen machten Wathes et al. (2007), die Unterschiede in der NEFA, BHBA, Leptin, IGF-I und Insulinkonzentration, sowie der Milchleistung bei Färsen und Kühen beschreiben. Bei den Genexpressionsleveln sowie den gemessenen Plasmametern des oxidativen Stresses und der Inflammation konnten in der vorliegenden Studie nur vereinzelt Unterschiede zwischen Färsen und Kühen beobachtet

werden. Für die Unterschiede in der Milchleistung sowie der daraus resultierenden Energiebilanz mit ihren Folgen scheinen daher weitere Faktoren verantwortlich zu sein, die im Rahmen dieser Studie nicht untersucht wurden. Ein solcher Faktor könnte beispielsweise der unterschiedliche hormonelle Status von Färsen und Kühen sein (Wathes et al. 2007).

#### 4.9 Gesundheitszustand der Herde

Der Gesundheitsstatus der Tiere in der vorliegenden Studie ist als überdurchschnittlich gut zu bewerten. 20% der untersuchten Tiere entwickelten im Versuchszeitraum pp. eine subklinische Ketose, während bei 2% eine klinische Ketose festgestellt wurde. Verglichen mit Literaturdaten nach denen bei 40% der hochleistenden Milchkühe während der Früh lactation eine subklinische und bei 20% eine klinische Ketose auftritt (McArt et al. 2012; Gillund et al. 2001), ist die Ketoserate in der vorliegenden Studie relativ gering. Auch die Entwicklung einer Fettleber war in der vorliegenden Studie deutlich seltener zu beobachten als in der Literatur beschrieben. 72% der untersuchten Tiere dieser Studie wiesen in postpartum eine milde Fettleber mit hepatischen TG Konzentrationen im Bereich von 10-50 mg/g auf, während 14% eine moderate Fettleber mit 5 - 100 mg/g TG entwickelten. In der Literatur sind vom Auftreten einer moderaten Fettleber 30 - 40% der Tiere betroffen, während etwa 5-10% der Milchkühe sogar eine starke Fettleber entwickeln (Bobe et al. 2004). Als Ursache kann das gute Herdenmanagement während des Tierversuches an der Lehr- und Versuchsstation Neumühle angesehen werden. Zudem wurden die Literaturdaten bereits vor einigen Jahren erhoben. Änderungen in der Tierhaltung könnten mittlerweile zu einer Reduktion der Stoffwechselerkrankungen beigetragen haben. Die Milchkühe der vorliegenden Studie standen unter regelmäßiger tierärztlicher Kontrolle. Zudem bekamen sie pp. einen Energietrunk (AC-Quick Fit, Schils, Niederlande) *ad libitum* angeboten (s. Tabelle 2.5), die in diesem Trunk enthaltenen Vitamine könnten u. a. zu einer Reduktion des oxidativen Stresses der Tiere beigetragen haben. Zusätzlich wurden die Tiere in den ersten 10 Tagen postpartum einmal täglich mit 250 mL Propylenglykol peroral behandelt. Propylenglykol kann bei früh lactierenden Kühen zu einer Reduktion der NEFA und BHBA Konzentration im Plasma beitragen und den hepatischen TG-Gehalt reduzieren (Nielsen und Ingvarsen 2004; Rukkwamsuk et al. 2005). Erklärbar ist der Effekt von Propylenglykol über ein niedrigeres Acetat-zu-Propionat-Verhältnis, das über eine gesteigerte Insulinantwort die Lipolyse von Fetten aus dem Fettgewebe reduziert (Rukkwamsuk et al. 2005; Nielsen und Ingvarsen 2004). Außerdem wird im Rahmen der Verstoffwechslung von Propylenglykol Oxalacetat gebildet,

was die Kapazität des TCA zur vollständigen Oxidation von Acetyl-CoA erhöht und somit zu einer Verringerung der Ketogenese führt (Rukkwamsuk et al. 2005).

Die in der vorliegenden Studie erhobenen Daten spiegeln ein gutes Herdenmanagement wider, das bei der Haltung hochleistender Milchkühe mittlerweile weit verbreitet ist. Trotz dieser Maßnahmen ist es bisher nicht möglich, die während der Früh-laktation auftretenden Stoffwechselerkrankungen zu verhindern.

#### **4.10 Schlussfolgerung und Ausblick**

Fettleber und Ketose, zwei bedeutende Stoffwechselerkrankungen bei hochleistenden Milchkühen, traten in der vorliegenden Studie überwiegend gemeinsam auf. Beiden Erkrankungen lagen eine stark ausgeprägte negative Energiebilanz sowie eine erhöhte Konzentration an freien Fettsäuren im Plasma zugrunde. Die hepatische TG-Konzentration stand mit dem Auftreten von ER-Stress im Zusammenhang. ER-Stress könnte zum Entstehen einer Fettleber in der Früh-laktation beitragen. Um die Rolle des ER-Stresses im Zusammenhang mit dem Auftreten von Fettleber und Ketose vollständig zu klären, bedarf es jedoch weiterer Forschung. Das Auftreten von ER-Stress in der Früh-laktation steht im Zusammenhang mit einem hepatischen Entzündungsprozess sowie der Induktion von FGF21. Eine gesteigerte hepatische FGF21-Expression ist wiederum mit Inflammation und oxidativem Stress verbunden. Bei der Haltung hochleistender Milchkühe ist es daher ratsam, nach der Kalbung auftretende Stressfaktoren soweit wie möglich zu reduzieren. Dazu ist eine ausreichende Versorgung der Tiere mit Nährstoffen zur Vorbeugung einer starken Ausprägung der negativen Energiebilanz sowie eine Reduktion von oxidativem Stress, Inflammation und dem in Folge dessen auftretenden ER-Stress anzustreben. Eine Fütterung mit anti-oxidativen Substanzen könnte ggf. dazu beitragen. Eine Reduktion von oxidativem Stress und Inflammation sowie eine ausreichende Versorgung mit Calcium können zudem zu einer höheren Milchleistung beitragen.

## 5 Literatur

- Abujamieh, Mohannad; Kvidera, Sara K.; Fernandez, Maria V. Sanz; Nayeri, Amir; Upah, Nathan C.; Nolan, Erin A. et al. (2016): Inflammatory biomarkers are associated with ketosis in periparturient Holstein cows. *Research in veterinary science* 109, S. 81–85.
- Adewuyi, A. A.; Gruys, E.; van Eerdenburg, F. J. C. M. (2005): Non esterified fatty acids (NEFA) in dairy cattle. A review. *The Veterinary quarterly* 27 (3), S. 117–126.
- Akbar, Haji; Batistel, Fernanda; Drackley, James K.; Looor, Juan J. (2015): Alterations in Hepatic FGF21, Co-Regulated Genes, and Upstream Metabolic Genes in Response to Nutrition, Ketosis and Inflammation in Peripartal Holstein Cows. *PloS one* 10 (10), e0139963.
- Ameer, Fatima; Scandiuzzi, Lisa; Hasnain, Shahida; Kalbacher, Hubert; Zaidi, Nousheen (2014): De novo lipogenesis in health and disease. *Metabolism: clinical and experimental* 63 (7), S. 895–902.
- Ametaj, B. N.; Bradford, B. J.; Bobe, G.; Nafikov, R. A.; Lu, Y.; Young, J. W.; Beitz, D. C. (2005): Strong relationships between mediators of the acute phase response and fatty liver in dairy cows. *Can. J. Anim. Sci.* 85 (2), S. 165–175.
- Ametaj, B. N.; Goff, J. P.; Horst, R. L.; Bradford, B. J.; Beitz, D. C. (2003): Presence of Acute Phase Response in Normal and Milk Fever Dairy Cows Around Parturition. *Acta Veterinaria Scandinavica* 44 (1), P66.
- Andrews, Glen K. (2000): Regulation of Metallothionein Gene Expression by Oxidative Stress and Metal Ions. *Biochemical Pharmacology* 59, S. 95–104.
- Arthur, J. R. (2000): The glutathione peroxidases. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* 57, S. 1825–1835.
- Aspichueta, Patricia; Pérez-Agote, Begoña; Pérez, Silvia; Ochoa, Begoña; Fresnedo, Olatz (2006): Impaired response of VLDL lipid and apoB secretion to endotoxin in the fasted rat liver. *J. Endotoxin Res.* 12 (3), S. 181–192.
- Badman, Michael K.; Pissios, Pavlos; Kennedy, Adam R.; Koukos, George; Flier, Jeffrey S.; Maratos-Flier, Eleftheria (2007): Hepatic fibroblast growth factor 21 is regulated by PPAR alpha and is a key mediator of hepatic lipid metabolism in ketotic states. *Cell Metabolism* 5 (6), S. 426–437.
- Balz, Marion K.; Thier, E.; Schulteand H. -P. (1993): Simultaneous Determination of [alpha]-Tocopheryl Acetate, Tocopherols and Tocotrienols by HPLC with Fluorescence Detection in Foods. *Fat Sci. Technol* 95 (6), S. 215–220.
- Barletta, R. V.; Maturana Filho, M.; Carvalho, P. D.; Del Valle, T. A.; Netto, A. S.; Rennó, F. P. et al. (2017): Association of changes among body condition score during the transition period with NEFA and BHBA concentrations, milk production, fertility, and health of Holstein cows. *Theriogenology* 104, S. 30–36.
- Bartolomé, Nerea; Arteta, Beatriz; Martínez, María José; Chico, Yolanda; Ochoa, Begoña (2008): Kupffer cell products and interleukin 1beta directly promote VLDL secretion and apoB mRNA up-regulation in rodent hepatocytes. *Innate Immunity* 14 (4), S. 255–266.
- Bell, A. W. (1979): Lipid metabolism in liver and selected tissues and in the whole body of ruminant animals. *Progress in lipid research* 18 (3), S. 117–164.
- Bell, A. W. (1995): Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. *Journal of Animal Science* 73 (9), S. 2804–2819.

- Bernabucci, U.; Ronchi, B.; Basiricò, L.; Pirazzi, D.; Rueca, F.; Lacetera, N.; Nardone, A. (2004): Abundance of mRNA of Apolipoprotein B100, Apolipoprotein E, and Microsomal Triglyceride Transfer Protein in Liver from Periparturient Dairy Cows. *Journal of dairy science* 87 (9), S. 2881–2888.
- Bernabucci, U.; Ronchi, B.; Lacetera, N.; Nardone, A. (2005): Influence of Body Condition Score on Relationships Between Metabolic Status and Oxidative Stress in Periparturient Dairy Cows. *Journal of dairy science* 88 (6), S. 2017–2026.
- Bertolotti, A.; Zhang, Y.; Hendershot, L. M.; Harding, H. P.; Ron, D. (2000): Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nature cell biology* 2 (6), S. 326–332.
- Bertoni, G.; Trevisi, E.; Han, X.; Bionaz, M. (2008): Effects of inflammatory conditions on liver activity in puerperium period and consequences for performance in dairy cows. *Journal of dairy science* 91 (9), S. 3300–3310.
- Bilal, Muhammad Shahid; Abaker, Juma Ahamed; ul Aabdin, Zain; Xu, Tianle; Dai, Hongyu; Zhang, Kai et al. (2016): Lipopolysaccharide derived from the digestive tract triggers an inflammatory response in the uterus of mid-lactating dairy cows during SARA. *BMC veterinary research* 12 (284), S. 1–7.
- Bionaz, M.; Trevisi, E.; Calamari, L.; Librandi, F.; Ferrari, A.; Bertoni, G. (2007): Plasma paraoxonase, health, inflammatory conditions, and liver function in transition dairy cows. *R. Bras. Zootec.* 90 (4), S. 1740–1750.
- Block, S. S.; Butler, W. R.; Ehrhardt, R. A.; Bell, A. W.; van Amburgh, M. E.; Boisclair, Y. R. (2001): Decreased concentration of plasma leptin in periparturient dairy cows is caused by negative energy balance. *Journal of Endocrinology* 2001 (171), S. 339–348.
- Bobe, G.; Young, J. W.; Beitz, D. C. (2004): Invited Review: Pathology, Etiology, Prevention, and Treatment of Fatty Liver in Dairy Cows. *Journal of dairy science* 87 (10), S. 3105–3124.
- Bobrovnikova-Marjon, Ekaterina; Hatzivassiliou, Georgia; Grigoriadou, Christina; Romero, Margarita; Cavener, Douglas R.; Thompson, Craig B.; Diehl, J. Alan (2008): PERK-dependent regulation of lipogenesis during mouse mammary gland development and adipocyte differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (42), S. 16314–16319.
- Bommiasamy H.; Back S. H.; Fagone, P.; Lee K.; Meshinchi S.; Vink E. (2009): ATF6a induces XBP1-independent expansion of the endoplasmic reticulum. *Journal of Cell Science* (122), S. 1626–1636.
- Botsoglou, Nickos A.; Fletouris, Dimitrios J.; Papageorgiou, Georgios E.; Vassilopoulos, Vassilios N.; Mantis, Antonios J.; Trakatellis, Antonios G. (1994): Rapid, Sensitive, and Specific Thiobarbituric Acid Method for Measuring Lipid Peroxidation in Animal Tissue, Food, and Feedstuff Samples. *J. Agric. Food Chem* 42 (9), S. 1931–1937.
- Bradford, B. J.; Yuan, K.; Farney, J. K.; Mamedova, L. K.; Carpenter, A. J. (2015): Invited review: Inflammation during the transition to lactation: New adventures with an old flame. *R. Bras. Zootec.* 98 (10), S. 6631–6650.
- Bradford, Barry J.; Mamedova, Laman K.; Minton, J. Ernest; Drouillard, James S.; Johnson, Bradley J. (2009): Daily injection of tumor necrosis factor- $\alpha$  increases hepatic triglycerides and alters transcript abundance of metabolic genes in lactating dairy cattle. *The Journal of nutrition* 139 (8), S. 1451–1456.

- Breckenridge, David G.; Germain, Marc; Mathai, Jaigi P.; Nguyen, Mai; Shore, Gordon C. (2003): Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways. *Oncogene* 22 (53), S. 8608–8618.
- Bunton-Stasyshyn, Rosie K. A.; Saccon, Rachele A.; Fratta, Pietro; Fisher, Elizabeth M. C. (2015): SOD1 Function and Its Implications for Amyotrophic Lateral Sclerosis Pathology: New and Renascent Themes. *The Neuroscientist: a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* 21 (5), S. 519–529.
- Butler, W. R.; Smith, R. D. (1989): Interrelationships Between Energy Balance and Postpartum Reproductive Function in Dairy Cattle. *Journal of dairy science* 72 (3), S. 767–783.
- Caixeta, L. S.; Giesy, S. L.; Krumm, C. S.; Perfield, J. W.; Butterfield, A.; Boisclair, Y. R. (2019): Fibroblast growth factor-21 (FGF21) administration to early-lactating dairy cows. II. Pharmacokinetics, whole-animal performance, and lipid metabolism. *Journal of dairy science*.
- Caixeta, L. S.; Ospina, P. A.; Capel, M. B.; Nydam, D. V. (2017a): Association between subclinical hypocalcemia in the first 3 days of lactation and reproductive performance of dairy cows. *Theriogenology* 94, S. 1–7.
- Caixeta, Luciano S.; Giesy, Sarah L.; Krumm, Christopher S.; Perfield, James W.; Butterfield, Anthony; Schoenberg, Katie M. et al. (2017b): Effect of circulating glucagon and free fatty acids on hepatic FGF21 production in dairy cows. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 313 (5), R526-R534.
- Calderon, F.; Chauveau-Duriot, B.; Martin, B.; Graulet, B.; Doreau, M.; Noziere, P. (2007): Variations in carotenoids, vitamins A and E, and color in cow's plasma and milk during late pregnancy and the first three months of lactation. *R. Bras. Zootec.* 90 (5), S. 2335–2346.
- Calfon, M.; Zeng, H. Q.; Urano, F.; Till, J. H.; Hubbard, SR; Harding, H. P. et al. (2002): IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA (vol 415, pg 92, 2002). *Nature* 420 (6912), S. 202.
- Cao, Stewart Siyan; Kaufman, Randal J. (2014): Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress in cell fate decision and human disease. *Antioxidants & redox signaling* 21 (3), S. 396–413.
- Carriquiry, M.; Weber, W. J.; Fahrenkrug, S. C.; Crooker, B. A. (2009): Hepatic gene expression in multiparous Holstein cows treated with bovine somatotropin and fed n-3 fatty acids in early lactation. *Journal of dairy science* 92 (10), S. 4889–4900.
- Carroll, Jeffery A.; Reuter, Richard R.; Chase, Chadwick C., JR.; Coleman, Samuel W.; Riley, David G.; Spiers, Donald E. et al. (2009): Profile of the bovine acute-phase response following an intravenous bolus-dose lipopolysaccharide challenge. *Innate Immunity* 15 (2), S. 81–89.
- Carstairs, J. A.; Neitzel, R. R.; Emery, R. S. (1981): Energy and phosphorus status as factors affecting postpartum performance and health of dairy cows. *R. Bras. Zootec.* 64 (1), S. 34–41.
- Castillo, C.; Hernandez, J.; Bravo, A.; Lopez-Alonso, M.; Pereira, V.; Bedito, J. L. (2005): Oxidative status during late pregnancy and early lactation in dairy cows. *Veterinary journal (London, England: 1997)* 169 (2), S. 286–292.
- Chae, Min Kyung; Park, Sang Gyu; Song, Sun-Ok; Kang, Eun Seok; Cha, Bong Soo; Lee, Hyun Chul; Lee, Byung-Wan (2012): Pentoxifylline attenuates methionine- and choline-deficient-diet-induced steatohepatitis by suppressing TNF- $\alpha$  expression and endoplasmic reticulum stress. *Experimental diabetes research* 2012, ID: 762565 S.1-8.
- Chambel, Sílvia S.; Santos-Gonçalves, Andreia; Duarte, Tiago L. (2015): The Dual Role of Nrf2 in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Regulation of Antioxidant Defenses and Hepatic Lipid Metabolism. *BioMed research international* 2015, ID 597134, S. 1-10.

- Chapinal, N.; Carson, M. E.; LeBlanc, S. J.; Leslie, K. E.; Godden, S.; Capel, M. et al. (2012): The association of serum metabolites in the transition period with milk production and early-lactation reproductive performance. *Journal of dairy science* 95 (3), S. 1301–1309.
- Chen, S.; Wu, K.; Knox, R. (2000): Structure-function studies of DT-diaphorase (NQO1) and NRH: quinone oxidoreductase (NQO2). *Free Radical Biology and Medicine* 29 (3-4), S. 276–284.
- Chen, Yuanyuan; Dong, Zhihao; Li, Ruirui; Xu, Chuang (2018): Changes in selected biochemical parameters during subclinical and clinical ketosis in dairy cows. *Medycyna Weterynaryjna* 74 (11), 727-730.
- Cláudio, Nuno; Dalet, Alexandre; Gatti, Evelina; Pierre, Philippe (2013): Mapping the crossroads of immune activation and cellular stress response pathways. *The EMBO journal* 32 (9), S. 1214–1224.
- Cnop, Miriam; Foufelle, Fabienne; Velloso, Licio A. (2012): Endoplasmic reticulum stress, obesity and diabetes. *Trends in molecular medicine* 18 (1), S. 59–68.
- Contreras, Alejandra V.; Torres, Nimbe; Tovar, Armando R. (2013): PPAR- $\alpha$  as a key nutritional and environmental sensor for metabolic adaptation. *Advances in nutrition (Bethesda, Md.)* 4 (4), S. 439–452.
- Cullinan, Sara B.; Diehl, J. Alan (2004): PERK-dependent activation of Nrf2 contributes to redox homeostasis and cell survival following endoplasmic reticulum stress. *The Journal of biological chemistry* 279 (19), S. 20108–20117.
- Cullinan, Sara B.; Zhang, Donna; Hannink, Mark; Arvisais, Edward; Kaufman, Randal J.; Diehl, J. Alan (2003): Nrf2 is a direct PERK substrate and effector of PERK-dependent cell survival. *Molecular and cellular biology* 23 (20), S. 7198–7209.
- Daemen, Sabine; Kutmon, Martina; Evelo, Chris T. (2013): A pathway approach to investigate the function and regulation of SREBPs. *Genes & Nutrition* 8 (3), S. 289–300.
- DeGaris, Peter J.; Lean, Ian J. (2008): Milk fever in dairy cows: a review of pathophysiology and control principles. *Veterinary journal (London, England: 1997)* 176 (1), S. 58–69.
- Deng, Jing; Lu, Phoebe D.; Zhang, Yuhong; Scheuner, Donalyn; Kaufman, Randal J.; Sonenberg, Nahum et al. (2004): Translational repression mediates activation of nuclear factor kappa B by phosphorylated translation initiation factor 2. *Molecular and cellular biology* 24 (23), S. 10161–10168.
- Digaleh, Hadi; Kiaei, Mahmoud; Khodagholi, Fariba (2013): Nrf2 and Nrf1 signaling and ER stress crosstalk: implication for proteasomal degradation and autophagy. *Cellular and molecular life sciences: CMLS* 70 (24), S. 4681–4694.
- Doepel, L.; Lapierre, H.; Kennelly, J. J. (2002): Peripartum Performance and Metabolism of Dairy Cows in Response to Prepartum Energy and Protein Intake. *Journal of dairy science* 85 (9), S. 2315–2334.
- Dong, Kun; Li, Huating; Zhang, Mingliang; Jiang, Shan; Chen, Shuqin; Zhou, Jian et al. (2015): Endoplasmic reticulum stress induces up-regulation of hepatic  $\beta$ -Klotho expression through ATF4 signaling pathway. *Biochemical and biophysical research communications* 459 (2), S. 300–305.
- Drackley, J. K. (1999): Biology of Dairy Cows During the Transition Period: The Final Frontier? *Journal of dairy science* (82), S. 2259–2273.
- Drong, C.; Bühler, S.; Frahm, J.; Hüther, L.; Meyer, U.; von Soosten, D. et al. (2017): Effects of body condition, monensin, and essential oils on ruminal lipopolysaccharide concentration,

- inflammatory markers, and endoplasmic reticulum stress of transition dairy cows. *Journal of dairy science* 100 (4), S. 2751–2764.
- Duffield, T. F.; Lissemore, K. D.; McBride, B. W.; Leslie, K. E. (2009): Impact of hyperketonemia in early lactation dairy cows on health and production. *Journal of dairy science* 92 (2), S. 571–580.
- Duffield, Todd F.; Kelton, Dave F.; Leslie, Ken E.; Lissemore, Kerry D.; Lumsden, John H. (1997): Use of test day milk fat and milk protein to detect subclinical ketosis in dairy cattle in Ontario. *Can Vet J* 1997 (38).
- Evans, T. W. (2002): Review article: albumin as a drug-biological effects of albumin unrelated to oncotic pressure. *Aliment Pharmacol. Ther.* (16), S. 6–11.
- Fisher, Ffolliott Martin; Maratos-Flier, Eleftheria (2016): Understanding the Physiology of FGF21. *Annual review of physiology* 78, S. 223–241.
- Fu, Suneng; Watkins, Steven M.; Hotamisligil, Gökhan S. (2012): The role of endoplasmic reticulum in hepatic lipid homeostasis and stress signaling. *Cell Metabolism* 15 (5), S. 623–634.
- Gälman, Cecilia; Lundåsen, Tomas; Kharitonov, Alexei; Bina, Holly A.; Eriksson, Mats; Hafström, Ingiöld et al. (2008): The circulating metabolic regulator FGF21 is induced by prolonged fasting and PPARalpha activation in man. *Cell Metabolism* 8 (2), S. 169–174.
- Gardner, Brooke M.; Walter, Peter (2011): Unfolded proteins are Ire1-activating ligands that directly induce the unfolded protein response. *Science (New York, N.Y.)* 333 (6051), S. 1891–1894.
- Gariani, Karim; Drifte, Geneviève; Dunn-Siegrist, Irène; Pugin, Jérôme; Jornayvaz, François R. (2013): Increased FGF21 plasma levels in humans with sepsis and SIRS. *Endocrine connections* 2 (3), S. 146–153.
- Geng, T.; Hu, W.; Broadwater, M. H.; Snider, J. M.; Bielawski, J.; Russo, S. B. et al. (2013): Fatty acids differentially regulate insulin resistance through endoplasmic reticulum stress-mediated induction of tribbles homologue 3: a potential link between dietary fat composition and the pathophysiological outcomes of obesity. *Diabetologia* 56 (9), S. 2078–2087.
- Gessner, Denise K.; Schlegel, Gloria; Ringseis, Robert; Schwarz, Frieder J.; Eder, Klaus (2014): Up-regulation of endoplasmic reticulum stress induced genes of the unfolded protein response in the liver of periparturient dairy cows. *BMC veterinary research* 10, S. 46.
- GfE (2001): Empfehlungen zur Energie- und Nährstoffversorgung der Milchkühe und Aufzuchttrinder. Frankfurt am Main, DLG-Verlag 2001.
- GfE (2009): New equations for predicting metabolisable energy of compound feeds for cattle. In *Proceedings of the Society of Nutrition Physiology*. Frankfurt/Main: DLG-Verlag.
- Gillund, P.; Reksen, O.; Grohn, Y. T.; Karlberg, K. (2001): Body condition related to ketosis and reproductive performance in Norwegian dairy cows. *R. Bras. Zootec.* 84 (6), S. 1390–1396.
- Goff, Jesse P. (2008): The monitoring, prevention, and treatment of milk fever and subclinical hypocalcemia in dairy cows. *Veterinary journal (London, England: 1997)* 176 (1), S. 50–57.
- Gómez-Sámano, Miguel Ángel; Grajales-Gómez, Mariana; Zuarth-Vázquez, Julia María; Navarro-Flores, Ma Fernanda; Martínez-Saavedra, Mayela; Juárez-León, Óscar Alfredo et al. (2017): Fibroblast growth factor 21 and its novel association with oxidative stress. *Redox biology* 11, S. 335–341.

- Graber, M.; Kohler, S.; Kaufmann, T.; Doherr, M. G.; Bruckmaier, R. M.; van Dorland, H. A. (2010): A field study on characteristics and diversity of gene expression in the liver of dairy cows during the transition period. *Journal of dairy science* 93 (11), S. 5200–5215.
- Grantham, B. D.; Zammit, V. A. (1988): Role of carnitine palmitoyltransferase I in the regulation of hepatic ketogenesis during the onset and reversal of chronic diabetes. *The Biochemical journal* 249 (2), S. 409–414.
- Gross, J.; van Dorland, H. A.; Bruckmaier, R. M.; Schwarz, F. J. (2011): Performance and metabolic profile of dairy cows during a lactational and deliberately induced negative energy balance with subsequent realimentation. *Journal of dairy science* 94 (4), S. 1820–1830.
- Gross, J. J.; Schwarz, F. J.; Eder, K.; van Dorland, H. A.; Bruckmaier, R. M. (2013): Liver fat content and lipid metabolism in dairy cows during early lactation and during a mid-lactation feed restriction. *R. Bras. Zootec.* 96 (8), S. 5008–5017.
- Gruffat, D.; Durand, D.; Chilliard, Y.; Williams, P.; Bauchart, D. (1997): Hepatic gene expression of apolipoprotein B100 during early lactation in underfed, high producing dairy cows. *R. Bras. Zootec.* 80 (4), S. 657–666.
- Grummer, R. R.; Bertics, S. J.; Lacount, D. W.; Snow, J. A.; Dentine, M. R.; Stauffacher, R. H. (1990): Estrogen induction of fatty liver in dairy cattle. *R. Bras. Zootec.* 73 (6), S. 1537–1543.
- Grummer, Ric R. (1993): Etiology of Lipid-Related Metabolic Disorders in Periparturient Dairy Cows. *Journal of dairy science* 76 (12), S. 3882–3896.
- Grummer, Ric R. (1995): Impact of Changes in Organic Nutrient Metabolism on Feeding the Transition Dairy Cow. *Journal of Animal Science* (73), S. 2820–2833.
- Hammon, H. M.; Stürmer, G.; Schneider, F.; Tuchscherer, A.; Blum, H.; Engelhard, T. et al. (2009): Performance and metabolic and endocrine changes with emphasis on glucose metabolism in high-yielding dairy cows with high and low fat content in liver after calving. *Journal of dairy science* 92 (4), S. 1554–1566.
- Harding, Heather P.; Zhang, Yuhong; Ron, David (1999): Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* 398 (6722), S. 90.
- Hayes, John D.; Dinkova-Kostova, Albena T. (2014): The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism. *Trends in biochemical sciences* 39 (4), S. 199–218.
- Hayirli, A. (2006): The role of exogenous insulin in the complex of hepatic lipidosis and ketosis associated with insulin resistance phenomenon in postpartum dairy cattle. *Veterinary Research communications* 30 (7), S. 749–774.
- Haze, K.; Yoshida, H.; Yanagi, H.; Yura, T.; Mori, K. (1999): Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Molecular biology of the cell* 10 (11), S. 3787–3799.
- He, C. H.; Gong, P.; Hu, B.; Stewart, D.; Choi, M. E.; Choi, A. M.; Alam, J. (2001): Identification of activating transcription factor 4 (ATF4) as an Nrf2-interacting protein. Implication for heme oxygenase-1 gene regulation. *The Journal of biological chemistry* 276 (24), S. 20858–20865.
- Hegardt, F. G. (1999): Mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase: a control enzyme in ketogenesis. *The Biochemical journal* 338, S. 569–582.
- Herdt, Thomas H. (1988): Fatty Liver in Dairy Cows. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* (4), S. 269–287.

- Hiss, S.; Mielenz, M.; Bruckmaier, R. M.; Sauerwein, H. (2004): Haptoglobin concentrations in blood and milk after endotoxin challenge and quantification of mammary Hp mRNA expression. *R. Bras. Zootec.* 87 (11), S. 3778–3784.
- Hoeben, D.; Burvenich, C.; Trevisi, E.; Bertoni, G.; Hamann, J.; Bruckmaier, R. M.; Blum, J. W. (2000): Role of endotoxin and TNF-alpha in the pathogenesis of experimentally induced coliform mastitis in periparturient cows. *The Journal of dairy research* 67 (4), S. 503–514.
- Horst, R. L.; Goff, J. P.; Reinhardt, T. A. (2003): Role of vitamin D in calcium homeostasis and its use in prevention of bovine periparturient paresis. *Acta Veterinaria Scandinavica*, S. 35–50.
- Horton, Jay D.; Goldstein, Joseph L.; Brown, Michael S. (2002): SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J. Clin. Invest.* 109 (9), S. 1125–1131.
- Hotamisligil, Gökhan S. (2010): Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell* 140 (6), S. 900–917.
- Huzzey, Juliana M.; Mann, Sabine; Nydam, Daryl V.; Grant, Richard J.; Overton, Thomas R. (2015): Associations of peripartum markers of stress and inflammation with milk yield and reproductive performance in Holstein dairy cows. *Preventive Veterinary Medicine* 120 (3-4), S. 291–297.
- Inagaki, Takeshi; Dutchak, Paul; Zhao, Guixiang; Ding, Xunshan; Gautron, Laurent; Parameswara, Vinay et al. (2007): Endocrine regulation of the fasting response by PPARalpha-mediated induction of fibroblast growth factor 21. *Cell Metabolism* 5 (6), S. 415–425.
- Itoh, K.; Chiba, T.; Takahashi, S.; Ishii, T.; Igarashi, K.; Katoh, Y. et al. (1997): A Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochemical and biophysical research communications* 236 (2), S. 313–322.
- Jiang, H.-Y.; Wek, S. A.; McGrath, B. C.; Scheuner, D.; Kaufman, R. J.; Cavener, D. R.; Wek, R. C. (2003): Phosphorylation of the Subunit of Eukaryotic Initiation Factor 2 Is Required for Activation of NF- B in Response to Diverse Cellular Stresses. *Molecular and cellular biology* 23 (16), S. 5651–5663.
- Jiang, Shan; Yan, Cheng; Fang, Qi-chen; Shao, Meng-le; Zhang, Yong-liang; Liu, Yang et al. (2014): Fibroblast growth factor 21 is regulated by the IRE1 $\alpha$ -XBP1 branch of the unfolded protein response and counteracts endoplasmic reticulum stress-induced hepatic steatosis. *The Journal of biological chemistry* 289 (43), S. 29751–29765.
- Jones, Dean P. (1982): Intracellular Catalase Function: Analysis of the Catalatic Activity by Product Formation in Isolated Liver Cells'. *Archives of biochemistry and biophysics* 214 (2), S. 806–814.
- Kacheva, Stella; Lenzen, Sigurd; Gurgul-Convey, Ewa (2011): Differential effects of proinflammatory cytokines on cell death and ER stress in insulin-secreting INS1E cells and the involvement of nitric oxide. *Cytokine* 55 (2), S. 195–201.
- Kanki, Keita; Kawamura, Takeshi; Watanabe, Yoshifumi (2009): Control of ER stress by a chemical chaperone counteracts apoptotic signals in IFN-gamma-treated murine hepatocytes. *Apoptosis: an international journal on programmed cell death* 14 (3), S. 309–319.
- Katoh, N. (2002): Relevance of Apolipoproteins in the Development of Fatty Liver and Fatty Liver-Related Peripartum Diseases in Dairy Cows. *Journal of Veterinary Medical Science* 64 (4), S. 293–307.

- Keestra-Gounder, A. Marijke; Byndloss, Mariana X.; Seyffert, Núbia; Young, Briana M.; Chávez-Arroyo, Alfredo; Tsai, April Y. et al. (2016): NOD1 and NOD2 signalling links ER stress with inflammation. *Nature* 532 (7599), S. 394–397.
- Kessler, E. C.; Gross, J. J.; Bruckmaier, R. M.; Albrecht, C. (2014): Cholesterol metabolism, transport, and hepatic regulation in dairy cows during transition and early lactation. *Journal of dairy science* 97 (9), S. 5481–5490.
- Khan, M. Jawad; Jacometo, Carolina B.; Riboni, Mario Vailati; Trevisi, Erminio; Graugnard, Daniel E.; Corrêa, Marcio N.; Lóor, Juan J. (2015): Stress and inflammatory gene networks in bovine liver are altered by plane of dietary energy during late pregnancy. *Functional & integrative genomics* 15 (5), S. 563–576.
- Kim, Jiyoung; Cha, Young-Nam; Surh, Young-Joon (2010): A protective role of nuclear factor-erythroid 2-related factor-2 (Nrf2) in inflammatory disorders. *Mutation research* 690 (1-2), S. 12–23.
- Kim, Seong Hun; Kim, Kook Hwan; Kim, Hyoung-Kyu; Kim, Mi-Jeong; Back, Sung Hoon; Konishi, Morichika et al. (2015): Fibroblast growth factor 21 participates in adaptation to endoplasmic reticulum stress and attenuates obesity-induced hepatic metabolic stress. *Diabetologia* 58 (4), S. 809–818.
- Kitchens, Richard L.; Ulevitch, Richard J.; Munford, Robert S. (1992): Lipopolysaccharide (LPS) Partial Structures Inhibit Responses to LPS in a Human Macrophage Cell Line without Inhibiting LPS Uptake by a CD14-mediated Pathway. *Journal of Experimental Medicine* (176), 485–49.
- Kobayashi, Akira; Kang, Moon-Il; Okawa, Hiromi; Ohtsuji, Makiko; Zenke, Yukari; Chiba, Tomoki et al. (2004): Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. *Molecular and cellular biology* 24 (16), S. 7130–7139.
- Kulinski, Agnes; Rustaeus, Sabina; Vance, Jean E. (2002): Microsomal triacylglycerol transfer protein is required for luminal accretion of triacylglycerol not associated with ApoB, as well as for ApoB lipidation. *The Journal of biological chemistry* 277 (35), S. 31516–31525.
- Kvidera, S. K.; Dickson, M. J.; Abuajamieh, M.; Snider, D. B.; Fernandez, M. V. Sanz; Johnson, J. S. et al. (2017a): Intentionally induced intestinal barrier dysfunction causes inflammation, affects metabolism, and reduces productivity in lactating Holstein cows. *Journal of dairy science* 100 (5), S. 4113–4127.
- Kvidera, S. K.; Horst, E. A.; Abuajamieh, M.; Mayorga, E. J.; Fernandez, M. V. Sanz; Baumgard, L. H. (2017b): Glucose requirements of an activated immune system in lactating Holstein cows. *Journal of dairy science* 100 (3), S. 2360–2374.
- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970 (227), S. 680–685.
- Lebeaupin, Cynthia; Vallée, Deborah; Hazari, Younis; Hetz, Claudio; Chevet, Eric; Bailly-Maitre, Béatrice (2018): Endoplasmic reticulum stress signalling and the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of hepatology* 69 (4), S. 927–947.
- Lee, Jin-Sook; Zheng, Ze; Mendez, Roberto; Ha, Seung-Wook; Xie, Youming; Zhang, Kezhong (2012): Pharmacologic ER stress induces non-alcoholic steatohepatitis in an animal model. *Toxicology letters* 211 (1), S. 29–38.
- Lenth, Russell V. (2016): Least-Squares Means: The R Package lsmeans. *J. Stat. Soft.* 69 (1), S. 1–33.

- Levine, R. L.; Garland, D.; Oliver, C. N.; Amici, A.; Climent, I.; Lenz, A. G. et al. (1990): Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in enzymology* 186, S. 464–478.
- Li, Huating; Fang, Qichen; Gao, Fei; Fan, Jia; Zhou, Jian; Wang, Xiaoying et al. (2010): Fibroblast growth factor 21 levels are increased in nonalcoholic fatty liver disease patients and are correlated with hepatic triglyceride. *Journal of hepatology* 53 (5), S. 934–940.
- Li, Xiaohui; Wang, Yarui; Wang, Huan; Huang, Cheng; Huang, Yan; Li, Jun (2015): Endoplasmic reticulum stress is the crossroads of autophagy, inflammation, and apoptosis signaling pathways and participates in liver fibrosis. *Inflammation research* 64 (1), S. 1–7.
- Li, Y.; Ding, H. Y.; Wang, X. C.; Feng, S. B.; Li, X. B.; Wang, Z. et al. (2016): An association between the level of oxidative stress and the concentrations of NEFA and BHBA in the plasma of ketotic dairy cows. *Journal of animal physiology and animal nutrition* 100 (5), S. 844–851.
- Loor, Juan J.; DNA, Heather M.; Everts, Robin E.; Oliveira, Rosane; Green, Cheryl A.; Guretzky, Nicole A. Janovick et al. (2005): Temporal gene expression profiling of liver from periparturient dairy cows reveals complex adaptive mechanisms in hepatic function. *Physiological genomics* 23 (2), S. 217–226.
- Loor, Juan J.; DNA, Heather M.; Guretzky, Nicole A. Janovick; Everts, Robin E.; Oliveira, Rosane; Green, Cheryl A. et al. (2006): Plane of nutrition prepartum alters hepatic gene expression and function in dairy cows as assessed by longitudinal transcript and metabolic profiling. *Physiological genomics* 27 (1), S. 29–41.
- Lundåsen, Thomas; Hunt, Mary C.; Nilsson, Lisa-Mari; Sanyal, Sabyasachi; Angelin, Bo; Alexson, Stefan E. H.; Rudling, Mats (2007): PPARalpha is a key regulator of hepatic FGF21. *Biochemical and biophysical research communications* 360 (2), S. 437–440.
- Luo, Shen; Wehr, Nancy B. (2009): Protein carbonylation: avoiding pitfalls in the 2,4-dinitrophenylhydrazine assay. *Redox report: communications in free radical research* 14 (4), S. 159–166.
- Maher, Jacquelyn J. (2013): Retinol binding protein 4 and fatty liver: A direct link? *Hepatology (Baltimore, Md.)* 58 (2), S. 477–479.
- Maratos-Flier, Eleftheria (2017): Fatty liver and FGF21 physiology. *Experimental cell research* 360 (1), S. 2–5.
- Marcos, Edgardo; Mazur, Andrzej; Cardot, Philippe; Rayssiguier, Yves (1990): Serum apolipoproteins B and A-I and naturally occurring fatty liver in dairy cows. *Lipids* 25 (9), S. 575–577.
- Martindale, J. L.; Holbrook, N. J. (2002): Cellular response to oxidative stress: Signaling for suicide and survival. *Journal of cellular physiology* 192 (1), S. 1–15.
- Martinon, Fabio; Chen, Xi; Lee, Ann-Hwee; Glimcher, Laurie H. (2010): TLR activation of the transcription factor XBP1 regulates innate immune responses in macrophages. *Nature immunology* 11 (5), S. 411–418.
- McArt, J. A. A.; Nydam, D. V.; Oetzel, G. R. (2012): Epidemiology of subclinical ketosis in early lactation dairy cattle. *Journal of dairy science* 95 (9), S. 5056–5066.
- McArt, Jessica A. A.; Nydam, Daryl V.; Oetzel, Garrett R.; Overton, Thomas R.; Ospina, Paula A. (2013): Elevated non-esterified fatty acids and  $\beta$ -hydroxybutyrate and their association with transition dairy cow performance. *Veterinary journal (London, England: 1997)* 198 (3), S. 560–570.

- McCarthy, M. M.; Mann, S.; Nydam, D. V.; Overton, T. R.; McArt, J. A. A. (2015): Short communication: concentrations of nonesterified fatty acids and  $\beta$ -hydroxybutyrate in dairy cows are not well correlated during the transition period. *Journal of dairy science* 98 (9), S. 6284–6290.
- Miller, N. J.; Rice-Evans, C.; Davies, M. J.; Gopinathan, V.; Milner, A. (1993): A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical science (London, England: 1979)* 84 (4), S. 407–412.
- Morris, D. G.; Waters, S. M.; McCarthy, S. D.; Patton, J.; Earley, B.; Fitzpatrick, R. et al. (2009): Pleiotropic effects of negative energy balance in the postpartum dairy cow on splenic gene expression: repercussions for innate and adaptive immunity. *Physiological genomics* 39 (1), S. 28–37.
- Moshage, H. J.; Janssen, J. A.; Franssen, J. H.; Hafkenschied, J. C.; Yap, S. H. (1987): Study of the molecular mechanism of decreased liver synthesis of albumin in inflammation. *The Journal of clinical investigation* 79 (6), S. 1635–1641.
- Munford, R.; Hall, C. (1986): Detoxification of bacterial lipopolysaccharides (endotoxins) by a human neutrophil enzyme. *Science* 234 (4773), S. 203–205.
- Nair, Vasu; Turner, Gregory A. (1984): The thiobarbituric acid test for lipid peroxidation: Structure of the adduct with malondialdehyde. *Lipids* 1984 (19).
- Naumann K.; Basler R.; Seibold R.; Barth C. (2012): Die chemische Untersuchung von Futtermitteln. Methodenbuch Bd. III. Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten.
- Newman, John C.; Verdin, Eric (2014): Ketone bodies as signaling metabolites. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 25 (1), S. 42–52.
- Nguyen, Truyen; Yang, Chung S.; Pickett, Cecil B. (2004): The pathways and molecular mechanisms regulating Nrf2 activation in response to chemical stress. *Free radical biology & medicine* 37 (4), S. 433–441.
- Nielsen, N.I; Ingvarsten, K.L (2004): Propylene glycol for dairy cows. *Animal Feed Science and Technology* 115 (3-4), S. 191–213.
- Nishimura, Tetsuya; Nakatake, Yuhki; Konishi, Morichika; Itoh, Nobuyuki (2000): Identification of a novel FGF, FGF-21, preferentially expressed in the liver. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* 1492 (1), S. 203–206.
- Oetl, Karl; Stadlbauer, Vanessa; Petter, Franz; Greilberger, Joachim; Putz-Bankuti, Csilla; Hallström, Seth et al. (2008): Oxidative damage of albumin in advanced liver disease. *Biochimica et biophysica acta* 1782 (7-8), S. 469–473.
- Oetzel, G. R. (2004): Monitoring and testing dairy herds for metabolic disease. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 20 (3), 651-674.
- Oetzel, G. R.; Miller, B. E. (2012): Effect of oral calcium bolus supplementation on early-lactation health and milk yield in commercial dairy herds. *Journal of dairy science* 95 (12), S. 7051–7065.
- Okuda-Shimizu, Yuki; Hendershot, Linda M. (2007): Characterization of an ERAD pathway for non-glycosylated BiP substrates which requires Herp. *Mol Cell*. 28 (4), S. 544–554.
- Ospina, P. A.; Nydam, D. V.; Stokol, T.; Overton, T. R. (2010): Associations of elevated nonesterified fatty acids and beta-hydroxybutyrate concentrations with early lactation reproductive performance and milk production in transition dairy cattle in the northeastern United States. *Journal of dairy science* 93 (4), S. 1596–1603.

- Ota, Tsuguhito; Gayet, Constance; Ginsberg, Henry N. (2008): Inhibition of apolipoprotein B100 secretion by lipid-induced hepatic endoplasmic reticulum stress in rodents. *The Journal of clinical investigation* 118 (1), S. 316–332.
- Oyadomari, S.; Mori, M. (2004): Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death and Differentiation* 11, S. 381–389.
- Pagliassotti, Michael J. (2012): Endoplasmic reticulum stress in nonalcoholic fatty liver disease. *Annual review of nutrition* 32, S. 17–33.
- Pahl, H. L. (1999): Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 18 (49), S. 6853–6866.
- Pedernera, Mariana; Celi, Pietro; García, Sergio C.; Salvin, Hannah E.; Barchia, Idris; Fulkerson, William J. (2010): Effect of diet, energy balance and milk production on oxidative stress in early-lactating dairy cows grazing pasture. *Veterinary journal* (London, England: 1997) 186 (3), S. 352–357.
- Pedruzzi, Eric; Guichard, Cécile; Ollivier, Véronique; Driss, Fathi; Fay, Michèle; Prunet, Céline et al. (2004): NAD(P)H oxidase Nox-4 mediates 7-ketocholesterol-induced endoplasmic reticulum stress and apoptosis in human aortic smooth muscle cells. *Molecular and cellular biology* 24 (24), S. 10703–10717.
- Petrova, Kseniya; Oyadomari, Seiichi; Hendershot, Linda M.; Ron, David (2008): Regulated association of misfolded endoplasmic reticulum luminal proteins with P58/DNAJc3. *The EMBO journal* 27, S. 2862–2872.
- Pillarsetti, S.; Saxena, U. (2004): Role of oxidative stress and inflammation in the origin of type 2 diabetes - a paradigm shift. *Expert opinion on therapeutic targets* 8 (5), S. 401–408.
- Pinheiro, José (2018): Package ‘nlme’, S. 1–336.
- Planavila, A.; Redondo, I.; Hondares, E.; Vinciguerra, M.; Munts, C.; Iglesias, R. et al. (2013): Fibroblast growth factor 21 protects against cardiac hypertrophy in mice. *Nature communications* 4, S. 2019.
- Potthoff, Matthew J.; Inagaki, Takeshi; Satapati, Santhosh; Ding, Xunshan; He, Tianteng; Goetz, Regina et al. (2009): FGF21 induces PGC-1alpha and regulates carbohydrate and fatty acid metabolism during the adaptive starvation response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (26), S. 10853–10858.
- Puri, Puneet; Mirshahi, Faridoddin; Cheung, Onpan; Natarajan, Ramesh; Maher, James W.; Kellum, John M.; Sanyal, Arun J. (2008): Activation and dysregulation of the unfolded protein response in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 134 (2), S. 568–576.
- Qiu, Wei; Su, Qiaozhu; Rutledge, Angela C.; Zhang, Jing; Adeli, Khosrow (2009): Glucosamine-induced endoplasmic reticulum stress attenuates apolipoprotein B100 synthesis via PERK signaling. *Journal of lipid research* 50 (9), S. 1814–1823.
- Raboisson, D.; Mounié, M.; Maigné, E. (2014): Diseases, reproductive performance, and changes in milk production associated with subclinical ketosis in dairy cows: a meta-analysis and review. *Journal of dairy science* 97 (12), S. 7547–7563.
- Rakhshandehroo, Maryam; Knoch, Bianca; Müller, Michael; Kersten, Sander (2010): Peroxisome proliferator-activated receptor alpha target genes. *PPAR research* 2010, ID 612089, S.1-20.
- Rayssiguier, Y.; Mazur, A.; Gueux, E.; Reid, I. M.; Roberts C. J. (1988): Plasma lipoproteins and fatty liver in dairy cows. *Research in veterinary science* 45 (3), S. 389–393.

- Re, Roberta; Pellegrini, Nicoletta; Proteggente, Anna; Pannala, Ananth; Yang, Min; Rice-Evans, Catherine (1999): Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* 26 (9-10), S. 1231–1237.
- Reddy, Janardan K.; Hashimoto, Takashi (2001): Peroxisomal  $\beta$ -oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$ : An Adaptive Metabolic System. *Annual review of nutrition* 2001 (21), S. 193–230.
- Reddy, Janardan K.; Mannaerts, Guy P. (1994): Peroxisomal Lipid Metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* 14, S. 343–370.
- Reinhardt, Timothy A.; Lippolis, John D.; McCluskey, Brian J.; Goff, Jesse P.; Horst, Ronald L. (2011): Prevalence of subclinical hypocalcemia in dairy herds. *Veterinary journal (London, England: 1997)* 188 (1), S. 122–124.
- Rezamand, P.; Watts, J. S.; Hunt, K. M.; Bradford, B. J.; Mamedova, L. K.; Morey, S. D. (2012): Bovine hepatic and adipose retinol-binding protein gene expression and relationship with tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Journal of dairy science* 95 (12), S. 7097–7104.
- Ringseis, R.; Gessner, D. K.; Eder, K. (2015): Molecular insights into the mechanisms of liver-associated diseases in early-lactating dairy cows: hypothetical role of endoplasmic reticulum stress. *Journal of animal physiology and animal nutrition* 99 (4), S. 626–645.
- Rodriguez, Julie; Gilson, Hélène; Jamart, Cécile; Naslain, Damien; Pierre, Nicolas; Deldicque, Louise; Francaux, Marc (2015): Pomegranate and green tea extracts protect against ER stress induced by a high-fat diet in skeletal muscle of mice. *European journal of nutrition* 54 (3), S. 377–389.
- Rodriguez-Ortiz, Maria E.; Lopez, Ignacio; Munoz-Castaneda, Juan R.; Martinez-Moreno, Julio M.; Peralta Ramirez, Alan; Pineda, Carmen et al. (2012): Calcium Deficiency Reduces Circulating Levels of FGF23. *Journal of the American Society of nephrology* 23 (7), S. 1190–1197.
- Ron, David; Walter, Peter (2007): Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nature reviews. Molecular cell biology* 8 (7), S. 519–529.
- Roos, Baukje de; Rungapamestry, Vanessa; Ross, Karen; Rucklidge, Garry; Reid, Martin; Duncan, Gary et al. (2009): Attenuation of inflammation and cellular stress-related pathways maintains insulin sensitivity in obese type I interleukin-1 receptor knockout mice on a high-fat diet. *Proteomics* 9 (12), S. 3244–3256.
- Roy, R.; Ordovas, L.; Taourit, S.; Zaragoza, P.; Eggen, A.; Rodellar, C. (2006): Genomic structure and an alternative transcript of bovine mitochondrial glycerol-3-phosphate acyltransferase gene (GPAM). *Cytogenetic and genome research* 112 (1-2), S. 82–89.
- Rukkwamsuk, T.; Geelen, M.J.H.; Kruip, T.A.M.; Wensing, T. (2000): Interrelation of Fatty Acid Composition in Adipose Tissue, Serum, and Liver of Dairy Cows During the Development of Fatty Liver Postpartum. *Journal of dairy science* 83 (1), S. 52–59.
- Rukkwamsuk, Theera; Rungruang, Soonthorn; Choothesa, Apassara; Wensing, Theo (2005): Effect of propylene glycol on fatty liver development and hepatic fructose 1,6 bisphosphatase activity in periparturient dairy cows. *Livestock Production Science* 95 (1-2), S. 95–102.
- Saito, Hitoshi; Kusano, Kenichiro; Kinosaki, Masahiko; Ito, Hirotaka; Hirata, Michinori; Segawa, Hiroko et al. (2003): Human fibroblast growth factor-23 mutants suppress Na<sup>+</sup>-dependent phosphate co-transport activity and 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D3 production. *The Journal of biological chemistry* 278 (4), S. 2206–2211.

- Sanchez, J.; Palou, A.; Pico, C. (2009): Response to Carbohydrate and Fat Refeeding in the Expression of Genes Involved in Nutrient Partitioning and Metabolism: Striking Effects on Fibroblast Growth Factor-21 Induction. *Endocrinology* 150 (12), S. 5341–5350.
- Santos, J.E.P.; DePeters, E. J.; Jardon, P. W.; Huber, J. T. (2001): Effect of Prepartum Dietary Protein Level on Performance of Primigravid and Multiparous Holstein Dairy Cows. *Journal of dairy science* 84 (1), S. 213–224.
- Schaap, Frank G.; Kremer, Andreas E.; Lamers, Wouter H.; Jansen, Peter L. M.; Gaemers, Ingrid C. (2013): Fibroblast growth factor 21 is induced by endoplasmic reticulum stress. *Biochimie* 95 (4), S. 692–699.
- Schäff, Christine; Börner, Sabina; Hacke, Sandra; Kautzsch, Ulrike; Albrecht, Dirk; Hammon, Harald M. et al. (2012): Increased anaplerosis, TCA cycling, and oxidative phosphorylation in the liver of dairy cows with intensive body fat mobilization during early lactation. *Journal of proteome research* 11 (11), S. 5503–5514.
- Schlegel, G.; Ringseis, R.; Keller, J.; Schwarz, F. J.; Windisch, W.; Eder, K. (2013): Expression of fibroblast growth factor 21 in the liver of dairy cows in the transition period and during lactation. *Journal of animal physiology and animal nutrition* 97 (5), S. 820–829.
- Schlegel, Gloria; Keller, Janine; Hirche, Frank; Geißler, Stefanie; Schwarz, Frieder J.; Ringseis, Robert et al. (2012a): Expression of genes involved in hepatic carnitine synthesis and uptake in dairy cows in the transition period and at different stages of lactation. *BMC veterinary research* 8 (28), S. 1–12.
- Schlegel, Gloria; Keller, Janine; Hirche, Frank; Geissler, Stefanie; Schwarz, Frieder J.; Ringseis, Robert et al. (2012b): Expression of genes involved in hepatic carnitine synthesis and uptake in dairy cows in the transition period and at different stages of lactation. *BMC veterinary research* 8 (28), S. 1–12.
- Schoenberg, Katie M.; Giesy, Sarah L.; Harvatine, Kevin J.; Waldron, Matthew R.; Cheng, Christine; Kharitononkov, Alexei; Boisclair, Yves R. (2011): Plasma FGF21 is elevated by the intense lipid mobilization of lactation. *Endocrinology* 152 (12), S. 4652–4661.
- Schröder, Martin; Kaufman, Randal J. (2005): ER stress and the unfolded protein response. *Mutation research* 569 (1-2), S. 29–63.
- Schwaller, Melissa; Wilkinson, Bonney; Gilbert, Hiram F. (2003): Reduction-reoxidation cycles contribute to catalysis of disulfide isomerization by protein-disulfide isomerase. *The Journal of biological chemistry* 278 (9), S. 7154–7159.
- Seifi, H. A.; Gorji-Dooz, M.; Mohri, M.; Dalir-Naghadeh, B.; Farzaneh, N. (2007): Variations of energy-related biochemical metabolites during transition period in dairy cows. *Comp Clin Pathol* 16 (4), S. 253–258.
- Serasanambati, Mamatha; Chilakapati, Shanmuga Reddy (2016): Function of Nuclear Factor Kappa B (NF-κB) in Human Diseases-A Review. *South Indian Journal of Biological Sciences* 2 (4), S. 368–387.
- Sharma, N.; Singh, N. K.; Singh, O. P.; Pandey, V.; Verma, P. K. (2011): Oxidative Stress and Antioxidant Status during Transition Period in Dairy Cows. *Asian-Australasian journal of animal sciences* 24 (4), S. 479–484.
- Sharma, Ritu S.; Harrison, David J.; Kisielewski, Dorothy; Cassidy, Diane M.; McNeilly, Alison D.; Gallagher, Jennifer R. et al. (2018): Experimental Nonalcoholic Steatohepatitis and Liver Fibrosis Are Ameliorated by Pharmacologic Activation of Nrf2 (NF-E2 p45-Related Factor 2). *Cellular and molecular gastroenterology and hepatology* 5 (3), S. 367–398.

- Shenkman, Marina; Groisman, Bella; Ron, Efrat; Avezov, Edward; Hendershot, Linda M.; Lederkremer, Gerardo Z. (2013): A shared endoplasmic reticulum-associated degradation pathway involving the EDEM1 protein for glycosylated and nonglycosylated proteins. *The Journal of biological chemistry* 288 (4), S. 2167–2178.
- Shi, Xiaoxia; Li, Dangdang; Deng, Qinghua; Li, Yu; Sun, Guoquan; Yuan, Xue et al. (2015): NEFAs activate the oxidative stress-mediated NF-kappa B signaling pathway to induce inflammatory response in calf hepatocytes. *Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 145, S. 103–112.
- Shimada, Takashi; Hasegawa, Hisashi; Yamazaki, Yuji; Muto, Takanori; Hino, Rieko; Takeuchi, Yasuhiro et al. (2004): FGF-23 is a potent regulator of vitamin D metabolism and phosphate homeostasis. *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 19 (3), S. 429–435.
- Shimomura, Iichiro; Shimano, Hitoshi; Horton, Jay D.; Goldstein, Joseph L.; Brown, Michael S. (1997): Differential Expression of Exons 1a and 1c in mRNAs for Sterol Regulatory Element Binding Protein-1 in Human and Mouse Organs and Cultured Cells. *J. Clin. Invest.* 99 (5), S. 838–845.
- Sidwell, C. G.; Salwin, Harold; Benca, Milada; Mitchell, J. H. (1954): The Use of Thiobarbituric Acid as a Measure of Fat Oxidation. *The journal of the American oil chemists' society* 31, S. 603–606.
- Song, Yongyan; Zhao, Miaoyun; Cheng, Xiao; Shen, Jing; Khound, Rituraj; Zhang, Kezhong; Su, Qiaozhu (2017): CREBH mediates metabolic inflammation to hepatic VLDL overproduction and hyperlipoproteinemia. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 95 (8), S. 839–849.
- Sordillo, Lorraine M.; Aitken, Stacey L. (2009): Impact of oxidative stress on the health and immune function of dairy cattle. *Veterinary immunology and immunopathology* 128 (1-3), S. 104–109.
- Sriburi, Rungtawan; Jackowski, Suzanne; Mori, Kazutoshi; Brewer, Joseph W. (2004): XBP1: a link between the unfolded protein response, lipid biosynthesis, and biogenesis of the endoplasmic reticulum. *The Journal of cell biology* 167 (1), S. 35–41.
- Steele, Michael A.; Croom, Jim; Kahler, Melissa; AlZahal, Ousama; Hook, Sarah E.; Plaizier, Kees; McBride, Brian W. (2011): Bovine rumen epithelium undergoes rapid structural adaptations during grain-induced subacute ruminal acidosis. *American journal of physiology-regulatory integrative and comparative physiology* 300 (6), R1515-R1523.
- Strassburg, Christian P.; Kalthoff, Sandra; Ehmer, Ursula (2008): Variability and function of family 1 uridine-5'-diphosphate glucuronosyltransferases (UGT1A). *Critical reviews in clinical laboratory sciences* 45 (6), S. 485–530.
- Sun, Zhengwu; Andersson, Roland (2002): NF-kappaB activation and inhibition: a review. *Shock (Augusta, Ga.)* 18 (2), S. 99–106.
- Szabadkai, György; Rizzuto, Rosario (2004): Participation of endoplasmic reticulum and mitochondrial calcium handling in apoptosis: more than just neighborhood? *FEBS Letters* 567 (1), S. 111–115.
- Taguchi, Keiko; Motohashi, Hozumi; Yamamoto, Masayuki (2011): Molecular mechanisms of the Keap1–Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. *Genes to cells: devoted to molecular & cellular mechanisms* 16 (2), S. 123–140.

- Trevisi, E.; Amadori, M.; Bakudila, A. M.; Bertoni, G. (2009): Metabolic changes in dairy cows induced by oral, low-dose interferon-alpha treatment. *Journal of Animal Science* 87 (9), S. 3020–3029.
- Trevisi, E.; Amadori, M.; Cogrossi, S.; Razzuoli, E.; Bertoni, G. (2012): Metabolic stress and inflammatory response in high yielding, periparturient dairy cows. *Research in veterinary science* 93 (2), S. 695–704.
- Uebanso, Takashi; Taketani, Yutaka; Yamamoto, Hironori; Amo, Kikuko; Ominami, Hirokazu; Arai, Hidekazu et al. (2011): Paradoxical Regulation of Human FGF21 by Both Fasting and Feeding Signals: Is FGF21 a Nutritional Adaptation Factor? *PloS one* 6 (8), S. 1–8.
- Urano, Fumihiko; Wang, XiaoZhong; Bertolotti, Anne; Zhang, Yuhong; Chung, Peter; Harding, Heather P.; Ron, David (2000): Coupling of Stress in the ER to Activation of JNK Protein Kinases by Transmembrane Protein Kinase IRE1. *Science* 287 (5453), S. 664–666.
- Valenzuela, Alfonso (1990): The biological significance of Malondialdehyde determination in the assessment of tissue oxidative stress. *Life Sciences* 48, S. 301–309.
- van Knegsel, Ariëtte T. M.; van den Brand, Henry; Dijkstra, Jan; Tamminga, Seerp; Kemp, Bas (2005): Effect of dietary energy source on energy balance, production, metabolic disorders and reproduction in lactating dairy cattle. *Reproduction, nutrition, development* 45 (6), S. 665–688.
- Vandesompele, Jo; Preter, Katleen de; Pattyn, Filip; Poppe, Bruce; van Roy, Nadine; Paepe, Anne de; Speleman, Frank (2002): Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* (3), 0034.1–0034.11.
- Vels, L.; Røntved, C. M.; Bjerring, M.; Ingvarsen, K. L. (2009): Cytokine and acute phase protein gene expression in repeated liver biopsies of dairy cows with a lipopolysaccharide-induced mastitis. *Journal of dairy science* 92 (3), S. 922–934.
- Vries, M. J. de; Veerkamp, R. F. (2000): Energy Balance of Dairy Cattle in Relation to Milk Production Variables and Fertility. *Journal of dairy science* 83 (1), S. 62–69.
- Wahlefeld, A. W. (1969): *Methods of Enzymatic Analysis (Second English Edition)*. Triglycerides determination after enzymatic hydrolysis. Bergmeyer HU, ed. *Methods of enzymatic analysis*, 2nd ed. Vol. 4. New York: Academic Press.
- Walsh, R. B.; Walton, J. S.; Kelton, D. F.; LeBlanc, S. J.; Leslie, K. E.; Duffield, T. F. (2007): The effect of subclinical ketosis in early lactation on reproductive performance of postpartum dairy cows. *Journal of dairy science* 90 (6), S. 2788–2796.
- Wang, Chunxia; Huang, Zhiying; Du, Ying; Cheng, Ying; Chen, Shanghai; Guo, Feifan (2010): ATF4 regulates lipid metabolism and thermogenesis. *Cell Res* 20 (2), S. 174–184.
- Wang, Dong; Wei, Yuren; Pagliassotti, Michael J. (2006): Saturated fatty acids promote endoplasmic reticulum stress and liver injury in rats with hepatic steatosis. *Endocrinology* 147 (2), S. 943–951.
- Wang, Shiyu; Chen, Zhouji; Lam, Vivian; Han, Jaeseok; Hassler, Justin; Finck, Brian N. et al. (2012): IRE1 $\alpha$ -XBP1s induces PDI expression to increase MTP activity for hepatic VLDL assembly and lipid homeostasis. *Cell Metabolism* 16 (4), S. 473–486.
- Wathes, D. C.; Cheng, Z.; Bourne, N.; Taylor, V. J.; Coffey, M. P.; Brotherstone, S. (2007): Differences between primiparous and multiparous dairy cows in the inter-relationships between metabolic traits, milk yield and body condition score in the periparturient period. *Domestic animal endocrinology* 33 (2), S. 203–225.

- Wei, Yuren; Wang, Dong; Topczewski, Farran; Pagliassotti, Michael J. (2006): Saturated fatty acids induce endoplasmic reticulum stress and apoptosis independently of ceramide in liver cells. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 291 (2), E275-281.
- Wensing, Th.; Kruij, Th.; Geelen, M. J. H.; Wentink, G. H.; Top, A. M. (1997): Postpartum fatty liver in high-producing dairy cows in practice and in animal studies. The connection with health, production and reproduction problems. *Comparative Haematology International* 7 (3), S. 167–171.
- Wetterau, John R.; Aggerbeck, Lawrence P.; Laplaud, P. Michel; McLean, Larry R. (1991): Structural properties of the microsomal triglyceride-transfer protein complex. *Biochemistry* (30), S. 4406–4412.
- White, Heather M. (2015): The Role of TCA Cycle Anaplerosis in Ketosis and Fatty Liver in Periparturient Dairy Cows. *Animals: an open access journal from MDPI* 5 (3), S. 793–802.
- Whiteside, S. T.; Israel, A. (1997): I kappa B proteins: structure, function and regulation. *Cancer Biology* 1997 (8), S. 75–82.
- Xiao, Guozhi; Zhang, Ting; Yu, Shibing; Lee, Sojin; Calabuig-Navarro, Virtu; Yamauchi, Jun et al. (2013): ATF4 protein deficiency protects against high fructose-induced hypertriglyceridemia in mice. *The Journal of biological chemistry* 288 (35), S. 25350–25361.
- Xue, Xin; Piao, Jiang-Hu; Nakajima, Akihito; Sakon-Komazawa, Sachiko; Kojima, Yuko; Mori, Kazutoshi et al. (2005): Tumor necrosis factor alpha (TNFalpha) induces the unfolded protein response (UPR) in a reactive oxygen species (ROS)-dependent fashion, and the UPR counteracts ROS accumulation by TNFalpha. *The Journal of biological chemistry* 280 (40), S. 33917–33925.
- Yamamoto, Keisuke; Yoshida, Hiderou; Kokame, Koichi; Kaufman, Randal J.; Mori, Kazutoshi (2004): Differential contributions of ATF6 and XBP1 to the activation of endoplasmic reticulum stress-responsive cis-acting elements ERSE, UPRE and ERSE-II. *Journal of biochemistry* 136 (3), S. 343–350.
- Yamazaki, Hiroaki; Hiramatsu, Nobuhiko; Hayakawa, Kunihiro; Tagawa, Yasuhiro; Okamura, Maro; Ogata, Ryouji et al. (2009): Activation of the Akt-NF-kappaB pathway by subtilase cytotoxin through the ATF6 branch of the unfolded protein response. *Journal of immunology (Baltimore, Md: 1950)* 183 (2), S. 1480–1487.
- Yates, Melinda S.; Tran, Quynh T.; Dolan, Patrick M.; Osburn, William O.; Shin, Soona; McCulloch, Colin C. et al. (2009): Genetic versus chemoprotective activation of Nrf2 signaling: overlapping yet distinct gene expression profiles between Keap1 knockout and triterpenoid-treated mice. *Carcinogenesis* 30 (6), S. 1024–1031.
- Yoshida, Hiderou; Matsui, Toshie; Yamamoto, Akira; Okada, Tetsuya; Mori, Kazutoshi (2001): XBP1 mRNA Is Induced by ATF6 and Spliced by IRE1 in Response to ER Stress to Produce a Highly Active Transcription Factor. *Cell* 107 (7), S. 881–891.
- Yuan, Kai; Farney, Jaymelynn K.; Mamedova, Laman K.; Sordillo, Lorraine M.; Bradford, Barry J. (2013): TNF $\alpha$  altered inflammatory responses, impaired health and productivity, but did not affect glucose or lipid metabolism in early-lactation dairy cows. *PloS one* 8 (11), S. 1–11.
- Yuzefovych, Larysa V.; Musiyenko, Sergiy I.; Wilson, Glenn L.; Rachek, Lyudmila I. (2013): Mitochondrial DNA Damage and Dysfunction, and Oxidative Stress Are Associated with Endoplasmic Reticulum Stress, Protein Degradation and Apoptosis in High Fat Diet-Induced Insulin Resistance Mice. *PloS one* 8 (1), S. 1–8.

- Zebeli, Q.; Ametaj, B. N. (2009): Relationships between rumen lipopolysaccharide and mediators of inflammatory response with milk fat production and efficiency in dairy cows. *Journal of dairy science* 92 (8), S. 3800–3809.
- Zhang, Kezhong; Shen, Xiaohua; Wu, Jun; Sakaki, Kenjiro; Saunders, Thomas; Rutkowski, D. Thomas et al. (2006): Endoplasmic reticulum stress activates cleavage of CREBH to induce a systemic inflammatory response. *Cell* 124 (3), S. 587–599.
- Zhang, Kezhong; Wang, Shiyu; Malhotra, Jyoti; Hassler, Justin R.; Back, Sung Hoon; Wang, Guohui et al. (2011): The unfolded protein response transducer IRE1 $\alpha$  prevents ER stress-induced hepatic steatosis. *The EMBO journal* 30 (7), S. 1357–1375.
- Zhang, Xue-Qun; Xu, Cheng-Fu; Yu, Chao-Hui; Chen, Wei-Xing; Li, You-Ming (2014): Role of endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *World journal of gastroenterology* 20 (7), S. 1768–1776.
- Zhang, Yuming; Li, Xiaobing; Zhang, Haolong; Zhao, Zhibo; Peng, Zhicheng; Wang, Zhe et al. (2018): Non-Esterified Fatty Acids Over-Activate the TLR2/4-NF-K $\kappa$ B Signaling Pathway to Increase Inflammatory Cytokine Synthesis in Neutrophils from Ketotic Cows. *Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 48 (2), S. 827–837.
- Zhang, Zi-Feng; Fan, Shao-Hua; Zheng, Yuan-Lin; Lu, Jun; Wu, Dong-Mei; Shan, Qun; Hu, Bin (2009): Purple sweet potato color attenuates oxidative stress and inflammatory response induced by d-galactose in mouse liver. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 47 (2), S. 496–501.
- Zhao, Lei; Zhong, Shan; Qu, Haiyang; Xie, Yunxia; Cao, Zhennan; Li, Qing et al. (2015): Chronic inflammation aggravates metabolic disorders of hepatic fatty acids in high-fat diet-induced obese mice. *Scientific reports* 5 (10222), S. 1–12.
- Zhu, Shenglong; Ma, Lei; Wu, Yunzhou; Ye, Xianlong; Zhang, Tianyuan; Zhang, Qingyang et al. (2014): FGF21 treatment ameliorates alcoholic fatty liver through activation of AMPK-SIRT1 pathway. *Acta biochimica et biophysica Sinica* 46 (12), S. 1041–1048.

## 6 Anhang

**Tabelle 6.1 Korrelationen (nach Pearson) zwischen der Parametern der Inflammation und der Energiebilanz sowie freien Fettsäuren bei Holstein Kühen in Woche 1 pp. (n = 50)**

Korrelationskoeffizient mit $p < 0,05$		
	Energiebilanz [MJ NEL/ Tag]	NEFA [ $\mu\text{mol/L}$ Plasma]
<i>SAA</i>	n.s.	n.s.
<i>HP</i>	n.s.	n.s.
<i>CP</i>	n.s.	n.s.
<i>CRP</i>	n.s.	n.s.
<i>RBP4</i>	-0,433	0,406
<i>TTR</i>	n.s.	n.s.
<i>TNF</i>	n.s.	n.s.
<i>IL1b</i>	n.s.	n.s.
<i>IL8</i>	n.s.	n.s.
<i>PTGS2</i>	n.s.	n.s.
<i>CCL2</i>	n.s.	n.s.
<i>AOAH</i>	n.s.	n.s.
<u>Plasmaparameter</u>		
Albumin	n.s.	n.s.
<i>SAA</i>	n.s.	n.s.
<i>RBP4</i>	n.s.	n.s.
LPS	n.s.	n.s.

*CP* = Ceruloplasmin, *CRP* = C-reaktives Protein, *HP* = Haptoglobin, *SAA* = Serumamyloid A, *TTR* = Transthyretin, *RBP4* = Retinol-bindendes Protein 4, *CCL2* = Chemokin-Ligand 2, *IL1B* = Interleukin 1 beta, *IL8* = Interleukin 8, *PTGS2* = Prostaglandin-Endoperoxid Synthase 2, *TNF* = Tumor-Nekrose Faktor, NEFA = nicht veresterte freie Fettsäuren, n.s. = nicht signifikant ( $p > 0,05$ )

**Tabelle 6.2 Korrelationen (nach Pearson) zwischen Parametern der Inflammation und der Konzentration an LPS im Plasma von Holstein Kühen in Woche 1 pp. (n = 50)**

Korrelationskoeffizient mit $p < 0,05$			
<u>Genexpressionen</u>		<u>Plasmaparameter</u>	
<i>SAA</i>	n.s.	Albumin	n.s.
<i>HP</i>	0,280	<i>SAA</i>	n.s.
<i>CP</i>	n.s.	<i>RBP4</i>	n.s.
<i>CRP</i>	n.s.		
<i>RBP4</i>	n.s.		
<i>TTR</i>	n.s.		
<i>TNF</i>	n.s.		
<i>IL1b</i>	n.s.		
<i>IL8</i>	n.s.		
<i>PTGS2</i>	n.s.		
<i>CCL2</i>	n.s.		
<i>AOAH</i>	n.s.		

*CP* = Ceruloplasmin, *CRP* = C-reaktives Protein, *HP* = Haptoglobin, *SAA* = Serumamyloid A, *TTR* = Transthyretin, *RBP4* = Retinol-bindendes Protein 4, *CCL2* = Chemokin-Ligand 2, *IL1B* = Interleukin 1 beta, *IL8* = Interleukin 8, *PTGS2* = Prostaglandin-Endoperoxid Synthase 2, *TNF* = Tumor-Nekrose Faktor, n.s. = nicht signifikant ( $p > 0,05$ )

**Tabelle 6.3 Korrelationen (nach Pearson) zwischen der Parametern des oxidativen Stresses und der Energiebilanz sowie freien Fettsäuren bei Holstein Kühen in Woche 1 pp. (n = 50)**

Korrelationskoeffizient mit $p < 0,05$		
	Energiebilanz [MJ NEL/ Tag]	NEFA [ $\mu\text{mol/L}$ Plasma]
Retinol	n.s.	n.s.
$\beta$ -Carotin	n.s.	n.s.
$\alpha$ -Tocopherol	n.s.	n.s.
$\gamma$ -Tocopherol	n.s.	n.s.
TBARS	n.s.	n.s.
TEAC	0,407	n.s.
Proteincarbonyle	n.s.	n.s.

TEAC = Trolox-äquivalente antioxidative Kapazität, TBARS = Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen, NEFA = nicht veresterte freie Fettsäuren ,n.s. = nicht signifikant ( $p > 0,05$ )

**Tabelle 6.4 Korrelationen (nach Pearson) zwischen der Expression von Nrf2-Zielgenen und der Energiebilanz sowie freien Fettsäuren bei Holstein Kühen in Woche 1 pp. (n = 50)**

Korrelationskoeffizient mit $p < 0,05$						
	<i>CAT</i>	<i>GPXI</i>	<i>MT1A</i>	<i>NQO1</i>	<i>SOD1</i>	<i>UGT1A1</i>
Energiebilanz [MJ NEL/ Tag]	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
NEFA [ $\mu\text{mol/L}$ Plasma]	n.s.	n.s.	n.s.	0,399	n.s.	n.s.

*CAT* = Catalase, *GPXI* = Glutathionperoxidase, *MT1A* = Metallothionein-1A, *SOD1* = Superoxid-Dismutase 1, *UGT1A1* = UDP-Glucuronosyltransferase 1 A1, *NQO1* =NAD(P)H Dehydrogenase, Quinon 1, NEFA = nicht veresterte freie Fettsäuren, n.s. = nicht signifikant ( $p > 0,05$ )

**Tabelle 6.5 Korrelationen (nach Pearson) zwischen FGF21 und der Energiebilanz sowie freien Fettsäuren bei Holstein Kühen in Woche 1 pp. (n = 50)**

Korrelationskoeffizient mit $p < 0,05$		
	hepatische <i>FGF21</i> -mRNA	FGF21 im Plasma
Energiebilanz [MJ NEL/ Tag]	n.s.	n.s.
NEFA [ $\mu\text{mol/L}$ Plasma]	n.s.	n.s.

*FGF21* = *Fibroblast growth factor* 21, NEFA = nicht veresterte freie Fettsäuren, n.s. = nicht signifikant ( $p > 0,05$ )

**Tabelle 6.6 Korrelationen (nach Pearson) zwischen FGF21 und Parametern des oxidativen Stresses bei Holstein Kühen in Woche 1 pp. (n = 50)**

Korrelationskoeffizient mit $p < 0,05$		
	hepatische <i>FGF21</i> -mRNA	FGF21 im Plasma
Retinol	-0,358	n.s.
$\beta$ -Carotin	n.s.	n.s.
$\alpha$ -Tocopherol	n.s.	n.s.
$\gamma$ -Tocopherol	-0,359	n.s.
TBARS	n.s.	n.s.
TEAC	n.s.	n.s.
Proteincarbonyle	n.s.	n.s.

TEAC = Trolox-äquivalente antioxidative Kapazität, TBARS = Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen, *FGF21* = *Fibroblast growth factor* 21, n.s. = nicht signifikant ( $p > 0,05$ )

**Tabelle 6.7 Korrelationen (nach Pearson) zwischen Parametern des Calcium und Vitamin D-Stoffwechsels und der Energiebilanz sowie freien Fettsäuren bei Holstein Kühen in Woche 1 pp. (n = 50)**

	Korrelationskoeffizient mit $p < 0,05$						
	Calcium	Phosphat	HVD3	DHVD3	PTH	FGF23	<i>CYP2R1</i>
Energiebilanz [MJ NEL/ Tag]	-0,428	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
NEFA [ $\mu\text{mol/L}$ Plasma]	0,342	-0,296	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

FGF23 = *Fibroblast growth factor 23*, PTH = Parathormon, HVD3 = 25-Hydroxycholecalciferol, DHVD3 = 1, 25-Dihydroxycholecalciferol, *CYP2R1* = Vitamin-D<sub>3</sub>-25-Hydroxylase, NEFA = nicht veresterte freie Fettsäuren, n.s. = nicht signifikant ( $p > 0,05$ )

**Tabelle 6.8 Korrelationen (nach Pearson) zwischen Parametern des Calcium und Vitamin D-Stoffwechsels und Parametern des oxidativen Stresses bei Holstein Kühen in Woche 1 pp. (n = 50)**

	Korrelationskoeffizient mit $p < 0,05$						
	Calcium	Phosphat	HVD3	DHVD3	PTH	FGF23	<i>CYP2R1</i>
Retinol	n.s.	-0,333	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
$\beta$ -Carotin	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
$\alpha$ -Tocopherol	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
$\gamma$ -Tocopherol	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
TBARS	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
TEAC	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Proteincarbonyl	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

TEAC = Trolox-äquivalente antioxidative Kapazität, TBARS = Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen, FGF23 = *Fibroblast growth factor 23*, PTH = Parathormon, HVD3 = 25-Hydroxycholecalciferol, DHVD3 = 1, 25-Dihydroxycholecalciferol, *CYP2R1* = Vitamin-D<sub>3</sub>-25-Hydroxylase, n.s. = nicht signifikant ( $p > 0,05$ )

**Tabelle 6.9 Korrelationen (nach Pearson) zwischen Parametern des Calcium und Vitamin D-Stoffwechsels und FGF21 bei Holstein Kühen in Woche 1 pp. (n = 50)**

	Korrelationskoeffizient mit $p < 0,05$						
	Calcium	Phosphat	HVD3	DHVD3	PTH	FGF23	<i>CYP2R1</i>
<i>FGF21</i> -mRNA	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
FGF21 im Plasma	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

*FGF21* = *Fibroblast growth factor 21*, FGF23 = *Fibroblast growth factor 23*, PTH = Parathormon, HVD3 = 25-Hydroxycholecalciferol, DHVD3 = 1, 25-Dihydroxycholecalciferol, *CYP2R1* = Vitamin-D<sub>3</sub>-25-Hydroxylase, n.s. = nicht signifikant ( $p > 0,05$ )

**Tabelle 6.10 Korrelationen (nach Pearson) zwischen Parametern des Calcium und Vitamin D-Stoffwechsels und der hepatischen Expression von Nrf2-Zielgenen bei Holstein Kühen in Woche 1 pp. (n = 50)**

Korrelationskoeffizient mit p < 0,05							
	Calcium	Phosphat	HVD3	DHVD3	PTH	FGF23	<i>CYP2R1</i>
<i>CAT</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>GPX1</i>	n.s.	0,417	0,411.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>MT1A1</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>NQO1</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>SOD1</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0,292
<i>UGT1A1</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

TEAC = Trolox-äquivalente antioxidative Kapazität, TBARS = Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen, FGF23 = *Fibroblast growth factor 23*, PTH = Parathormon, HVD3 = 25-Hydroxycholecalciferol, DHVD3 = 1, 25-Dihydroxycholecalciferol, *CYP2R1* = Vitamin-D<sub>3</sub>-25-Hydroxylase, *CAT* = Catalase, *GPX1* = Glutathionperoxidase, *MT1A* = Metallothionein-1A, *SOD1* = Superoxid-Dismutase 1, *UGT1A1* = UDP-Glucuronosyltransferase 1 A1, *NQO1* = NAD(P)H Dehydrogenase, Quinon 1, n.s. = nicht signifikant (p > 0,05)

**Tabelle 6.11 Korrelationen (nach Pearson) zwischen Expressionen von Genen der UPR und der Energiebilanz sowie freien Fettsäuren bei Holstein Kühen in Woche 1 pp. (n = 50)**

Korrelationskoeffizient mit p < 0,05		
	Energiebilanz [MJ NEL/ Tag]	NEFA [ $\mu$ mol/L Plasma]
<i>ATF4</i>	n.s.	n.s.
<i>BAK1</i>	n.s.	n.s.
<i>BAX</i>	n.s.	n.s.
<i>CASP3</i>	n.s.	n.s.
<i>CASP8</i>	n.s.	n.s.
<i>CASP9</i>	n.s.	n.s.
<i>DDIT3</i>	n.s.	n.s.
<i>DNAJC3</i>	n.s.	n.s.
<i>EDEMI</i>	n.s.	n.s.
<i>HERPUD1</i>	n.s.	n.s.
<i>HSPA5</i>	n.s.	n.s.
<i>PDIA4</i>	n.s.	n.s.
<i>XBPIspl</i>	n.s.	n.s.

*ATF4* = aktivierender Transkriptionsfaktor 4, *BAK1* = BCL2-Antagonist 1, *BAX* = BCL-assoziertes X-Protein, *CASP* = Caspase, *DDIT3* = DNA-Schaden-induzierendes Transkript 3, *DNAJC3* = DnaJ (Hsp40) Homolog, *EDEMI* = ER-Abbau-Enhancer, *HERPUD* = Homocystein-induzierte, ER-Stress induzierte, Ubiquitin-ähnliche Domäne 1, *PDIA4* = Protein-Disulfid-Isomerase Familie A4, *HSPA5* = Hitzeschockprotein 70 kDa Protein, *XBPIs* = X-Box bindendes Protein 1 gespleißt, NEFA = nicht veresterte freie Fettsäuren, n.s. = nicht signifikant (p > 0,05)

**Tabelle 6.12 Korrelationen (nach Pearson) zwischen Expressionen von Genen der UPR und Parametern der Inflammation im Plasma bei Holstein Kühen in Woche 1 pp. (n = 50)**

Korrelationskoeffizient mit $p < 0,05$			
	SAA ( im Plasma)	RBP4 (im Plasma)	Albumin (im Plasma)
<i>ATF4</i>	n.s.	n.s.	n.s.
<i>BAK1</i>	n.s.	n.s.	n.s.
<i>BAX</i>	n.s.	n.s.	n.s.
<i>CASP3</i>	n.s.	n.s.	n.s.
<i>CASP8</i>	n.s.	n.s.	n.s.
<i>CASP9</i>	n.s.	n.s.	n.s.
<i>DDIT3</i>	n.s.	0,305	n.s.
<i>DNAJC3</i>	n.s.	n.s.	n.s.
<i>EDEMI</i>	n.s.	n.s.	n.s.
<i>HERPUD1</i>	n.s.	n.s.	n.s.
<i>HSPA5</i>	n.s.	n.s.	n.s.
<i>PDIA4</i>	n.s.	n.s.	n.s.
<i>XBPIspl</i>	n.s.	n.s.	n.s.

*ATF4*= aktivierender Transkriptionsfaktor 4, *BAK1* = BCL2-Antagonist 1, *BAX* = BCL-assoziertes X-Protein, *CASP* = Caspase, *DDIT3* = DNA-Schaden-induzierendes Transkript 3, *DNAJC3* = DnaJ (Hsp40) Homolog, *EDEMI* = ER-Abbau-Enhancer, *HERPUD* = Homocystein-induzierte, ER-Stress induzierte, Ubiquitin-ähnliche Domäne 1, *PDIA4* = Protein-Disulfid-Isomerase Familie A4, *HSPA5* = Hitzeschockprotein 70 kDa Protein, *XBPIs* = X-Box bindendes Protein 1 gespleißt, n.s. = nicht signifikant ( $p > 0,05$ )

**Tabelle 6.13 Korrelationen (nach Pearson) zwischen FGF21 und Parametern des Lipidstoffwechsels bei Holstein Kühen in Woche 1 pp. (n = 50)**

Korrelationskoeffizient mit $p < 0,05$		
	hepatische <i>FGF21</i> -mRNA	FGF21 im Plasma
TG [mg/g Leber]	n.s.	n.s.
Cholesterol [mg/g Leber]	n.s.	n.s.
TG [mg/dL Plasma]	n.s.	n.s.
Cholesterol [mg/dL Plasma]	n.s.	n.s.
<i>ACADM</i>	n.s.	n.s.
<i>ACOX</i>	n.s.	n.s.
<i>CPT1A</i>	n.s.	n.s.
<i>ACACA</i>	n.s.	n.s.
<i>FASN</i>	n.s.	n.s.
<i>GPAM</i>	n.s.	n.s.
<i>SLC27A1</i>	n.s.	n.s.
<i>SREBF1</i>	n.s.	n.s.
<i>APOB</i>	n.s.	n.s.
<i>MTTP</i>	n.s.	n.s.

*ACACA* = Acetyl-CoA-Carboxylase  $\alpha$ , *FASN* = Fettsäuresynthase, *GPAM* = Glycerol-3-phosphat-Acyltransferase, mitochondrial, *SLC27A1* = SLC-Transporter für langkettige Fettsäuren, *SREBF1* = Sterol-regulatorisches-Element-bindender Transkriptionsfaktor 1, *ACADM* = Acyl-CoA-Dehydrogenase, *ACOX1* = Acyl-CoA-Oxidase 1, *CPT1A* = Carnitin- Palmitoyl-transferase 1A, *APOB* = Apolipoprotein B, *MTTP* = mikrosomales TG-Transferprotein, *CAT* = Catalase, *GPXI* = Glutathionperoxidase, *MT1A* = Metallothionein-1A, *SOD1* = Superoxid-Dismutase 1, *UGT1A1* = UDP-Glucuronosyltransferase 1 A1, *NQO1* = NAD(P)H Dehydrogenase, Quinon 1, *FGF21* = Fibroblast growth factor 21, n.s. = nicht signifikant ( $p > 0,05$ )

**Tabelle 6.14 Korrelationen (nach Pearson) zwischen Parametern der Ketogenese und FGF21 bei Holstein Kühen in Woche 1 pp. (n = 50)**

	Korrelationskoeffizient R			
	BHBA	ACAT	HMGCL	HMGCS2
<i>FGF21</i> (Genexpression)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
FGF21 (Plasmakonzentration)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

*FGF21* = Fibroblast growth factor 21, *ACAT1* = Acetyl-CoA-Acetyltransferase, *HMGCL* = 3-Hydroxymethyl-3-Methylglutaryl-CoA-Lyase, *HMGCS2* = 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-Synthase 2, BHBA = 3-Hydroxybutansäure

**Tabelle 6.15 Korrelationen (nach Pearson) zwischen der Milchleistung und den Expressionen von Genen der UPR sowie FGF21 bei Holstein Kühen in Woche 1 pp. (n = 50)**

	Korrelationskoeffizient mit p < 0,05	
	Milchleistung [kg/Tag]	Milchleistung [kg/100 Tage]
<i>ATF4</i>	n.s.	n.s.
<i>BAK1</i>	n.s.	n.s.
<i>BAX</i>	n.s.	n.s.
<i>CASP3</i>	n.s.	n.s.
<i>CASP8</i>	n.s.	n.s.
<i>CASP9</i>	n.s.	n.s.
<i>DDIT3</i>	n.s.	n.s.
<i>DNAJC3</i>	n.s.	n.s.
<i>EDEMI</i>	n.s.	n.s.
<i>HERPUD1</i>	n.s.	n.s.
<i>HSPA5</i>	n.s.	n.s.
<i>PDIA4</i>	n.s.	n.s.
<i>XBPIspl</i>	n.s.	n.s.
<i>FGF21</i> (Genexpression)	n.s.	n.s.
FGF21 (Plasmakonzentration)	n.s.	n.s.

*ATF4*= aktivierender Transkriptionsfaktor 4, *BAK1* = BCL2-Antagonist 1, *BAX* = BCL-assoziertes X-Protein, *CASP* = Caspase, *DDIT3* = DNA-Schaden-induzierendes Transkript 3, *DNAJC3* = DnaJ (Hsp40) Homolog, *EDEMI* = ER-Abbau-Enhancer, *HERPUD* = Homocystein-induzierte, ER-Stress induzierte, Ubiquitin-ähnliche Domäne 1, *PDIA4* = Protein-Disulfid-Isomerase Familie A4, *HSPA5* = Hitzeschockprotein 70 kDa Protein, *FGF21* = Fibroblast growth factor 21, *XBPIs* = X-Box bindendes Protein 1 gespleißt, NEFA = nicht veresterte freie Fettsäuren, n.s. = nicht signifikant (p > 0,05)

**Tabelle 6.16 Korrelationen (nach Pearson) zwischen der Milchleistung und den Expressionen von Nrf2-Zielgenen bei Holstein Kühen in Woche 1 pp. (n = 50)**

Korrelationskoeffizient mit p < 0,05		
	Milchleistung [kg/Tag]	Milchleistung [kg/100 Tage]
<i>CAT</i>	0,360	n.s.
<i>GPXI</i>	n.s.	n.s.
<i>MTIA1</i>	n.s.	n.s.
<i>NQO1</i>	n.s.	n.s.
<i>SOD1</i>	n.s.	n.s.
<i>UGT1A1</i>	n.s.	n.s.

*CAT* = Catalase, *GPXI* = Glutathionperoxidase, *MTIA* = Metallothionein-1A, *SOD1* = Superoxid-Dismutase 1, *UGT1A1* = UDP-Glucuronosyltransferase 1 A1, *NQO1* = NAD(P)H Dehydrogenase, Quinon 1, n.s. = nicht signifikant (p > 0,05)

**Tabelle 6.17 Korrelationen zwischen der Milchleistung und Parametern der Inflammation bei Holstein Kühen in Woche 1 pp. (n = 50)**

Korrelationskoeffizient mit p < 0,05		
<u>Genexpressionen</u>	Milchleistung [kg/Tag]	Milchleistung [kg/100 Tage]
<i>SAA</i>	n.s.	
<i>HP</i>	-0,378	-0,346
<i>CP</i>	n.s.	n.s.
<i>CRP</i>	n.s.	n.s.
<i>RBP4</i>	0,423	0,363
<i>TTR</i>	-0,298	-0,354
<i>TNF</i>	n.s.	n.s.
<i>IL1b</i>	n.s.	n.s.
<i>IL8</i>	n.s.	n.s.
<i>PTGS2</i>	n.s.	n.s.
<i>CCL2</i>	n.s.	n.s.
<i>AOAH</i>	n.s.	n.s.
<u>Plasmaparameter</u>		
Albumin	0,389	0,377
<i>SAA</i>	n.s.	n.s.
<i>RBP4</i>	n.s.	n.s.

*CP* = Ceruloplasmin, *CRP* = C-reaktives Protein, *HP* = Haptoglobin, *SAA* = Serumamyloid A, *TTR* = Transthyretin, *RBP4* = Retinol-bindendes Protein 4, *CCL2* = Chemokin-Ligand 2, *IL1B* = Interleukin 1 beta, *IL8* = Interleukin 8, *PTGS2* = Prostaglandin-Endoperoxid Synthase 2, *TNF* = Tumor-Nekrose Faktor, n.s. = nicht signifikant (p > 0,05)

**Tabelle 6.18 Korrelationen zwischen der Milchleistung und Parametern des Calcium- und Vitamin D-Stoffwechsels bei Holstein Kühen in Woche 1 pp. (n = 50)**

	<b>Korrelationskoeffizient mit p &lt; 0,05</b>						
	Calcium	Phosphat	HVD3	DHVD3	PTH	FGF23	<i>CYP2R1</i>
Milchleistung [kg/Tag]	0,477	-0,502	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Milchleistung [kg/100 Tage]	0,478	-0,551	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

FGF23 = *Fibroblast growth factor 23*, PTH = Parathormon, HVD3 = 25-Hydroxycholecalciferol, DHVD3 = 1, 25-Dihydroxycholecalciferol, *CYP2R1* = Vitamin-D<sub>3</sub>-25-Hydroxylase, NEFA = nicht veresterte freie Fettsäuren, n.s. = nicht signifikant (p > 0,05)