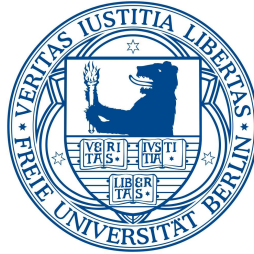


**Aus dem  
Institut für Tierpathologie  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin**



**Untersuchung der zellulären Energieversorgung und Alterung in verschiedenen  
Geweben bei Milchkühen unter Berücksichtigung der Laktation**

**Inaugural-Dissertation**  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der  
Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
**Tina Bleikamp**  
Tierärztin  
aus Stollberg

Berlin 2020  
Journal-Nr.: 4115







**Aus dem  
Institut für Tierpathologie  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin**

**Untersuchung der zellulären Energieversorgung und Alterung in verschiedenen  
Geweben bei Milchkühen unter Berücksichtigung der Laktation**

**Inaugural-Dissertation**  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der  
Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
**Tina Bleikamp**  
Tierärztin  
aus Stollberg

Berlin 2020  
Journal-Nr.: 4115

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

|                    |                                     |
|--------------------|-------------------------------------|
| Dekan:             | Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek       |
| Erster Gutachter:  | Univ.-Prof. Dr. Robert Klopffleisch |
| Zweiter Gutachter: | Univ.-Prof. Dr. Kerstin E. Müller   |
| Dritter Gutachter: | PD Dr. Christine E. Hellweg         |

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

dairy cow; lactation; energy balance; feed intake; lipolysis; animal tissues

Tag der Promotion: 24.01.2020

**Für Carsten**





|   |           |
|---|-----------|
| <b>1 Einleitung und Ziel der Arbeit</b> .....   | <b>1</b>  |
| <b>2 Literaturteil</b> .....  | <b>2</b>  |
| 2.1 Stoffwechsel der hochleistenden Milchkuh – Besonderheiten während der .....         |           |
| verschiedenen Laktationsphasen .....  | 2         |
| 2.1.1 Bedeutung des Fettgewebes bei Milchkühen.....                                     | 3         |
| 2.2 Zelluläre Energieversorgung bei Milchkühen während der Laktation .....              | 4         |
| 2.2.1 Bedeutung von Mitochondrien im Energiestoffwechsel .....                          | 5         |
| 2.2.2 Cytochrom-c-Oxidase, Citrat-Synthase und mtDNA-Kopienzahl als Biomarker für ..... |           |
| die Mitochondriendichte.....  | 7         |
| 2.2.3 Die Rolle von Mitochondrien im Zelltod.....                                       | 8         |
| 2.3 Zelluläre Alterungsprozesse .....   | 12        |
| 2.3.1 Telomere .....  | 13        |
| 2.3.1.1 Telomerlänge bei Milchkühen .....   | 16        |
| 2.3.2 DNA - Methylierung .....  | 16        |
| 2.3.2.1 altersabhängige Veränderungen.....  | 18        |
| 2.3.2.2 Aufrechterhaltung und Etablierung durch DNA-Methyltransferasen .....            | 18        |
| <b>3 Material und Methoden</b> .....  | <b>21</b> |
| 3.1 Versuch 1 .....   | 21        |
| 3.1.1 Tiere .....   | 21        |
| 3.1.2 Haltung und Fütterung .....   | 21        |
| 3.1.3 Probenentnahmen .....   | 22        |
| 3.1.4 Analyse der verschiedenen Blutparameter .....                                     | 24        |
| 3.1.5 Bestimmung der Enzymaktivitäten.....  | 26        |
| 3.1.6 Histologische Untersuchungen .....  | 26        |
| 3.1.7 mRNA-Expressionsanalysen (qPCR).....  | 27        |
| 3.1.8 DNA-Isolierung und Multiplex qPCR.....  | 30        |
| 3.1.9 Statistische Auswertung.....  | 33        |
| 3.2 Versuch 2 .....   | 35        |
| 3.2.1 Tiere .....   | 35        |
| 3.2.2 Haltung und Fütterung .....   | 35        |
| 3.2.3 Probenentnahmen .....   | 36        |
| 3.2.4 DNA-Isolierung, -Quantität und -Qualität.....                                     | 38        |
| 3.2.5 Multiplex qPCR.....   | 39        |
| 3.2.6 Statistische Auswertung.....  | 40        |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>4 Ergebnisse</b> .....  | <b>41</b> |
| 4.1 Versuch 1 .....  | 41        |
| 4.1.1 Energiebilanz und Milchmenge .....   | 41        |
| 4.1.2 Körperkonditions- und Blutparameter.....   | 43        |
| 4.1.3 Gewebs- und laktationsspezifische Unterschiede in der Anzahl der mtDNA-Kopien  | 46        |
| 4.1.4 Citrat-Synthase- und Cytochrom-c-Oxidase Aktivität im Fettgewebe .....   | 48        |
| 4.1.5 Apoptoserate im subkutanen Fettgewebe und Adipozytengröße .....  | 49        |
| 4.1.6 Gewebs- und laktationsspezifische Veränderungen der Telomerlänge und der<br>mRNA Expression der DNA-Methyltransferasen.....            | 51        |
| 4.1.7 Zusammenhänge zwischen der Apoptoserate und der zellulären Energie-<br>versorgung sowie der Zellalterung im subkutanen Fettgewebe..... | 53        |
| 4.2 Versuch 2 .....  | 56        |
| 4.2.1 Teilversuch 1: nasale Tupferproben - Kälber, Färsen und laktierende Kühe .....   | 56        |
| 4.2.2 Teilversuch 2: nasale Tupferproben – Kälber (3 Zeitpunkte).....  | 57        |
| 4.2.3 Teilversuch 3: Blut-, nasale Tupfer- und Milchproben – laktierende Kühe .....  | 59        |
| <b>5 Diskussion</b> .....  | <b>60</b> |
| 5.1 Versuch 1 .....  | 60        |
| 5.1.1 Gewebs- und laktationsspezifische Unterschiede in der Anzahl der mtDNA Kopien  | 60        |
| 5.1.2 Beeinflusst oxidativer Stress die zelluläre Energieverfügbarkeit?.....   | 64        |
| 5.1.3 Energetische Unterversorgung, Alterung und Zelltod im subkutanen Fettgewebe –<br>gibt es einen Zusammenhang?.....                      | 65        |
| 5.2 Versuch 2 .....  | 68        |
| 5.2.1 Telomerlängenbestimmung in nasalen Tupferproben .....  | 68        |
| 5.2.2 Können nichtinvasive Probenentnahmen die invasiven Blutprobenentnahmen zur<br>Telomerlängenbestimmung ersetzen?.....                   | 69        |
| <b>6 Zusammenfassung</b> .....   | <b>72</b> |
| <b>7 Summary</b> .....   | <b>74</b> |
| <b>8 Literaturverzeichnis</b> .....  | <b>76</b> |
| <b>9 Selbstständigkeitserklärung</b> .....   | <b>95</b> |

## Abkürzungsverzeichnis

Neben den Abkürzungen für Symbole der chemischen Elemente und Einheiten des Internationalen Einheitensystems sind die im Text verwendeten Abkürzungen aufgeführt:

|                |  |
|----------------|--|
| a.p.           | ante partum  |
| A.U.           | arbitrary unit   |
| Acetyl-CoA     | Acetyl-Coenzym A   |
| ADD            | ATRX-DNMT3-DNMT3L-Domäne   |
| AEC            | amino ethyl carbazol   |
| AIF            | Apoptose-induzierender Faktor  |
| AOPP/Alb.      | advanced oxidation protein products/Albumin  |
| Apaf-1         | apoptotischer Protease aktivierender Faktor 1  |
| ATP            | Adenosintriphosphat  |
| BAH            | Bromo adjacent homology Domäne   |
| Bak            | Bcl-2-assoziiertes Protein k   |
| Bax            | Bcl-2-assoziiertes Protein x   |
| Bcl-2          | B-Zell Lymphom-2   |
| BCS            | body condition score   |
| BH3            | Bclhomologie-3   |
| BHB            | $\beta$ -Hydroxybutyrat  |
| bp             | Basenpaare   |
| cDNA           | complementary DNA  |
| c-FLIP         | FLICE-ähnliches inhibitorisches Protein  |
| CGIs           | CpG-islands  |
| COX            | Cytochrom-c-Oxidase  |
| CS             | Citrat-Synthase  |
| C <sub>t</sub> | Cycle threshold  |
| CXXC           | Zn <sup>2+</sup> -bindende Domäne des Typs CXXC<br>(C: Cystein; X: beliebige Aminosäure) |
| DD             | death domain   |
| DEPPD          | N,N-diethyl-para-phenylendiamin  |
| DFG            | Deutsche Forschungsgemeinschaft  |
| DIM            | days in milk   |
| DISC           | death-inducing signaling complex   |
| DNA            | Desoxyribonukleinsäure   |
| DNMT's         | DNA-Methyltransferasen   |

## Abkürzungsverzeichnis

---

|        |   |
|--------|---|
| dROM   | derivates of reactive oxygen metabolites                |
| DTNB   | 5,5'-Dithio-2-Nitrobenzolsäure                          |
| DVG    | Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft             |
| EB     | Energiebilanz   |
| EIF3K  | eucariotic translation initiation factor 3              |
| ELISA  | Enzyme-linked Immunosorbent assay                       |
| EMD    | Emerin  |
| EndoG  | Endonuklease G  |
| F      | Forward Primer Sequenz                                  |
| FADD   | Fas-assoziierte death domain                            |
| FasL   | Fas-Ligand  |
| FL     | Frühlaktation   |
| GfE    | Gesellschaft für Ernährungsphysiologie                  |
| HEPES  | <u>H</u> ydroxyethylpiperazin- <u>E</u> thansulfonsäure |
| HRP    | horseradish peroxidase                                  |
| IAP    | Inhibitor des Apoptoseproteins                          |
| IRC    | Inter Run Calibrator                                    |
| L      | laktierend  |
| LANUV  | Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz       |
| LRP10  | lipoprotein receptor-related protein 10                 |
| 5mC    | 5-Methylcytosin   |
| ML     | mittlere Laktation                                      |
| MOMP   | mitochondrial outer membrane permeabilization           |
| mRNA   | messenger RNA   |
| mtDNA  | mitochondriale DNA                                      |
| n      | Anzahl der Tiere  |
| nDNA   | nukleäre DNA  |
| NEFA   | non esterified fatty acids                              |
| NL     | nicht laktierend  |
| NLS    | nukleäres Lokalisationssignal                           |
| n.s.   | nicht signifikant                                       |
| NTC    | no template control                                     |
| OXPHOS | oxidative Phosphorylierung                              |
| p.p.   | post partum   |
| PBD    | an PCNA bindende Domäne                                 |
| PBS    | phosphate buffered saline                               |
| POL-II | RNA Polymerase II                                       |

## Abkürzungsverzeichnis

---

|             |   |
|-------------|---|
| PWWP        | Prolin-Tryptophan-Tryptophan-Prolin-Motiv   |
| qPCR        | quantitative Polymerase-Kettenreaktion  |
| qT          | relative Menge an Telomerprodukt  |
| R           | Reverse Primer Sequenz  |
| RNA         | Ribonukleinsäure  |
| ROS         | reaktive Sauerstoffspezies  |
| rRNA        | ribosomale RNA  |
| RT          | Raumtemperatur  |
| -RT         | Ansatz ohne Reverse Transkriptase   |
| SAM         | S-Adenosyl-Methionin  |
| SEM         | standard error of means   |
| SL          | Spätlaktation   |
| Smac/DIABLO | zweiter mitochondrialer Aktivator der Caspase/direkter Inhibitor des Apoptose-bindenden Proteins mit niedrigem pI |
| TBA         | Thiobarbitursäure   |
| TBARS       | thiobarbituric acid reactive substances   |
| TK          | Trächtigkeit  |
| TL          | Telomerlänge  |
| TM          | Trockenmasse  |
| TNB         | thionitrobenzoate   |
| TNF         | Tumornekrosefaktor  |
| TNFR        | Tumornekrosefaktor-Rezeptor   |
| TRADD       | TNF-Rezeptor-assoziierte death domain   |
| tRNA        | Transfer-RNA  |
| TUNEL       | terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick-end-labeling   |
| V.          | Vena  |
| ZP          | Zeitpunkt   |



## **1 Einleitung und Ziel der Arbeit**

Hochleistende Milchkühe sind heutzutage Stoffwechsel-Spezialisten. Für Milchmengen von teilweise über 40 Litern pro Tag benötigen sie entsprechend viel Energie. Um diesen hohen, kurzfristigen Energiebedarf für die Milchproduktion zu decken, mobilisieren die Tiere mit Einsetzen der Laktation verstärkt Körperfett, was Veränderungen im Energiestoffwechsel nach sich zieht. Mitochondrien steuern als „Kraftwerke“ der Zelle die Energieversorgung und nehmen neben Stoffwechselorganen, wie dem Fettgewebe und der Leber, einen wichtigen Bestandteil im Organismus von Milchkühen ein. Sie können sich dem aktuellen Energiebedarf der Zelle anpassen und somit zu einer altersbedingten Reduzierung des Energiestoffwechsels führen. Neben den Mitochondrien nehmen auch die Telomere eine wichtige Rolle im Alterungsprozess bei Milchkühen ein.

Das erste Ziel dieser Arbeit war es daher, den Einfluss der Laktation und den damit verbundenen Auswirkungen von oxidativem Stress auf die zelluläre Energieversorgung (mitochondrialen DNA (mtDNA)-Kopienanzahl, Citrat-Synthase (CS)- und Cytochrom-c-Oxidase (COX)-Aktivität) sowie auf den Alterungsprozess (Methylierung und Telomerlänge (TL)) zu charakterisieren und zu prüfen, ob diese Prozesse dabei in einem Zusammenhang stehen. Die Untersuchungen beinhalten sowohl Unterschiede im Laktationsverlauf als auch Vergleiche zwischen den verschiedenen Geweben bei laktierenden und nicht laktierenden Kühen.

Das zweite Ziel dieser Arbeit bestand in der Fragestellung, ob sich die TL ebenso in der Nasenschleimhaut von Kühen mit zunehmendem Alter verkürzen und ob somit nichtinvasive Probenentnahmen in Form von nasalen Tupfern und Milchproben die invasiven Blutprobenentnahmen zur TL-Bestimmung ersetzen können. Um diesen Vergleich anstellen zu können, wurden die Ergebnisse aus DNA-Untersuchungen in Nasenschleimhaut-, Milch- und Blutproben von laktierenden Kühen gegenübergestellt.

## 2 Literaturteil

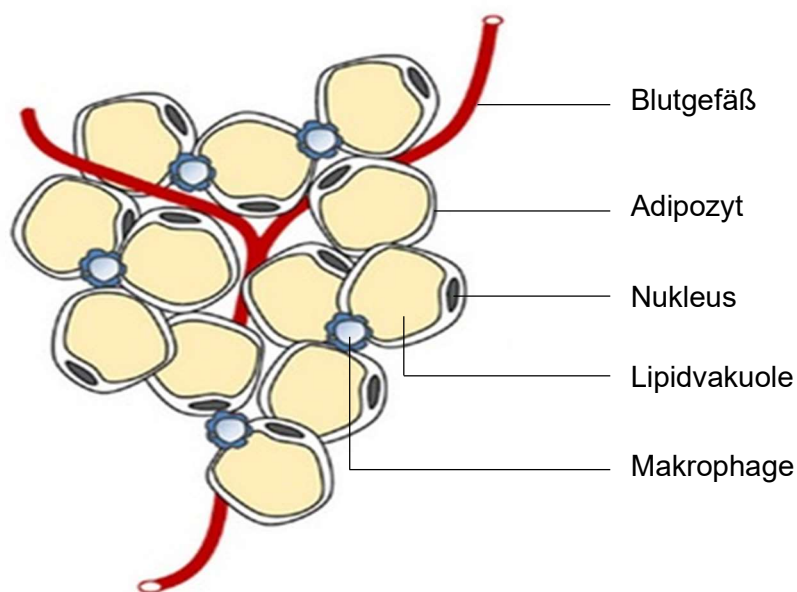
### 2.1 Stoffwechsel der hochleistenden Milchkuh – Besonderheiten während der verschiedenen Laktationsphasen

Hohe Milchleistungen sind für die meisten Betriebe ein zentrales Ziel in der Milchviehzucht. Dass Leistungssteigerungen mit einer größer werdenden Gefahr für Erkrankungen einhergehen können, zeigte Butler (2003) in seiner Studie, in der in den letzten 50 Jahren die Zunahme der Laktationsleistung von 5000 kg auf mehr als 10000 kg zu einer Reduktion der Konzeptionsrate um etwa 50 % führte. Viele dieser Erkrankungen und Stoffwechselstörungen treten verstärkt in der sogenannten Transitperiode auf, die den Zeitraum 3 Wochen vor der Geburt bis 3 Wochen nach der Abkalbung umfasst (Grummer, 1995; Drackley, 1999). Die Transitperiode stellt durch die Trächtigkeit (TK), die verminderte Futteraufnahme während der letzten Graviditätsphase, die Abkalbung sowie die einsetzende Laktogenese für Milchkühe eine große metabolische Belastung dar (Grummer, 1995). In den letzten Trächtigkeitsmonaten müssen Kühe dementsprechend wesentlich mehr Energie umsetzen als nicht tragende Tiere. Während ihr Energiebedarf für die Erhaltung und Trächtigkeit um 23 % ansteigt (Moe & Tyrrell, 1972), kommt es gleichzeitig zu einer Abnahme der Trockenmasseaufnahme um 30 % (Bertics et al., 1992; Grummer, 1995). Somit kann die nach der Kalbung (Frühlaktation; FL) benötigte Energie für die Milchsynthese nicht ausreichend über die aufgenommene Nahrung bereitgestellt werden (Moe et al., 1971), was zu einer negativen Energiebilanz (EB) führt. In der FL durchlaufen 80 % aller Milchkühe eine solche Phase der negativen EB (Domecq et al., 1997). Um das Energiedefizit auszugleichen, mobilisieren Kühe verstärkt ihre Körperfettreserven, was einen Verlust von bis zu 90 kg ihres Körperfettes ausmachen kann (Chibisa et al., 2008). Während dieser Phase der Fettmobilisierung, die auch Lipolyse genannt wird, werden nicht veresterte freie Fettsäuren (NEFA) beim Abbau von Fettgewebe in die Blutzirkulation freigesetzt. Somit stellen eine erhöhte NEFA-Konzentration im Serum (Bell, 1995), ein Anstieg der  $\beta$ -Hydroxybutyrat (BHB) Konzentration (Bell, 1995) und eine Abnahme der Körperkondition (BCS; Wildman et al., 1982; Pires et al., 2013) in der FL bei Milchkühen wichtige Hinweise für eine negative EB dar. In der Spätlaktation (SL) und Trockenstehzeit kommt es durch die sinkende Milchleistung und dem damit verbundenem Rückgang der benötigten Energie für die Milchsynthese zu einem Wiederaufbau der Fettreserven durch Einlagerung von Lipiden in die Fettzellen (Lipogenese). Die Milchkühe befinden sich zu dieser Zeit in einer positiven EB (McNamara, 1991; Kenéz et al., 2015) und durchlaufen somit in jeder Laktation einen Wechsel zwischen der Lipolyse in der FL und der Lipogenese in der SL (Lanna et al., 1995).



### 2.1.1 Bedeutung des Fettgewebes bei Milchkühen

Aus früherer Sichtweise wurde Fettgewebe lediglich als ein Energiespeicher des Körpers angesehen. Mit der Entdeckung von Leptin im Jahre 1994 wurde dem Fettgewebe eine weitere wichtige Funktion als ein komplexes, immunologisch aktives und endokrines Organ zugesagt (Zhang et al., 1994; Ahima & Flier, 2000; Kershaw & Flier, 2004). Das Fettgewebe als eine Sonderform des lockeren Bindegewebes setzt sich aus verschiedenen Zelltypen zusammen. Neben den reifen Fettzellen (Adipozyten), die den größten Anteil bilden, besteht es aus Zellen, die zu der stromal-vaskulären Fraktion gehören wie etwa Präadipozyten, Endothelzellen, Fibroblasten, Immunzellen, Blutgefäße und Makrophagen (Frayn et al., 2003; **Abbildung 1**).



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung des Fettgewebes. Verändert nach Choe et al. (2016).

Das Fettgewebe produziert und sezerniert eine Vielzahl von Signalmolekülen, die sogenannten Adipokine (wie zum Beispiel Leptin, Adiponektin, Apelin, Visfatin, Interleukin-6). Sie agieren als Botenstoffe sowohl lokal (autokrin/parakrin) als auch systemisch (endokrin) und verbinden den Stoffwechsel mit dem Immunsystem (Mancuso, 2016). Darüber hinaus beeinflussen Adipokine viele verschiedene Prozesse wie den Lipid- und Glukosestoffwechsel, das Hunger- und Sättigungsgefühl, Entzündungsprozesse, die Insulinsensitivität und die Immunabwehr (Frühbeck et al., 2001). Auch die Expression von Haptoglobin, eines der wichtigsten Akute-Phase-Proteine beim Rind, konnte sowohl im humanen Fettgewebe (Fain, 2006) als auch im Fettgewebe bei Rindern (Saremi et al., 2012) nachgewiesen werden.

Aufgrund von histologischen/morphologischen und funktionellen Merkmalen wird das Fettgewebe in zwei verschiedene Gewebearten unterteilt: braunes und weißes Fettgewebe (Ailhaud & Hauner, 2004).

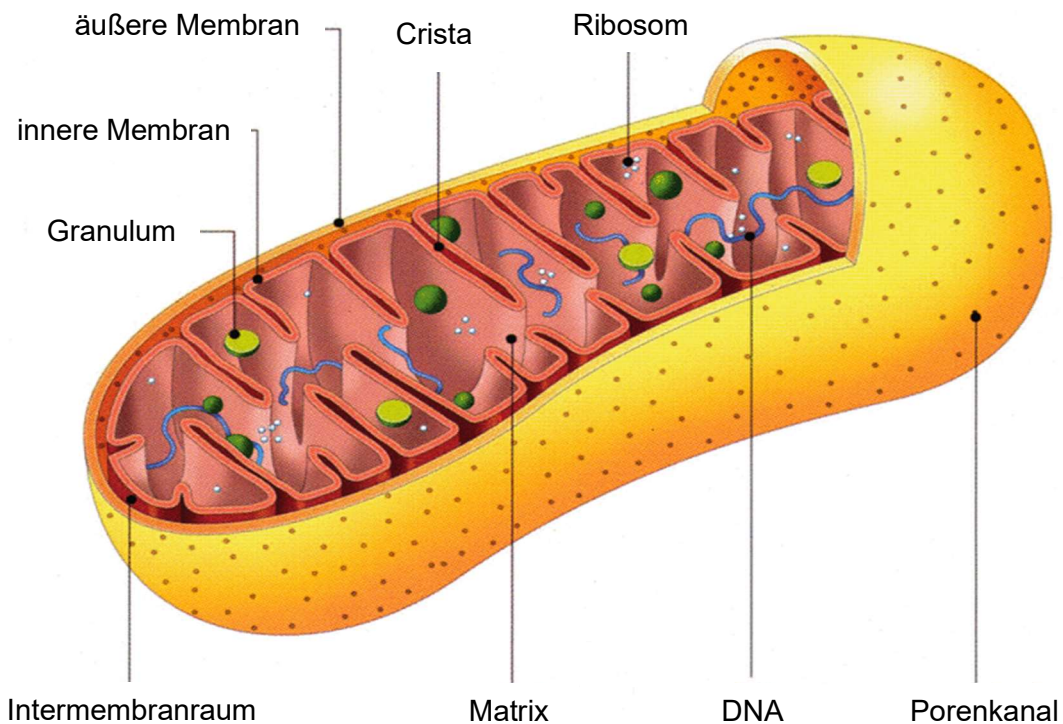
Braunes Fettgewebe besteht aus vielen kleineren Lipidtropfen (multivakuolär), ist sehr stark vaskularisiert und enthält eine auffallend hohe Anzahl an Mitochondrien. Es trägt zur direkten Erzeugung von Wärme (Thermogenese) aus dem gespeicherten Fett bei und findet sich bei allen neugeborenen Säugetieren außer beim Schwein (Berg et al., 2006; Jastroch et al., 2018). Das im Körper von Säugetieren mengenmäßig überwiegende weiße Fettgewebe besteht aus univakuolären Adipozyten, wobei die große zentrale Fettvakuole den Zellkern und andere Zellorganellen, wie Mitochondrien, an den Rand der Zelle drückt (Shen et al., 2003). Die Gesamtmasse des Fettgewebes unterliegt umwelt- und genetisch bedingten Veränderungen einerseits in Form einer Volumenänderung der Adipozyten (Hypo-/Hypertrophie) und andererseits durch eine Zu- oder Abnahme der Zellzahl (Hypo-/Hyperplasie; Spiegelman & Flier, 2001; Choe et al., 2016). Neben der Schutz- und Stützfunktion spielt das weiße Fettgewebe eine wichtige Rolle im Energiestoffwechsel und steht somit im Mittelpunkt der vorliegenden Dissertation.

### **2.2 Zelluläre Energieversorgung bei Milchkühen während der Laktation**

Nach der Kalbung erhöht sich der Nährstoffbedarf der Milchkuh drastisch, um dem erhöhten Energiebedarf für die Milchsynthese gerecht zu werden. Die vom Organismus aufgenommenen Nährstoffe wie Glucose, Aminosäuren und Fettsäuren werden verdaut, ins Blut aufgenommen, in die Zellen verteilt und dort unter Verbrauch von Sauerstoff oxidiert, um schlussendlich Speicherenergie zu produzieren. Die Oxidation von Fettsäuren wird als  $\beta$ -Oxidation bezeichnet und die Oxidation von Glucose, des am meisten verwendeten Energieträgers, als Zellatmung. Die Zellatmung läuft in vier Stufen ab (Glykolyse, oxidative Decarboxylierung, Citratzyklus und Endoxidation in der Atmungskette) und dient zum Verbrennen energiereicher Stoffe, um daraus die für das Überleben der Zellen benötigte Energie zu gewinnen. Die Energie aus den Nährstoffen wird in chemischer Form als Adenosintriphosphat (ATP) gespeichert und genutzt, um energieabhängige Prozesse wie Biosynthesen und Transportprozessen von Molekülen anzutreiben. Der größte Teil der zellulären ATPs entsteht durch die oxidative Phosphorylierung (OXPHOS) in den Mitochondrien, den Energiekraftwerken der Zelle.

### 2.2.1 Bedeutung von Mitochondrien im Energiestoffwechsel

Mitochondrien sind Zellorganellen, die von einer Doppelmembran umgeben sind und in den meisten eukaryotischen Zelltypen, außer in roten Blutkörperchen, vorkommen (Stier et al., 2013). Während die äußere Membran über Kanäle durchlässig für Moleküle ist, bildet die innere Membran zisternenförmige Einstülpungen (Cristae), in deren Membran die Enzymkomplexe der Atmungskette und die ATP-Synthase lokalisiert sind. Die Matrix, die sich im inneren Membranraum befindet, enthält unter anderem mehrere Kopien des eigenen mitochondrialen Genoms (mtDNA), das als zirkuläre und doppelsträngige DNA vorliegt (**Abbildung 2**).



**Abbildung 2:** Detaillierter Aufbau eines Mitochondriums nach <https://www.naturepower.de/vitalstoff-journal/aus-der-forschung/vitamine/coenzym-q10-zuendfunke-fuer-die-leistungskraft/>, 26. März 2018.

Mitochondrien bilden ein dynamisches Netzwerk aus verzweigten Röhren. Sie sind in der Lage, sich durch Fusion zu verbinden und sich durch Fission wieder zu teilen (Detmer & Chan, 2007). Somit können sie sich in ihrer Anzahl und Größe dem aktuellen Energiebedarf der Zelle sowie den zellulären Umweltbedingungen anpassen (Jakobs et al., 2003; Li et al., 2005).

Die Anzahl an Mitochondrien pro Zelle variiert je nach Art des Gewebes, des Zelltyps und des Energiebedarfs der Zelle (Scarpulla, 2002; Clay Montier et al., 2009), wobei Zellen mit einem hohen Energiebedarf, wie zum Beispiel Hepatozyten, ein sehr großes mitochondriales Netzwerk aufweisen (Amacher, 2005; Lindinger et al., 2010). Während die geringste Anzahl an Mitochondrien von weit unter 100 in einer humanen Spermazelle gefunden wurde (Amacher, 2005), können Rattenhepatozyten bis zu 2000 Mitochondrien aufweisen (David, 1979).

Die Energieerzeugung in Form von ATP erfolgt in den Mitochondrien über die OXPHOS in Verbindung mit dem Fettsäureabbau durch  $\beta$ -Oxidation sowie dem oxidativen Abbau von organischen Stoffen durch den Citratzyklus (Goldenthal & Marin-Garcia, 2004). Zunächst werden Elektronen und Protonen, die durch oxidativen Abbau aus den vom Organismus aufgenommenen Nährstoffen gewonnen werden, durch eine Reihe von Proteinkomplexen der Atmungskette (I - IV), die an der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert sind, geleitet. Durch diese Elektronen-Transportvorgänge und durch Anreicherung von Protonen wird zwischen dem Intermembranraum und der mitochondrialen Matrix ein Protonengradient aufgebaut (Finley & Haigis, 2009). Dieser dient dazu mit Hilfe der ATP-Synthase etwa 95% der zellulären ATP-Produktion sicherzustellen (Nadanaciva et al., 2007), welches dann ins Zytosol der Zelle abgegeben wird. Als Nebenprodukt der Atmungskette werden reaktive Sauerstoffspezies (ROS) gebildet (Wallace, 2005). Oxidativer Stress beschreibt einen Zustand des Stoffwechsels, bei dem vermehrt ROS gebildet werden und nicht genügend Antioxidantien vorhanden sind, um diese abzubauen. In niedriger, d.h. physiologischer Konzentration stellen mitochondriale ROS für den Organismus wichtige Signalmoleküle dar (Nemoto et al., 2000; Dada et al., 2003). In hohen und somit pathologischen Konzentrationen führen ROS allerdings zu oxidativen Schäden an mtDNA, Proteinen und Lipiden (Finley & Haigis, 2009). Infolgedessen kann dies zu einer Beeinträchtigung des Energiemetabolismus führen und somit Krankheiten und negative Auswirkungen unter anderem auf die Fruchtbarkeit von Kühen fördern (Miller et al., 1993; Jorritsma et al., 2003). Zusätzlich dazu, dass Mitochondrien eine wichtige Rolle im Energiestoffwechsel in vielen Geweben wie dem Herz- und Skelettmuskel, Gehirn, Leber und Fettgewebe einnehmen (Cedikova et al., 2016), regulieren sie den programmierten Zelltod (Apoptose) durch Freisetzung von Cytochrom c und anderen proapoptischen Faktoren aus den Mitochondrien in das Zytoplasma (Lenaz, 1998).

## **2.2.2 Cytochrom-c-Oxidase, Citrat-Synthase und mtDNA-Kopienzahl als Biomarker für die Mitochondriendichte**

Cytochrom c ist ein Protein in der mitochondrialen Atmungskette (Komplex III), das in den Mitochondrien bei der Energiegewinnung (OXPHOS) als Elektronentransporter eine wichtige Rolle spielt. Das Enzym COX des Komplexes IV der Atmungskette katalysiert die Oxidation von Cytochrom c und die damit verbundene Elektronenübertragung und Reduktion von Sauerstoff zu Wasser (Wong-Riley, 1989; Bertoni-Freddari et al., 2004). Die COX-Aktivität repräsentiert die maximale Effizienz des mitochondrialen Komplexes IV Sauerstoff zu verbrauchen, um mit der dabei freigesetzten Energie einen Protonenkonzentrationsgradienten zu erzeugen, der wiederum von der ATP-Synthase zur Produktion von ATP genutzt wird. Daher gilt Cytochrom c und somit die COX-Aktivität als ein guter Indikator für die Mitochondriendichte und der Produktionskapazität von ATP, da der mitochondriale Cytochrom c-Gehalt proportional zur Konzentration der Atmungskettenkomplexe ist (Bertoni-Freddari et al., 2001; Nogueira et al., 2001; Pichaud et al., 2013).

Die CS als Schlüsselenzym des Tricarbonsäurezyklus (Citratzyklus) ist in der Mitochondrienmatrix und damit in unmittelbarer Nähe zur Atmungskette lokalisiert (Pichaud et al., 2013). Folglich besteht eine enge Verbindung zwischen den oxidativen Vorgängen im Citratzyklus und der Gewinnung von energiereichen Verbindungen in der Atmungskette. Die CS katalysiert die Kondensation von Oxalacetat mit Acetyl-CoA zu Citrat. Die wichtigste Funktion des gesamten Citratzyklus besteht demnach in der Oxidation von Acetylgruppen, damit Elektronen für die Atmungskette frei werden. Der Citratzyklus trägt somit indirekt zur Synthese von ATP bei. Über die CS-Aktivität kann der zelluläre Energiestatus bestimmt werden, wodurch diese als einer der genauesten Biomarker der Mitochondriendichte angesehen wird (Larsen et al., 2012).

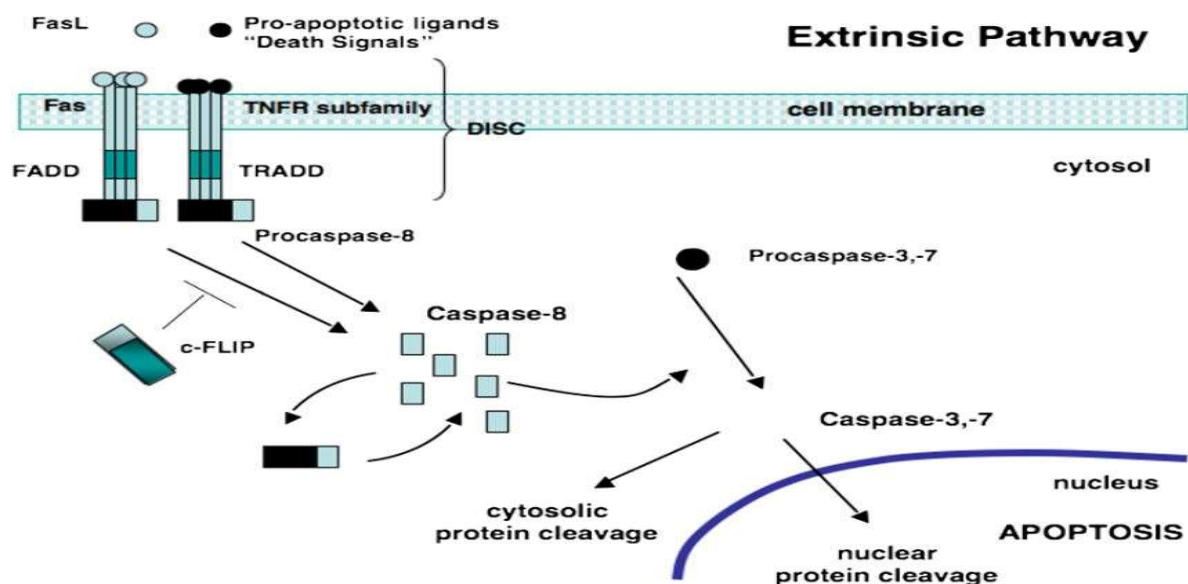
Mitochondrien enthalten ein eigenes mitochondriales Genom, die sogenannte mtDNA. Das mitochondriale Genom von Rindern besteht aus 16.338 Basenpaaren (bp; Anderson et al., 1982) und kodiert für 37 Gene: 2 rRNAs (12S und 16S rRNA) für mitochondriale Ribosomen, 22 tRNAs für die mitochondriale Proteinbiosynthese und 13 Proteine, die für Untereinheiten der Atmungsketten-Komplexe einschließlich der ATP-Synthase kodieren (Wallace & Chalkia, 2013). Im Gegensatz zum nukleären Genom (nDNA) besitzt die mtDNA eine 5 – 10-mal höhere Mutationsrate (Brown et al., 1979). Einerseits sind die DNA-Reparaturmechanismen im Vergleich zur nDNA deutlich ineffizienter (Brown et al., 1982). Andererseits besitzt die mtDNA kaum Introns, ist nicht methyliert und Histone, die schützend wirken, fehlen in der mtDNA (Groot & Kroon, 1979). Aufgrund des Mangels an Histonen und der räumlichen Nähe der mtDNA zu ROS, die in den Mitochondrien durch die Atmungskette gebildet werden, ist die mtDNA anfälliger für oxidative Schäden, die durch ROS hervorgerufen werden (Ide et al., 2001; Mandavilli et al., 2002; Passos et al., 2007).

Die mtDNA-Kopienzahl, die die Häufigkeit von Mitochondrien in einer Zelle widerspiegelt und somit als Marker für die Mitochondriendichte angesehen werden kann (Al-Kafaji & Golbahar, 2013), variiert je nach Energiebedarf und Umweltbedingungen (Lee & Wei, 2005). Diese Veränderungen im mtDNA-Gehalt stehen zudem im Zusammenhang mit oxidativem Stress, Adipositas und Alterungsprozessen in vielzähligen menschlichen Zellen und Geweben wie unter anderem in der Skelettmuskulatur (Barrientos et al., 1997a), im Gehirn (Barrientos et al., 1997b), in Leukozyten (Liu et al., 2003) und im Fettgewebe (Lindinger et al., 2010). Eine Erhöhung der mtDNA-Kopienzahl könnte eine Folge der durch oxidativen Stress hervorgerufenen mitochondrialen Schäden sowie dem Rückgang des Elektronentransports in der Atmungskette darstellen. Durch die Erhöhung der Mitochondrienzahl werden wiederum mehr ROS gebildet was folglich noch mehr oxidative Schäden an der mtDNA verursacht, den zellulären Energiestoffwechsel beeinträchtigt und schlussendlich im Zelltod endet (Ide et al., 2001; Santos et al., 2003; Passos et al., 2007).

### **2.2.3 Die Rolle von Mitochondrien im Zelltod**

Um einem unbegrenzten Wachstum von Zellpopulationen entgegen zu wirken und somit die Zellzahl auf einem konstanten Niveau zu halten, werden beschädigte, nicht mehr funktionstüchtige oder genetisch fehlerhafte Zellen gezielt entfernt. Dies geschieht einerseits über den physiologisch ablaufenden, kontrollierten Zelltod (programmierter Zelltod, Apoptose) und andererseits über einen pathologischen, unkontrollierten Zelltod, der durch eine Schädigung der Zellstruktur durch äußere Einflüsse wie Toxine, mechanische Verletzungen oder Krankheitserreger ausgelöst wird (Nekrose). Das morphologische Erscheinungsbild der Nekrose ist durch ein Anschwellen der Zellen, dem Aufreißen der Plasmamembran und der Ausschüttung des Zellinhaltes in das umliegende Medium geprägt, wodurch eine Entzündungsreaktion hervorgerufen wird (Galluzzi et al., 2007). Im Gegensatz dazu ist das morphologische Bild der Apoptose durch eine Kondensation sowohl des Zellkerns als auch des Zytoplasmas (Pyknose), der Fragmentierung des Nukleus (Karyorrhexis), der Abschnürung von Plasmamembranvesikeln und deren Aufnahme durch Phagozyten charakterisiert (Kerr et al., 1972; Taylor et al., 2008). Die Apoptose ist die häufigere Form des Zelltods und spielt bei der embryonalen Entwicklung und im Immunsystem eine wichtige Rolle. Apoptotische Signalwege in der Zelle werden durch zellulären Stress, wie zum Beispiel durch ROS hervorgerufene DNA Schäden, ausgelöst (Lenaz, 1998). Zwei wichtige Signalwege sind zum einen der extrinsische Weg, hervorgerufen über Todesrezeptoren in der Zellmembran und zum anderen der intrinsische Weg, der innerhalb der Zelle durch Mitochondrien ausgelöst wird (O'Brien & Kirby, 2008).

Der extrinsische Weg wird durch eine spezifische Ligandenbindung an einen Todesrezeptor eingeleitet. Diese sogenannten Todesrezeptoren gehören zu der Tumornekrosefaktor (TNF)-Rezeptor-Superfamilie. Zu den Bekanntesten zählen der Fas-Rezeptor und der TNF-Rezeptor 1 (TNFR1) mit den entsprechenden Liganden Fas Ligand (FasL) und TNF- $\alpha$ . Sobald drei oder mehr Todesrezeptor-Liganden-Komplexe vorliegen, rücken ihre auf der zytosolischen Seite befindenden Todesdomänen (DD; death domain) zusammen und bilden eine Bindungsstelle für ein Rezeptor-spezifisches Adapterprotein (Fas-assoziierte DD [FADD] oder TNF-Rezeptor-assoziierte DD [TRADD]). Anschließend bindet das Adapterprotein an die DD und bildet einen neuen Komplex, den sogenannten Tod-induzierenden Signalkomplex (DISC; death-inducing signaling complex). Dieser wiederum löst eine Kaskade aus, wodurch verschiedene Caspasen aktiviert werden (**Abbildung 3**; O'Brien & Kirby, 2008).



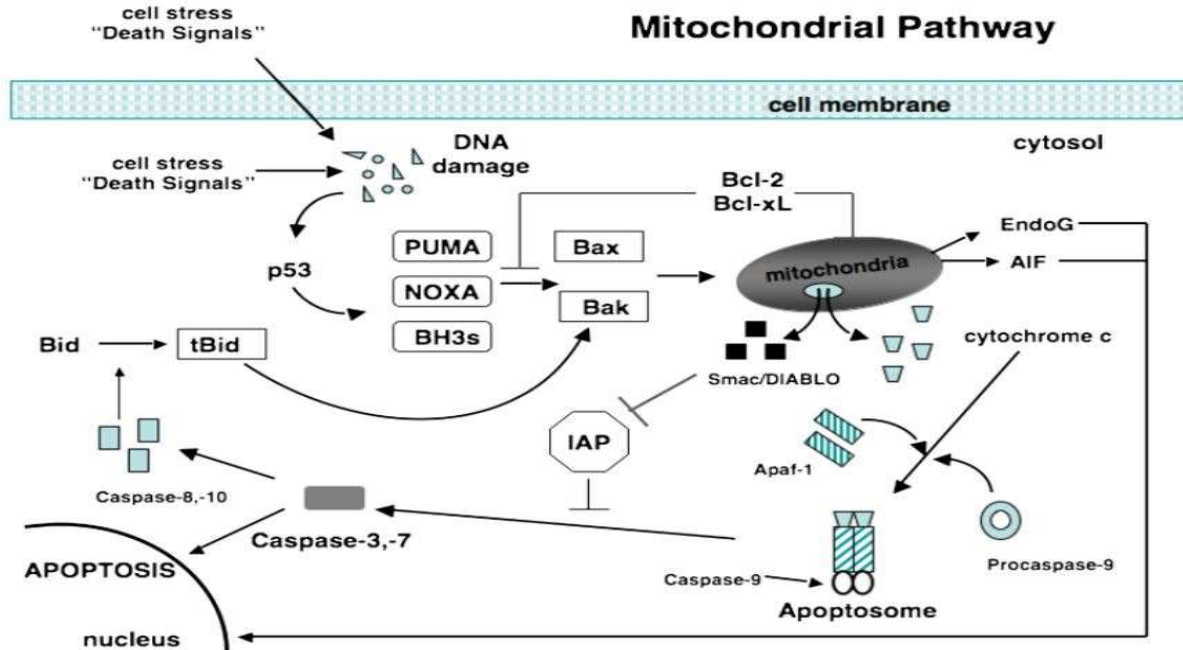
**Abbildung 3:** Darstellung des extrinsischen Signalweges. Es erfolgt eine spezifische Ligandenbindung an einen Todesrezeptor (Fas oder TNFR). Die auf der zytosolischen Seite befindlichen Todesdomänen (DD, death domain) der Todesrezeptor-Liganden-Komplexe lagern sich zusammen und bilden eine Bindungsstelle für ein Adapterprotein. Dieser Ligand-Rezeptor-Adapterprotein Komplex wird DISC genannt. Durch diesen werden wiederum verschiedene Caspasen über eine Kaskade aktiviert, was schlussendlich zur Apoptose führt (aus O'Brien & Kirby, 2008).

FasL: Fas Ligand; TNFR: Tumornekrosefaktor-Rezeptor; FADD: Fas-assoziierte Todesdomäne; TRADD: TNF-Rezeptor-assoziierte Todesdomäne; DISC: Tod-induzierender Signalkomplex; c-FLIP: FLICE-ähnliches inhibitorisches Protein

Der intrinsische Signalweg wird durch vielzählige Stressoren, wie etwa DNA-Schäden, ausgelöst. Diese wiederum aktivieren p53, einen Transkriptionsfaktor, der an die DNA bindet und die Expression, Lokalisation und Aktivität von Mitgliedern der Bcl-2 (B-Zell Lymphom-2) Familie reguliert (Vazquez et al., 2008). Die Bcl-2 Familie wird in drei funktionelle Gruppen unterteilt: die anti-apoptotische Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> Subfamilie und die beiden pro-apoptotischen Subfamilien Bax und Bak sowie BH3 (Hengartner, 2000). Alle Bcl-2 Familienmitglieder sind auf der äußeren mitochondrialen Membran lokalisiert (Minn et al., 1997). Die Aktivierung von p53 stimuliert die Expression der pro-apoptotischen Subfamilien. Diese führen durch eine erhöhte Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran (MOMP; mitochondrial outer membrane permeabilization) zur Freisetzung von apoptogenen Faktoren wie Cytochrom c (Liu et al., 1996; Shimizu & Tsujimoto, 2000) und Smac/DIABLO (Ravagnan et al., 2002) aus dem mitochondrialen Intermembranraum ins Zytosol. Cytochrom c bewirkt durch Bindung mit dem apoptotischen Protease aktivierenden Faktor 1 (Apaf-1) unter Aufwendung von ATP dessen Oligomerisierung. Dieser Apaf-1 Cytochrom c Komplex wandelt die Procaspase-9 in ihre aktive Form um, die dann zusammen das Apoptosom bilden. Die aktivierte Caspase-9 löst anschließend die Caspase-Kaskade aus und aktiviert wiederum die Effektor-Caspase 3 (**Abbildung 4**; Zou et al., 1999).

Smac/DIABLO bindet als einziges Säugetierprotein Apoptoseinhibitoren (IAP; inhibitor of apoptosis protein), macht diese dadurch funktionsunfähig und fördert somit den Apoptoseablauf (Verhagen et al., 2000).





**Abbildung 4:** Darstellung des intrinsischen Signalweges. Das durch DNA-Schäden aktivierte p53 stimuliert die Expression der pro-apoptotischen Proteine BH3 sowie Bax und Bak. Diese oligomerisieren an der Mitochondrienmembran und führen zur Freisetzung der mitochondrialen Faktoren Cytochrom c und Smac/DIABLO ins Zytosol. Cytochrom c verbindet sich mit Apaf-1 und der Procaspase-9 zum Apoptosom und Smac/DIABLO inaktiviert IAPs. Die aktivierte Caspase-9 wiederum aktiviert die Caspase-3 oder -7, was ein Voranschreiten der Apoptose zulässt. EndoG und AIF, die die Apoptose Caspase-unabhängig stimulieren, werden ebenfalls aus den Mitochondrien freigesetzt (aus O'Brien & Kirby, 2008).

Bcl-2: B-Zell Lymphom-2; Bax: Bcl-2-assoziiertes Protein x; Bak: Bcl-2-assoziiertes Protein k; BH3: Bclhomologie-3; IAP: Inhibitor des Apoptoseproteins; Apaf-1: apoptotischer Protease aktivierender Faktor 1; Smac/DIABLO: zweiter mitochondrialer Aktivator der Caspase/direkter Inhibitor des Apoptose-bindenden Proteins mit niedrigem pI; EndoG: Endonuklease G; AIF: Apoptose-induzierender Faktor

In den meisten Fällen von Zelltod kommen Signale, vor allem Stresssignale, von verschiedenen subzellulären Lokalisationen am Mitochondrium zusammen (Galluzzi et al., 2014). Dieses agiert als Kontrollzentrum und entscheidet dann, ob die Signale in Todessignale umgesetzt werden und demnach ein Todesprogramm initiiert wird oder nicht. Wenn Stresssignale überwiegen und die Homöostase nicht wiedererlangt werden kann, werden Kaskaden aktiviert, die schließlich zum Zelltod führen (Galluzzi et al., 2012). Eine solche Stresssituation kann die Laktation einer hochleistenden Milchkuh darstellen. Dass die Laktation dabei einen Einfluss auf die Apoptoserate hat, konnte bereits bei Häussler et al. (2013) gezeigt werden und soll in der vorliegenden Dissertation durch den Apoptosenachweis

im subkutanen Fettgewebe vergleichend bei laktierenden und nicht laktierenden Kühen untersucht werden.

Für den Nachweis von Apoptose gibt es viele verschiedene Methoden. Welche Methode herangezogen wird, hängt von der jeweiligen Fragestellung und der zu untersuchenden Probe ab (Willingham, 1999). Eines der charakteristischsten Ereignisse der Apoptose ist die umfangreiche Fragmentierung der nuklearen DNA, wobei eine große Anzahl an DNA-Doppelstrangbrüchen entsteht (Enari et al., 1998; Nagata, 2000). Der TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick-end-labeling) -Test, bei dem die 3'-OH Enden der DNA-Strangbrüche durch eine histochemische Farbreaktion nachgewiesen werden, stellt dabei eine der wichtigsten Methoden dar, um Apoptose in intakten Geweben nachzuweisen (Gavrieli et al., 1992; Darzynkiewicz et al., 2008) und wurde daher in der vorliegenden Dissertation angewendet. Ein Nachteil dieser Methode besteht allerdings darin, dass die nachgewiesenen DNA-Strangbrüche nicht nur in apoptotischen, sondern auch in nekrotischen Zellen vorkommen können (Grasl-Kraupp et al., 1995).

### **2.3 Zelluläre Alterungsprozesse**

Altern ist keine Krankheit und die Biologie des Alterns, die zwischen Individuen variiert, wird am Besten im Zusammenhang mit der Evolution verstanden (Aubert & Lansdorp, 2008). Altern wird definiert als ein fortschreitender, degenerativer Prozess, der durch eine Ansammlung von Schäden verursacht wird, die wiederum zu zellulärer Dysfunktion, einer abnehmenden Fruchtbarkeit und erhöhten Mortalität bis hin zu Gewebeversagen und zum Tod führen. Die Auswirkungen des Alterns können dabei vielfältig sein (Kirkwood & Austad, 2000; Kelly, 2011; Bratic & Larsson, 2013).

Es gibt unterschiedliche Theorien, die den Alterungsprozess beschreiben (Davidovic et al., 2010). Einerseits ist Altern laut traditioneller Sichtweisen keine Anpassung oder genetisch programmierte Veränderung. Andererseits lässt es sich nach modernen biologischen Theorien in zwei Kategorien einteilen: programmierte und Schadens- oder Error-Theorien. Die programmierten Theorien besagen, dass das Altern einem biologischen Zeitplan folgt, in dem Regulierungen von Änderungen in der Genexpression abhängen. Diese wirken sich wiederum auf Systeme, die für Aufrechterhaltungs-, Reparatur- und Abwehrreaktionen verantwortlich sind, aus. Bezogen auf die Schadens- oder Error-Theorien stellt das Altern eine Folge von Umwelteinflüssen auf lebende Organismen dar, die kumulative Schäden auf verschiedenen Ebenen hervorrufen (Jin, 2010).

Altern impliziert zudem „Verschleißerscheinungen“ in zwei zellulären Organellen – im Kern und im Mitochondrium.

Mit fortschreitendem Alter werden die Chromosomen zunehmend beschädigt. Normalerweise verhindern Telomere, die als Schutzkappen an den Chromosomenenden für Stabilität sorgen, solche Schäden. Wenn diese Schutzfunktion fehlt und Telomere somit altersbedingten Schäden nicht mehr entgegenwirken können, wird eine zelluläre Standardreaktion ausgelöst, die DNA-Reparaturmechanismen aktiviert. Diese wiederum stoppen unter Einbeziehung des Proteins p53 die DNA-Replikation und andere zellulär proliferativen Prozesse. Wenn diese Reparaturmechanismen fehlschlagen, kann es zu einem apoptotischen Zelltod kommen. Bei dieser Telomerverkürzungstheorie des Alterns wurde gezeigt, dass Telomere sich mit jeder nachfolgenden Zellteilung verkürzen und verkürzte Telomere wiederum p53 aktivieren, was eine weitere Zellproliferation verhindert und schlussendlich den Zelltod auslöst (Hastie et al., 1990; Lee et al., 1998; Kelly, 2011).

Auch Mitochondrien könnten beim Altern eine Rolle spielen, indem sich Mutationen zunehmend in der mitochondrialen DNA ansammeln, was wiederum zu zellulärem Energiemangel führt (Balaban et al., 2005; Wallace, 2005). Die Folgen für nicht-proliferative Zellen in Organen mit geringer Regenerationsfähigkeit wie dem Herz und Gehirn sind dabei besonders verheerend. Studien von Finley und Haigis (2009) besagen, dass die Aktivität von Master-Regulatoren der Mitochondrienzahl und -funktion mit dem Alter abnimmt und zu einer mitochondrialen Dysfunktion führt. Die Folgen dieser schwerwiegenden mitochondrialen Dysfunktion, die mit einer sinkenden ATP-Produktion, erhöhten ROS-Bildung und Ansammlung von oxidativ geschädigten Makromolekülen einhergeht, werden während des Alterns und bei altersbedingten Erkrankungen beobachtet.

Die Kommunikation zwischen dem Zellkern und den Mitochondrien ist somit für die Aufrechterhaltung der Mitochondrienaktivität essentiell, denn eine Störung dieser ist oft mit einer Alterung und altersbedingten Erkrankungen verbunden (Finley & Haigis, 2009).

In der vorliegenden Studie soll der Schwerpunkt im Bereich der zellulären Alterungsprozesse bei den Telomeren, unter Berücksichtigung der Laktation, liegen.

### **2.3.1 Telomere**

Telomere dienen in Form von Schutzkappen an den Chromosomenenden für die Stabilität der Chromosomen, schützen vor Beschädigungen und gewährleisten bei jeder Zellteilung eine zuverlässige Trennung von genetischem Material in die Tochterzellen (Zakian, 1989; Aubert & Lansdorp, 2008). Sie bestehen bei allen Wirbeltieren aus sich wiederholenden DNA-Sequenzen (TTAGGG) und enden am 3'-Ende in einem zwischen 50 und 300 Nukleotiden bestehendem G-reichen Einzelstrang, wobei die Länge der wiederholenden Sequenzen

zwischen den Chromosomen und den Spezies variiert (Moyzis et al., 1988; Lansdorp et al., 1996; Griffith et al., 1999).

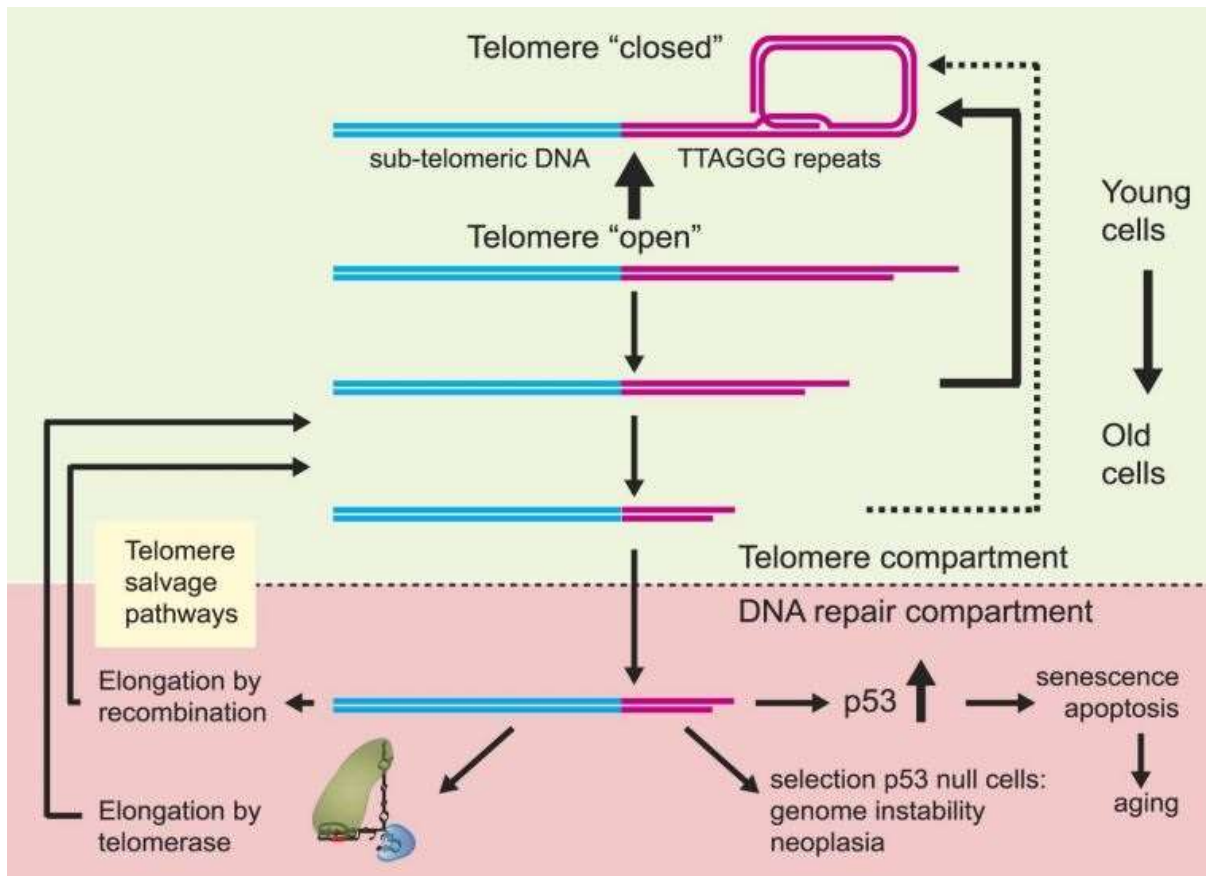
Auch wenn bereits bekannt ist, dass Telomere eine wichtige Rolle in der zellulären Antwort auf Stress und DNA-Schäden spielen, sind noch nicht alle Verbindungen zwischen Proteinen und Signalwegen, bei denen Telomere direkt oder indirekt beteiligt sind, vollständig verstanden (Aubert & Lansdorp, 2008). So ist es zum Beispiel möglich, dass Schäden an der Telomer-DNA durch ROS entweder durch funktionsgestörte Mitochondrien entstehen oder dass Signalwege (zum Beispiel eine Überexpression von Onkogenen) dazu beitragen oder prädisponierte Zellen zu Apoptose und Alterung führen (Harman, 1988; Wallace, 2005; Mooi & Peeper, 2006). Die Telomere von somatischen Zellen werden mit jeder Zellteilung und somit mit zunehmendem Alter kürzer (**Abbildung 5**), was auf das „End-Replikationsproblem“ zurückzuführen ist. Die DNA-Polymerasen können die Enden des DNA-Strangs nicht vollständig replizieren (Harley et al., 1990; Hastie et al., 1990; Counter et al., 1992).



**Abbildung 5:** Darstellung der Telomerlängenverkürzung nach <https://www.ta-65.de/telomere-telomerase/telomere-und-telomerase/>, 24. Mai 2018.

Die Verkürzung über eine kritische Länge hinaus führt zum Verlust des Telomerschutzes und induziert den zellulären Alterungsprozess (Blasco, 2005). Die Aktivierung des reversen Transkriptase Enzyms Telomerase wirkt der Telomerlängenverkürzung entgegen und verlängert somit die zelluläre Lebensdauer, indem das 3'-Ende der Chromosomen durch Hinzufügen von TTAGGG Wiederholungen verlängert wird (Blackburn, 2001; Autexier & Lue, 2006; Collins, 2006).

Telomere können zwischen einem „offenem Zustand“, der eine Verlängerung durch die Telomerase erlaubt, und einem „geschlossenem Zustand“, der für die Telomerase unzugänglich ist, wechseln. Es wird angenommen, dass der „offene Zustand“ umgekehrt proportional zur TL der Wiederholungsabfolge ist (Blackburn, 2001; **Abbildung 6**).



**Abbildung 6:** Telomere in „jungen“ Körperzellen haben viele TTAGGG-Wiederholungen (lange Telomere), die einen „geschlossenen“ Zustand, der für die DNA-Schadensreparatur und die Telomerase unzugänglich ist, begünstigen. Da die Telomerlänge jedoch an einzelnen Chromosomenenden abnimmt, sinkt somit auch die Wahrscheinlichkeit, dass die Telomere „geschlossen“ bleiben. An einem bestimmten Punkt werden die Telomere zu kurz, sodass sie nicht mehr von defekten Enden unterschieden werden können. Eine begrenzte Anzahl von kurzen Enden kann entweder durch die Telomerase oder Rekombination verlängert werden, was vom Zelltyp und den in der Zelle exprimierten Genen abhängig ist. Mit fortschreitender Zellteilung und Telomerlängenverlust sammeln sich jedoch zu viele kurze Enden an. Diese beschädigten Telomere lösen Signale aus, sodass p53 als Transkriptionsfaktor die Expression von Genen, die zur Apoptose oder Alterung führen, reguliert. Verändert nach Aubert & Lansdorp (2008).

Die Tatsache, dass sich Telomere sowohl verlängern als auch verkürzen können, lässt behaupten, dass Telomere dynamische Strukturen sind (Zakian, 1989). Das Gleichgewicht zwischen Verlängerung und Verkürzung, das die Längenverteilung von Telomeren bestimmt, wird von mehreren Faktoren beeinflusst: genetisch, entwicklungsbedingt (Blackburn, 2000) und physiologisch (von Zglinicki et al., 2000). Diese Tatsache erklärt auch, warum die TL zwischen verschiedenen Zelltypen, Spezies und Individuen gleichen Alters unterschiedlich sind (Ehrlenbach et al., 2009).

### **2.3.1.1 Telomerlänge bei Milchkühen**

Die ersten Beobachtungen, die Telomere in einen direkten Zusammenhang mit dem Altern bringen, wurden 1986 gemacht (Cooke & Smith, 1986). Auch Jeyapalan und Sedivy (2008) sowie De Meyer et al. (2008) zeigten, dass verkürzte Telomere mit dem Altern und wichtigen altersbedingten Krankheiten wie Alzheimer und Adipositas zusammenhängen. Individuen mit den längsten Ausgangs-TL im Untersuchungszeitraum zeigten die stärkste TL-Verkürzung (Ehrlenbach et al, 2009; Nordfjäll et al., 2009). Außerdem sind laut Factor-Litvak et al. (2016) weibliche Individuen von Geburt an mit längeren Telomeren ausgestattet als Männliche. Bei Laubenthal et al. (2016b) zeigten sich in verschiedenen Geweben bei Milchkühen unterschiedliche TL, wobei die TL im subkutanen Fettgewebe im Vergleich zu der in der Leber, im Blut und im Euter am größten war. Bei Tilesi et al. (2010) zeigten sich die längsten Telomere in der Leber verglichen zum Lungen- und Milzgewebe bei zwei unterschiedlichen Fleischrinderrassen (Maremmana und Chianina).

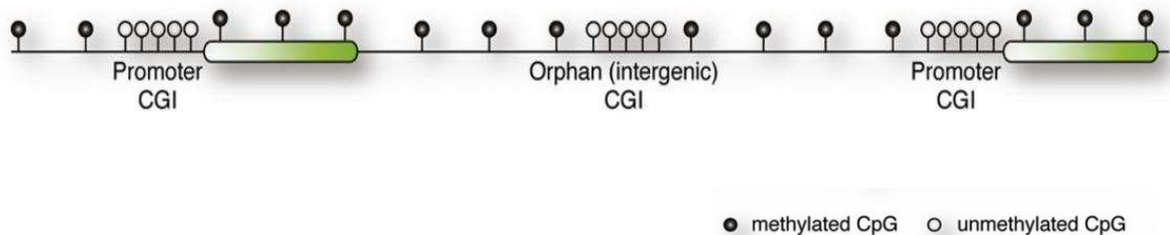
Die in der Literatur gefundenen Studien zu Telomeren und zur TL-Verkürzung beziehen sich größtenteils auf Daten aus Humanstudien. Nur wenige Studien beschäftigen sich mit der Spezies Rind und mit TL in der Nasenschleimhaut, weshalb der Schwerpunkt der vorliegenden Studie unter anderem auf diesem Gebiet gesetzt wurde.

### **2.3.2 DNA - Methylierung**

Die DNA-Methylierung ist an der Regulierung verschiedener zellulärer Prozesse, wie unter anderem der Zellalterung, beteiligt und für die Entwicklung von Säugetieren unverzichtbar. Neben den Telomeren zählt die DNA-Methylierung zu einem der wichtigsten epigenetischen Regulationsmechanismen (Pollina & Brunet, 2011; Smith & Meissner, 2013). Grundsätzlich ist das Methylierungsmuster einer Zelle beständig. Jedoch kann die DNA-Methylierung während der Entwicklung dynamisch reguliert werden. Dies erfolgt hauptsächlich durch eine zyklisch-enzymatische Kaskade, die unter anderem aus der Cytosin-Methylierung durch

DNA-Methyltransferasen besteht (Wu & Zhang, 2014). Die Methylierung der DNA, die bei Eukaryoten ausschließlich an Cytosinen abläuft (Schübeler, 2015), ist eine enzymatische Modifikation, bei der sich durch das Hinzufügen einer Methylgruppe an der C5-Position die Base 5-Methylcytosin (5mC) ergibt (Singal & Ginder, 1999; Breiling & Lyko, 2015). Bei Säugetieren erfolgt die Methylierung vorwiegend an Cytosinen, auf die ein Guanin folgt (CpG Dinukleotide) und verläuft prinzipiell bimodal (Ziller et al., 2011; Messerschmidt et al., 2014): in Regionen mit geringer CpG-Dichte sind CpGs oft methyliert (gewebsspezifische Gene, Methylierungsgrad 60-90%), wohingegen besonders CpG-reiche Regionen, die als CpG-*islands* (CGIs) bezeichnet werden, vorwiegend in unmethyliertem Zustand vorliegen (Gardiner-Garden & Frommer, 1987; Meissner et al., 2008). Dadurch entsteht der Eindruck einer global stark methylierten, aber CpG-armen genomischen Landschaft, die durch unmethylierte CpG-reiche CGIs unterbrochen wird (Deaton & Bird, 2011; **Abbildung 7**).

Global bimodal CpG and 5mC distribution



**Abbildung 7:** DNA-Methylierung im Säugetiergenom. Globale bimodale CpG-Verteilung: CpGs innerhalb der CpG-Inseln (CGIs) liegen im unmethylierten Zustand vor und finden sich an Promotoren oder intergenischen Regionen (*orphan* CGIs). CpGs außerhalb der CGIs sind hingegen im Allgemeinen methyliert. Verändert nach Messerschmidt et al. (2014).

Als CpG-Insel wird nach Takai & Jones (2002) ein DNA-Abschnitt mit einer Mindestlänge von 500 bp und einem GC-Gehalt von mindestens 55% definiert. Diese kommen in etwa 60% aller Säugetiergene vor und sind meist Bestandteil von Haushalts- oder Entwicklungsgenen.

### **2.3.2.1 altersabhängige Veränderungen**

Neben der Vielzahl von Krankheiten, die mit einer fehlerhaften Methylierung einhergehen (Robertson, 2005), können sich die DNA-Methylierungsmuster allerdings auch im Laufe des physiologischen Alterungsprozesses verändern. So ist in der Literatur von einer altersabhängigen DNA-Methylierungsdrift die Rede, die durch globale Hypomethylierungs- und lokale Hypermethylierungsereignisse charakterisiert wird (Fraga & Esteller, 2007; Jung & Pfeifer, 2015). Die Aussage von Zin'kovskaia et al. (1978), dass der 5 mC-Gehalt in der DNA von Kühen und somit die DNA-Methylierung gewebspezifisch ist und mit zunehmendem Alter deutlich abnimmt, konnte auch in der Studie von Romanov & Vanyushin (1981) bestätigt werden. Es wurde ein viel höherer 5 mC-Gehalt in Embryonen als in alten Kühen gemessen. Die DNA-Methylierung ist zu einem Markenzeichen des Alterns geworden, wobei jedoch die Schnelligkeit des Auftretens altersabhängiger Methylierungen nicht konstant ist und durch zahlreiche Faktoren wie unter anderem durch verschiedene Umwelteinflüsse und Stress beeinflusst wird (López-Otín et al., 2013; Klengel et al., 2014; Jung & Pfeifer, 2015).

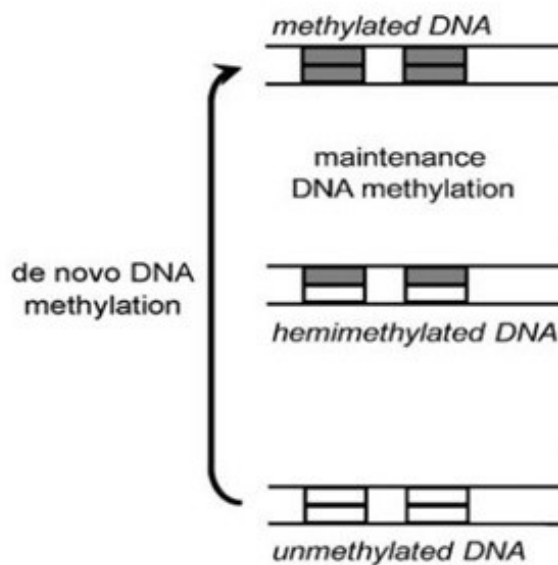
### **2.3.2.2 Aufrechterhaltung und Etablierung durch DNA-Methyltransferasen**

Die hohe Genauigkeit, mit der DNA-Methylierungsmuster in Säugetieren nach jeder Zellteilung vererbt werden, wird durch DNA-Methyltransferasen (DNMT's) sichergestellt (Fraga & Esteller, 2007). DNMT's sind Enzyme, die eine Methylgruppe von S-Adenosyl-Methionin (SAM) auf die Cytosin-Basen der DNA übertragen. Dabei kommt es generell zu einer symmetrischen Methylierung von CpG-Dinukleotiden auf beiden DNA-Strängen (Goll & Bestor, 2005). Bei Säugetieren gibt es drei aktive DNMT's: DNMT1, DNMT3a und DNMT3b, wobei die beiden letzteren nah verwandt sind und zu der DNMT3-Familie zählen (Hermann et al., 2004). Sie sind für die normale Entwicklung eines Organismus essentiell. Gendelektionen sowohl von DNMT1 als auch von DNMT3b verursachen einen enormen globalen Verlust der DNA-Methylierung, rufen schwerwiegende Defekte hervor und führen meist zu embryonaler Letalität. Mäuse mit DNMT3a-Veränderungen sterben in etwa vier Wochen nach der Geburt (Li, 1997; Okano et al., 1999; Messerschmidt et al., 2014).

Die Funktion von DNMT1 besteht hauptsächlich in der Erhaltung der Methylierung während der DNA-Replikation (Erhaltungsmethyltransferase). Dabei wird hemimethylierte DNA *in vitro* 15 bis 40-mal effizienter methyliert als unmethylierte DNA (Hermann et al., 2004). Durch die Anwesenheit von bereits methylierter DNA kann die Präferenz für hemimethylierte DNA allerdings reduziert werden. Demnach führt eine allosterische Aktivierung zu einer erhöhten Aktivität gegenüber unmethylierter DNA (Bacolla et al., 1999; Fatemi et al., 2002), weshalb



eine mögliche *de novo*-Methylierungsaktivität von DNMT1 angenommen wird (Vertino et al., 1996; Jair et al., 2006; **Abbildung 8**).



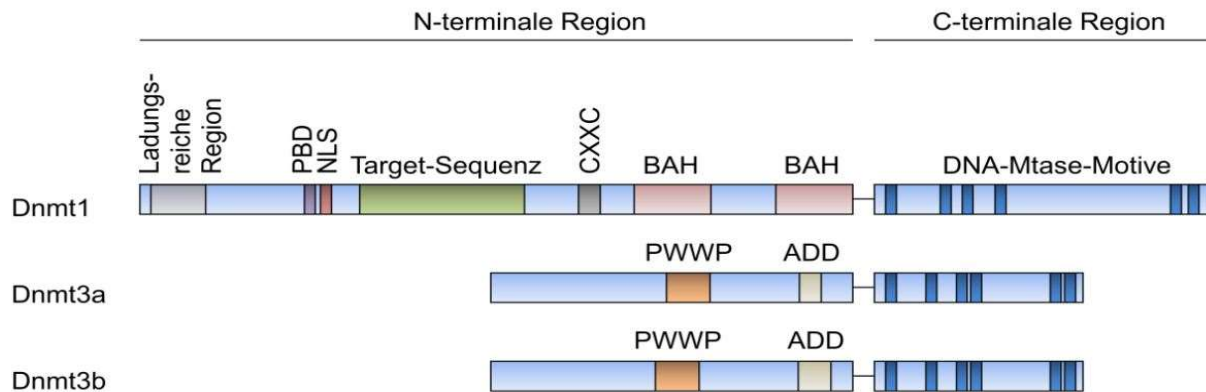
**Abbildung 8:** DNA-Methylierung in Säugetieren: unmethylierte DNA wird durch *de novo*-Methyltransferasen und hemimethylierte DNA durch Erhaltungsmethyltransferasen (Maintenance-Methyltransferasen) zu methylierter DNA umgewandelt.

Verändert nach Jurkowska et al. (2011).

DNMT1 besteht aus einer großen N-terminalen Domäne mit regulatorischer Funktion und einer katalytischen C-terminalen Domäne (**Abbildung 9**). Ausgehend von der Tatsache, dass die N-terminale Domäne essentiell für die katalytische Aktivität der DNMT1 ist, wird eine intramolekuläre Interaktion zwischen beiden Domänen, die zu einer aktiven Konformation führt, angenommen (Fatemi et al., 2001; Jurkowska et al., 2011).

Die Funktion der DNMT3-Familie besteht hauptsächlich in der Etablierung von Methylierungsmustern in der DNA (*de novo*-Methyltransferasen; Goll & Bestor, 2005; Denis et al., 2011). Trotz der zum Teil unterschiedlichen Funktionen haben sowohl DNMT3a als auch DNMT3b während der Entwicklung eines Organismus eine große Bedeutung (Okano et al., 1999; Messerschmidt et al., 2014). Obwohl beide Enzyme in die Klasse der *de novo*-Methyltransferasen eingeordnet werden, spielen sie ebenso eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der Methylierungsmuster. Es wird angenommen, dass sie durch DNMT1 ausgelassene Lücken ausbessern können (Liang et al., 2002; Jackson et al., 2004; Arand et al., 2012).

Die DNMT3-Familie besteht ebenfalls aus einer N-terminalen und einer C-terminalen Region, wobei die cysteinreiche,  $Zn^{2+}$ -bindende ADD-Domäne (ATRX-DNMT3-DNMT3L) der N-terminalen Region an Wechselwirkungen mit Proteinen beteiligt ist. Außerdem besitzen sie in ihrer N-terminalen Region noch eine PWWP-Domäne (Prolin-Tryptophan-Tryptophan-Prolin-Motiv), die an der DNA-Bindung beteiligt ist (Hermann et al., 2004; **Abbildung 9**).



**Abbildung 9:** Domänenstruktur der Säugetier-DNA-Methyltransferasen. In der Abbildung werden funktionelle Domänen der N-terminalen Region (verschieden farbig dargestellt) und konservierte Motive der katalytischen C-terminalen Domäne (dunkelblau markiert) gezeigt. Verändert nach Jurkowska et al. (2011).

PBD: an PCNA bindende Domäne; NLS: nukleäres Lokalisationssignal; Target-Sequenz: mit Replikationsfoci interagierende Region; CXXC: Zn<sup>2+</sup>-bindende Domäne des Typs CXXC (C: Cystein; X: beliebige Aminosäure); BAH: Bromo adjacent homology Domäne; PWWP: Domäne mit konserviertem Prolin-Tryptophan-Tryptophan-Prolin-Motiv; ADD: ATRX-DNMT3-DNMT3L-Domäne; DNA-Mtase-Motive: DNA-Methyltransferase-Motive

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Methylierung von CpG-Dinukleotiden in Säugetieren von drei aktiven DNA-Methyltransferasen katalysiert wird. DNMT1 ist dabei vorrangig für die Erhaltungsmethylierung, die DNMT3-Familie für die *de novo*-Methylierung verantwortlich.

Dass Stress zu Veränderungen des Epigenoms führen und sich somit negativ auf die DNA-Methylierung auswirken kann, wurde in zahlreichen Studien belegt (Weaver et al., 2004; Roth et al., 2009). Ob Stress in Form einer Laktation bei Milchkühen auch die DNA-Methylierung beeinflusst, soll in der vorliegenden Arbeit untersucht werden.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Versuch 1

##### 3.1.1 Tiere

Für die Untersuchungen standen in der Lehr- und Forschungsstation Frankenforst, der Landwirtschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn in Königswinter, 16 Färsen der Rasse Deutsche Holstein zur Verfügung. Die Probenentnahme an diesen Tieren erfolgte im Rahmen des durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) geförderten Antrages „Untersuchungen zum Alterungsprozess sowie der zellulären Energieversorgung bei hochleistenden Milchkühen“ (HA6026/3-1). Der Versuch wurde von der zuständigen Behörde, dem Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz (LANUV) Nordrhein-Westfalen in Recklinghausen, genehmigt (Aktenzeichen 84-02.05.20.12.160).

In Versuch 1 wurden **tragende Färsen** (n=8; nachfolgend als **laktierende Gruppe** bezeichnet) über einen Zeitraum von zwei Laktationen (TK; 1. FL; 1. SL und 2. FL) mit einer Kontrollgruppe, bestehend aus gleichaltrigen, **nicht tragenden Färsen** (n=8; nachfolgend als **nicht laktierende Kontrollgruppe** bezeichnet) verglichen.

##### 3.1.2 Haltung und Fütterung

Die nicht laktierende Kontrollgruppe war in einem separaten Laufstall untergebracht. Da bei diesen Tieren die Leistung für Trächtigkeit und Laktation wegfiel, betrug der Energiebedarf 38,4 MJ NE<sub>L</sub>/Tag und war somit deutlich niedriger als der Bedarf der laktierenden Gruppe (128,6 MJ NE<sub>L</sub>/Tag). Um eine Überkonditionierung der nicht laktierenden Kontrolltiere zu verhindern, wurden sie knapp über dem Erhaltungsbedarf gefüttert. Sie hatten von Mai bis Oktober Zugang zur Weide und erhielten während der Wintermonate eine Stroh-Gras-Silage (50:50; 6,05 – 6,19 MJ NE<sub>L</sub>/kg TM), die *ad libitum* zur Verfügung stand.

Die laktierende Gruppe wurde in einem Liegeboxenlaufstall gehalten, zweimal täglich gemolken und hatte in den Sommermonaten ebenfalls Zugang zur Weide. Die Fütterung der laktierenden Tiere erfolgte gemäß den Empfehlungen der Gesellschaft für Ernährungsphysiologie (GfE, 2001) mit einer partiellen Mischration (6,3 – 6,8 MJ NE<sub>L</sub>/kg TM), die *ad libitum* angeboten wurde. Zusätzlich bekamen diese Tiere Kraftfutter (7,7 MJ NE<sub>L</sub>/kg TM) abhängig von der individuellen Milchleistung des jeweiligen Tieres.

Zur Errechnung der Nettoenergiebilanz wurde die Summe aus dem täglichen Erhaltungsbedarf ( $NE_M$ ; GfE, 2001) und dem täglichen Energiebedarf für die Milchleistung ( $NE_L$ ; Tyrrell & Reid, 1965) von der täglichen Energieaufnahme subtrahiert, wobei der Fett- (4%) und Proteingehalt (3,4%) der Milch bekannt war (GfE, 1991).

**Nettoenergiebilanz (MJ  $NE_L$ /Tag) =**

**Energieaufnahme (MJ  $NE_L$ /Tag) - [ $NE_M$  (MJ  $NE_L$ /Tag) +  $NE_L$  (MJ  $NE_L$ /Tag)]**

$NE_M$  (MJ  $NE_L$ /Tag) = 0,293 x kg Lebendmasse<sup>0,75</sup>

$NE_L$  = Energiegehalt der Milch (MJ  $NE_L$ /kg) x Milchmenge (kg/Tag)

Energiegehalt der Milch (MJ  $NE_L$ /kg) = 0,38 x 4% (Fett) + 0,21 x 3,4% (Protein) + 0,95

Das Körpergewicht (kg), die Futteraufnahme (kg) und die Milchmenge (kg) wurden täglich erfasst. Die Körperkonditionsbeurteilung (BCS, gemäß dem 5-Punkte System von Edmonson et al. (1989)) hingegen fand nur am Tag der Biopsie statt. Für die Berechnung der EB und der Milchmenge wurden die Wochenmittelwerte herangezogen.

### 3.1.3 Probenentnahmen

Über einen Zeitraum von zwei Laktationen wurden Biopsien aus dem subkutanen Fettgewebe im Bereich des Schwanzansatzes und der Leber entnommen (**Abbildung 10**). Die 1. Biopsie erfolgte in der frühen TK (209 – 224 Tage vor der ersten Geburt), die 2. Biopsie in der 1. FL (14 – 38 Tage nach der ersten Geburt), die 3. Biopsie in der 1. SL (230 – 260 Tage nach der ersten Geburt) und die 4. Biopsie in der 2. FL (22 – 34 Tage nach der zweiten Geburt).

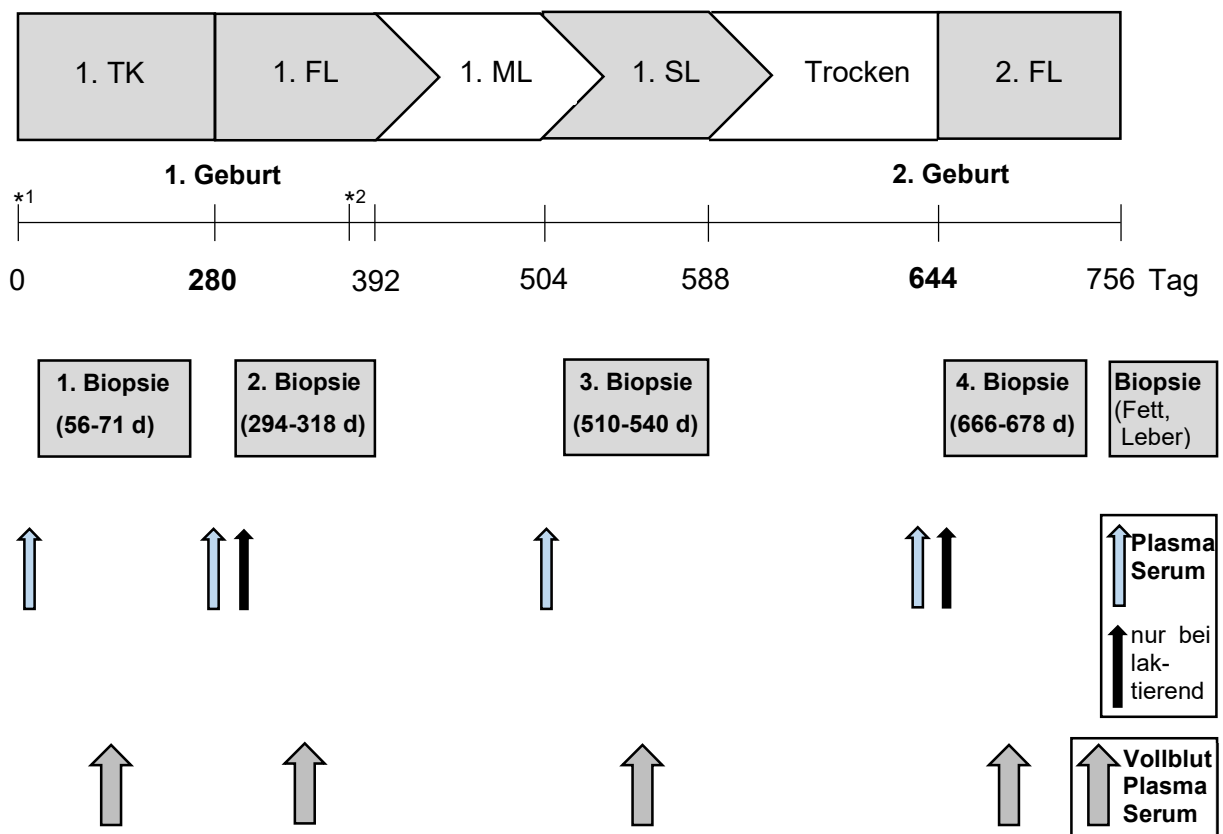
Dabei wurden die Biopsien sowohl bei den laktierenden Tieren als auch bei den jeweilig gleichaltrigen, nicht laktierenden Partnertieren zum selben Zeitpunkt durchgeführt.

Gleichzeitig wurde zwei Wochen vor und am Tag der Biopsie eine Blutentnahme aus der *V. jugularis* bei beiden Tiergruppen durchgeführt. Zusätzlich wurden bei den laktierenden Tieren in der FL, eine Woche vor der Biopsie, Blutproben gezogen.

Am Tag der Gewebeentnahme wurden insgesamt je 3 Röhrchen pro Tier (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) zu je 15 mL Blut entnommen. Von diesen 3 Röhrchen wurden 2 mit je 16  $\mu$ L Heparin (Biochrom, Berlin, Deutschland) befüllt. Das erste wurde verwendet, um die Heparin-Plasmaprobe und das zweite um die Heparin-Vollblutprobe zu gewinnen.

Das dritte Röhrchen enthielt keinen zusätzlichen Wirkstoff und wurde verwendet, um die Serumprobe zu gewinnen.

Bei den anderen beiden Blutentnahmen (2 Wochen vor der Biopsie bei laktierend und nicht laktierend; 1 Woche vor der Biopsie nur bei laktierend) wurden insgesamt nur je 2 Röhrchen pro Tier zu je 15 mL Blut entnommen: ein Röhrchen für die Heparin-Plasmaprobe und ein Röhrchen für die Serumprobe. Auf die Heparin-Vollblutprobe wurde verzichtet.



**Abbildung 10:** Probenentnahme bei der laktierenden Gruppe (n = 8) und der nicht laktierenden Kontrollgruppe (n = 8) über einen Zeitraum von zwei Laktationen (1. TK bis 2. FL).

TK: Trächtigkeit; FL: Frühlaktation; ML: mittlere Laktation; SL: Spätlaktation

\*1: 1. Besamung (d = 0); \*2: 2. Besamung (d = 364)

Um die Heparin-Plasma- und Serumproben aus den entnommenen Blutproben zu gewinnen, wurden diese im Labor zentrifugiert (15 Minuten, 3.000 x g, 4°C) und bei -80°C bis zur weiteren Analyse gelagert. Aus den Heparin-Vollblutproben wurde zusätzlich die DNA isoliert (3.1.8) und anschließend bei -20°C gelagert.

Vor jeder Biopsie bekamen die Tiere zunächst eine milde, zentrale Sedation über die Schwanzvene (1 mL Xylazin, 2%, Serumwerk Bernburg AG, Deutschland). Danach erfolgte eine gründliche Reinigung, Rasur und Desinfektion mit 70 -%igem Ethanol (Medite, Burgdorf, Deutschland) der jeweiligen Biopsiestelle. Diese wurde dann lokal subkutan mit Lidocainhydrochlorid unterspritzt und somit lokal anästhesiert (Leber: 10 mL; subkutanes Fettgewebe: 20 mL; 2%; Bela-Pharm GmbH & Co. KG, Vechta, Deutschland).

Bei der Leberbiopsie erfolgte zunächst auf der rechten Seite des Tieres im Bereich des zehnten Interkostalraumes mit dem Skalpell ein circa 0,5 cm langer Schnitt durch die Haut. Mit Hilfe der 12 g x 20 cm langen Core Tissue Biopsienadel (BARD MAGNUM, Covington, GA, USA) und unter Verwendung eines automatischen Bard®Magnum®Biopsiegerätes (BARD MAGNUM) wurden insgesamt ca. 60 – 80 mg Lebergewebe gewonnen.

Bei der subkutanen Fettgewebsbiopsie wurde die Haut zunächst auf einer Länge von 5 cm im Bereich des Schwanzansatzes inzidiert, anschließend vom darunterliegenden Fettgewebe insgesamt ca. 5 g entnommen und danach die Wunde mit U – Heften verschlossen. Die Entnahme der Fettgewebeproben fand alternierend auf der rechten und der linken Seite des Schwanzansatzes statt.

Alle biopsierten Stellen am Tier wurden nach der jeweils durchgeführten Biopsie mit einem Oxytetracyclin-Hydrochlorid-Spray (Blauspray; Intervet Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) behandelt. Die entnommenen Gewebeproben wurden direkt nach jeder Biopsie mit steriler Kochsalzlösung gespült, unverzüglich in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zur weiteren Analyse gelagert.

### **3.1.4 Analyse der verschiedenen Blutparameter**

Die nicht-veresterten Fettsäure- (non esterified fatty acids, NEFA),  $\beta$ -Hydroxybutyrat- (BHB) und Albumin-Konzentrationen wurden im Serum photometrisch mittels vollautomatischem klinisch chemischem Analyser (Eurolyser CCA180, Eurolab, Hallein, Österreich) bestimmt. Die Messungen erfolgten in Braunschweig am Friedrich-Löffler-Institut durch die Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Dr. S. Dänicke.

Die Konzentrationen der beiden Fettgewebshormone Adiponektin und Leptin sowie Haptoglobin (Entzündungsparameter) und Progesteron wurden in den Plasmaproben mittels hauseigener, etablierter ELISAs (Sauerwein et al., 2004, 2006; Hiss et al., 2009; Mielenz et al., 2013) nachgewiesen.

Die oxidativen Stressparameter der Derivate reaktiver Sauerstoffmetaboliten (derivates of reactive oxygen metabolites, dROM), Thiobarbitursäurereaktive Substanzen (thiobarbituric acid reactive substances, TBARS) und Produkte fortgeschrittener Proteinoxidation (advanced oxidation protein products, AOPP) wurden in den Serumproben bestimmt.

Bei dem dROM Test wurde die Menge an Hydroperoxiden (Trotti et al., 2001) entsprechend dem abgeänderten Protokoll von Regenhard et al. (2014) gemessen. Dieser spektrophotometrische Test nutzt dabei N,N-diethyl-para-phenylendiamin (DEPPD) als chromogenes Substrat (Alberti et al., 2000). Alkoxy- und Peroxyreste, die beim Abbau von Hydroperoxiden durch Übergangsmetallionen in sauren Medien entstehen, können Substrate wie DEPPD zu den entsprechenden Kationen (DEPPD<sup>+</sup>) umwandeln, welches bei einer Wellenlänge von 505 nm im Spektrophotometer (Genesys 10 UV, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) gemessen wurde. Die Farbintensität des entstandenen Produkts stand in direktem Verhältnis zur Menge an Hydroperoxiden in der Probe. Es wurde Wasserstoffperoxid (30 %ige Stammlösung; Carl ROTH®, Karlsruhe, Deutschland) eingesetzt, um eine Standardkurve aus 5 Standardpunkten zu erstellen, wobei der Blank (Blindwert, Nullprobe) aus Natriumacetat-Puffer (pH 5,0; AppliChem, Darmstadt, Deutschland) und Chromogenlösung (Merck, Darmstadt, Deutschland) bestand. Die Ergebnisse sind in der Einheit  $\mu\text{g H}_2\text{O}_2/\text{mL}$  angegeben.

Die Bildung von Lipidperoxiden wurde mit Hilfe eines biochemischen Testkits für TBARS (BioAssay Systems, Hayward, CA, USA) laut Herstellerprotokoll gemessen. Dabei wurden 100  $\mu\text{L}$  Serum mit 200  $\mu\text{L}$  Trichloressigsäure (10%, Carl ROTH®) gemischt, für 5 Minuten auf Eis inkubiert und bei 18.000 x g für 6 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Es dienten fünf Verdünnungen von Malondialdehyd in bidestilliertem Wasser (2  $\mu\text{M}$  bis 0,125  $\mu\text{M}$ ) als Standardkurve. Durch die Zugabe von 200  $\mu\text{L}$  Thiobarbitursäure (TBA) zu den Proben und Standards und 60-minütiger Erhitzung bei 100°C entstand ein pinkfarbenedes Produkt. Die Farbintensität steht in direktem Verhältnis zur TBARS-Konzentration der Probe. Diese wurde bei einer Wellenlänge von 515/535 nm durch ein Photometer (Synergy H1; BioTek, Winooski, VT, USA) gemessen.

AOPP wurde nach modifizierter spektrophotometrischer Methode von Witko-Sarsat et al. (1998) und Celi et al. (2011) bestimmt. Es wurden fünf Verdünnungen (6,25 bis 100  $\mu\text{M}$ ) von Chloramin-T (Sigma-Aldrich, St.Louis (Missouri); USA) in PBS (pH 7,3; phosphate buffered saline) genutzt, um daraus eine Standardkurve zu erstellen. Als Blank wurde PBS ohne Chloramin-T eingesetzt. Die Proben und Standards wurden mit 40  $\mu\text{L}$  reiner Essigsäure (Carl ROTH®) für 5 Minuten bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Zusätzlich wurde den Standards noch 20  $\mu\text{L}$  Kaliumjodid (Sigma-Aldrich) hinzugefügt. Bei einer Wellenlänge von 340 nm wurde die Absorption spektrometrisch (Synergy H1; BioTek) gemessen. Die AOPP-Konzentration wurde auf die Albumin-Konzentration bezogen und in der Einheit  $\mu\text{mol/g}$  dargestellt. Dabei wurde die Albumin-Konzentration mittels vollautomatischem klinisch chemischem Analyser bestimmt (Eurolyser CCA180, Eurolab).

### 3.1.5 Bestimmung der Enzymaktivitäten

Für die enzymatischen Untersuchungen wurden Fettgewebsextrakte hergestellt, indem die Biopsieproben des subkutanen Fettgewebes zunächst in HEPES Puffer [Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure-Puffer; 10 mM; pH 7,4 inklusive komplettem Protease-Inhibitor-Cocktail (1 Tablette/10 mL Puffer; Roche, Mannheim, Deutschland)] homogenisiert wurden. Dies erfolgte mit Hilfe eines Homogenisators (Precellys 24, Peqlab, Erlangen, Deutschland). Danach wurden die Homogenate zentrifugiert (zweimal bei 14.000 x g, 10 Minuten, 4°C) und die Fettschicht entfernt. In den Fettgewebsextrakten wurden nun die Aktivitäten von CS (Kit CS0720; Sigma-Aldrich) und COX (Kit CYTOCOX1; Sigma-Aldrich), wie bei Laubenthal et al. (2016a) beschrieben, bestimmt. Das Gesamtprotein wurde in den Fettgewebsextrakten mit Hilfe eines Bradford-Assays bestimmt (Roti®-Nanoquant K880, Carl ROTH®). Für beide Messungen wurden je Probe 1,37 µg Protein eingesetzt. Die Messung der CS- und COX- Aktivität erfolgte in einer Dreifachbestimmung (Triplikat). Die Bildung von Citrat durch eine CS katalysierte Reaktion von Oxalacetat und Acetyl-CoA führt zur Abspaltung von Coenzym-A (CoA-SH). CoA-SH reagiert mit 5,5'-Dithio-2-Nitrobenzolsäure (DTNB), was zur Bildung von TNB (Thionitrobenzoate) führt, wodurch ein gelber Farbstoff entsteht. Die damit verbundene Absorptionsänderung, die zu einem linearen Anstieg, proportional zu der enzymatischen Aktivität der CS, führte, wurde alle 15 Sekunden für insgesamt 3 Minuten spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 412 nm (28°C) mit Hilfe eines Photometers (Synergy H1, BioTek) laut Herstellerangaben gemessen. Die Enzymaktivität wird dadurch definiert, wieviel Substrat in einem bestimmten Zeitraum umgesetzt wird und wurde auf Grundlage des Lambert-Beer'schen-Gesetzes berechnet.

Das Enzym COX überträgt Elektronen auf molekularen Sauerstoff, die es vom Cytochrom c übernimmt. Diese Oxidation von Cytochrom c wurde bei einer Wellenlänge von 550 nm (25°C) ebenfalls alle 15 Sekunden für insgesamt 3 Minuten mit Hilfe eines Photometers (Synergy H1, BioTek) laut Herstellerangaben gemessen.

Als Positiv-Kontrolle wurden anstelle der Fettgewebsextrakte die Enzyme CS und COX eingesetzt. Bei der Negativ-Kontrolle wurde die Probe durch bidestilliertes Wasser ersetzt. Die Enzymaktivitäten sind in nmol/min/mg Protein angegeben.

### 3.1.6 Histologische Untersuchungen

Die Biopsieproben des subkutanen Fettgewebes wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Anschließend wurden mit Hilfe eines Kryostats (Leica CM 3050S; Leica Mikrosysteme, Wetzlar, Deutschland) 12 µm dicke Schnitte von den Fettgewebsproben angefertigt und unmittelbar danach auf Superfrost®Plus Objektträger (Menzel, Braunschweig, Deutschland) überführt. Diese Gefrierschnitte wurden auf



apoptotische Zellen unter Durchführung des modifizierten terminal deoxynucleotide transferase-mediated dUTP nick-end-labeling (TUNEL) Tests (Gavrieli et al., 1992), wie auch schon in Häussler et al. (2013) beschrieben, untersucht. Als Positiv- und Negativkontrollen dienten Schlachthofproben von Rinderplazenta.

Die Schnitte wurden bei 200-facher Vergrößerung am Lichtmikroskop (Leica DMLB, Leica Mikrosysteme), welches mit einer digitalen JVC-Farbkamera KY-F75U ausgestattet (Hachioji Plant of Victor Company, Tokio, Japan) und an einen Computer angeschlossen war, aufgenommen und gespeichert.

Pro Fettgewebsprobe wurden 10 Fotos (Größe pro Foto: 350 x 450  $\mu\text{m}$ ), die zufällig ausgewählt wurden, aufgenommen, anhand derer jeweils die Anzahl an positiven, rot gefärbten Zellkernen sowie die Gesamtzahl an Adipozyten gezählt wurden. Die Farbreaktion wurde durch die von der Meerrettichperoxidase (HRP, horseradish peroxidase) des Streptavidin-Komplexes (Biozol, Eching, Deutschland) katalysierte Oxidation des Chromogens AEC (amino ethyl carbazol, Biozol) hervorgerufen.

Die Ergebnisse wurden als durchschnittliche Prozentzahl apoptotisch positiver Zellen pro Gesamtadipozytenzahl dargestellt.

Die Adipozytengröße wurde von 100 zufällig ausgewählten Adipozyten pro Fettgewebsprobe, wie auch schon bei Akter et al. (2011) beschrieben, bestimmt. Die Adipozytengrößen wurden mit Hilfe der DISKUS Software vermessen (4. Version; Hilgers, Königswinter, Deutschland), danach gemittelt und in der Einheit Quadratmikrometer ( $\mu\text{m}^2$ ) angegeben.

### **3.1.7 mRNA-Expressionsanalysen (qPCR)**

Die Isolierung der Gesamt-RNA und die anschließende cDNA-Synthese der bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagerten Fettgewebs- und Leberproben wurden gemäß Saremi et al. (2012) durchgeführt.

Als Zielgene werden die Gene bezeichnet, deren mRNA-Expression in diesen Untersuchungen mittels quantitativer PCR (qPCR) gemessen wurden. Dazu zählten die Erhaltungsmethyltransferase DNMT1 (DNA-Methyltransferase 1) und die *de-novo* Methyltransferase DNMT3a für Fett- und Lebergewebe (Golding et al., 2011). Referenzgene dienen als Bezugsgröße der indirekten Quantifizierung des Transkriptionsniveaus der Zielgene. Diese müssen im Probenmaterial gleichbleibend exprimiert sein, unabhängig vom Probenentnahmezeitpunkt oder vom Laktationsstatus der Kuh. Die Auswahl der stabilsten Referenzgene für die verschiedenen Gewebe (Muráni et al., 2007; Kadegowda et al., 2009; Hosseini et al., 2010) erfolgte nach durchgeführter qPCR mit Hilfe von qBASE<sup>plus</sup> 2.0 (Biogazelle, Gent, Belgien). In der vorliegenden Arbeit galten POL-II (RNA Polymerase II), EMD (Emerin) und LRP10 (lipoprotein receptor-related protein 10) als stabilste Referenzgene

für die Fettgewebsproben, EMD und EIF3K (eucariotic translation initiation factor 3) für die Leberproben.

Die Quantifizierung der mRNA-Expression der Ziel- und Referenzgene erfolgte mittels qPCR in einem Mx3000P Cycler (Agilent Technologies, CA, USA) mit SYBRGreen® (ThermoFisher Scientific) als Doppelstrang-DNA-spezifischem Fluoreszenzfarbstoff.

Die Primer und die PCR-Bedingungen sind in **Tabelle 1** aufgeführt.

**Tabelle 1:** Primer für die qPCR

| Name          | Zugangsnummer  | Primer Sequenz [5'-3']                                  | Fragmentlänge (bp) | Annea-ling (°C) | Zyklen |
|---------------|----------------|---|--------------------|-----------------|--------|
| <b>POL-II</b> | X63564         | F = GAAGGGGGAGAGACAAACTG<br>R = GGGAGGAAGAAGAAAAGGG     | 86                 | 60              | 36     |
| <b>EMD</b>    | NM_203361      | F = GCCCTCAGCTTCACTCTCAGA<br>R = GAGGCGTTCCCGATCCTT     | 100                | 59              | 40     |
| <b>LRP10</b>  | Bc149232       | F = CCAGAGGATGAGGACGATGT<br>R = ATAGGGTTGCTGTCCCTGTG    | 139                | 61              | 33     |
| <b>EIF3K</b>  | NM_001034489   | F = CCAGGCCACCAAGAAGAA<br>R = TTATACCTTCCAGGAGGTCCATGT  | 125                | 59              | 40     |
| <b>DNMT1</b>  | NM_182651.2    | F = TGA CTCCACCTACGAAGACC<br>R = TCTCTACTTGCTCCACCACG   | 128                | 61              | 40     |
| <b>DNMT3a</b> | NM_001206502.1 | F = CAACGGAGAAGCCTAAGGTCAA<br>R = TTGAGGCTCCCACAAGAGATG | 121                | 62              | 40     |

F: Forward Primer Sequenz; R: Reverse Primer Sequenz; bp: Basenpaare; POL-II: RNA Polymerase II; EMD: Emerin; LRP10: lipoprotein receptor-related protein 10; EIF3K: eucariotic translation initiation factor 3; DNMT1: DNA-Methyltransferase 1; DNMT3a: DNA-Methyltransferase 3a

Jede Reaktion wurde mit einem Gesamtvolumen von 10 µL durchgeführt, welche sich aus 2 µL 1:4 verdünnter cDNA-Probe (außer bei DNMT1, dort 3 µL) und dem „MasterMix“, bestehend aus 1 µL spezifischem Primermix (gleiche Anteile Forward und Reverse Primer, 4000 nM für alle Primer außer POL-II (8000 nM) und DNMT3a (10.000 nM)), 5 µL SYBRGreen® (ThermoFisher Scientific) und 2 µL (bei DNMT1: 1 µL) Reinstwasser, zusammensetzt. Jeder PCR-Lauf enthielt, neben den aufgetragenen Proben, einen „Inter Run Calibrator“ (IRC, entspricht gepoolter cDNA der Fettgewebeproben, 1:4 und 1:8 verdünnt), Negativkontrollen der qPCR (NTC), Negativkontrollen und -RT-Kontrollen der cDNA-Synthese. Die Negativkontrollen enthielten Reinstwasser anstelle der cDNA (qPCR) bzw. RNA (cDNA-Synthese) und dienten zur Kontaminations-Kontrolle der „MasterMixe“. Die -RT der cDNA-Synthese bestand aus einem RNA-Pool der verwendeten Proben und allen Bestandteilen des „MasterMixes“ außer dem Enzym Reverse Transkriptase und wurde zur Überprüfung einer möglichen DNA-Kontamination der RNA-Proben eingesetzt. Des Weiteren wurde eine cDNA-Standardreihe, bestehend aus 6 Standards (1:3 verdünnt), aufgetragen. Als Qualitätskriterium der qPCR musste jede Standardreihe eine Effizienz von  $100\% \pm 15$  und ein Bestimmtheitsmaß von mindestens 98% ( $R^2 = 0,980$ ) aufweisen, ansonsten musste die betreffende Messung wiederholt werden. Für die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wurde jeder Standard, IRC, jede Negativkontrolle, -RT und Probe in einem Dreifachansatz (Triplikat) aufgetragen.

Durch eine zehnmütige initiale Erhitzung im qPCR-Cycler wurde die im SYBRGreen® enthaltene hot-start Taq-Polymerase aktiviert. Danach folgte eine primerspezifische Zyklenzahl (**Tabelle 1**) mit Denaturierungsphasen von 30 Sekunden bei 95°C, um die Wasserstoffbrückenbindungen aufzubrechen und die beiden DNA-Stränge zu trennen. Die folgenden Annealingphasen primerspezifischer Temperatur und Dauer (**Tabelle 1**) dienten der Anlagerung der Primer an die einzelsträngige DNA (Hybridisierung). Am Ende der Annealingphase erfolgte eine zweimalige Fluoreszenzmessung. Während der letzten Phase, der Elongationsphase (72°C, 20/30 Sekunden), amplifizierte die Taq-Polymerase die zwischen den Primern liegenden Sequenzabschnitte der DNA. Nach Ende des letzten Zyklus wurde eine Dissoziationskurve mit Erfassung der Schmelzpunkte der PCR-Produkte erstellt (95°C für 60 Sekunden, 55°C für 30 Sekunden und 95°C für 30 Sekunden). Beim Aufheizen von 55°C auf 95°C wurde bei jedem Grad Celsius der Temperaturänderung eine Fluoreszenzmessung durchgeführt, anhand derer dann die Dissoziationskurve erstellt wurde. Die Schmelztemperatur ist spezifisch, da sie sich nach der Länge und der Basenzusammensetzung eines PCR-Produktes richtet.

Die Werte der qPCR wurden mit Hilfe von qBASE<sup>plus</sup> 2.0 über die Werte der Referenzgene normalisiert. Dazu wurde die ermittelte Menge an Ziel-mRNA in Relation zum geometrischen Mittel der Menge an mRNA der Referenzgene gesetzt. Die Ergebnisse der qPCR für die Zielgene wurden als relative Menge der mRNA in Arbitrary Units [A.U.] angegeben.

Da die hierfür vorgesehene Menge an Leber- und Fettgewebeproben limitiert war, wurde auf die Messung der Methyltransferasen DNMT1 und DNMT3a zum Biopsiezeitpunkt in der Trächtigkeit verzichtet.

### 3.1.8 DNA-Isolierung und Multiplex qPCR

Eine Multiplex qPCR ermöglicht es in einer PCR-Reaktion mehr als ein Primerpaar für die Vervielfältigung bestimmter Gene zu verwenden. Dadurch ist der Nachweis von mehr als einem Genomabschnitt in einem Ansatz möglich. So wurde zum einen die Anzahl an mtDNA-Kopien pro Zelle und zum anderen die relative Menge an Telomerprodukt (qT), welches stark mit der relativen TL zusammenhängt, mit Hilfe einer Multiplex qPCR bestimmt (Cawthon, 2009).

Die Isolierung der gesamten genomischen DNA aus den Biopsieproben des subkutanen Fettgewebes erfolgte mit Hilfe eines handelsüblichen DNA-Isolationskits (PowerPlant<sup>®</sup> Pro DNA Isolation Kit; MOBIO, Carlsbad, CA, USA) gemäß der Protokollbeschreibung des Herstellers. Die gesamte genomische DNA der Vollblutproben und der Leber wurden unter Verwendung des Wizard Genomic DNA Purification Kits (Promega, Mannheim, Deutschland) laut Angaben des Herstellers isoliert. Danach wurde die Konzentration (ng/μL) und die Reinheit der isolierten DNA mittels Nanodrop1000 (peQLab Biotechnology) bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm bestimmt, wobei das Verhältnis 260/280 nm eine Aussage über die Proteinkontamination erlaubt. Dieser Wert sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen, andernfalls wurde die DNA-Isolierung der entsprechenden Probe wiederholt. Anschließend wurde eine DNA-Gelelektrophorese durchgeführt, um die Qualität und Unversehrtheit der isolierten DNA aller Proben zu überprüfen. Dafür wurde ein 0,8 %iges Agarosegel hergestellt. Je höher die Agarose konzentriert ist (meist 0,5 – 3%), desto kleiner sind die sich im Gel befindlichen Poren. Der durch das Anlegen eines elektrischen Feldes entstehende Ionenstrom bewirkt, dass die negativ geladenen Nukleinsäure-Moleküle der DNA durch die Gelmaschen in Richtung des Pluspols ziehen. Dies ermöglicht eine Auftrennung der DNA-Stränge nach ihrer Größe. Durch den beigefügten Fluoreszenzfarbstoff Midori Green (Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, Deutschland) entsteht ein charakteristisches, nach Länge sortiertes Bandenmuster der Bereiche im Gel mit Nukleinsäuren unterschiedlicher Länge, welches dann anhand eines zusätzlich aufgetragenen spezifischen Markers entsprechend nach Basenpaaren eingeordnet werden kann. Die anschließende fotografische Dokumentation der Banden der getrennten

DNA-Moleküle erfolgte mittels des Kamerasystems Biostep Dark Hood DH-40/50® (Biostep, Jahnsdorf, Deutschland) und der dazugehörigen Software Argus X1 Version 4.5.

Nach der Qualitätsprüfung der isolierten DNA wurden 10 ng/μL der DNA mit zwei Primerpaaren gemischt. Zur Bestimmung der mtDNA wurde einerseits das Primerpaar, welches das 12S rRNA Gen und andererseits das Primerpaar, welches das rinderspezifische β-Globin Gen vervielfältigt, eingesetzt. Dabei stellt das zuerst genannte eine spezifische Sequenz im mitochondrialen Genom dar, wobei β-Globin als „Housekeeping-Gen“ mit bekannter Kopienzahl von 2 Kopien pro Zelle auch als „Zellkern-Kontroll-Gen“ bezeichnet wird (Brown et al., 2012). Für die TL-Messung wurden Primerpaare, die Telomere und β-Globin vervielfältigen, eingesetzt. Um einerseits die Schmelztemperatur zu erhöhen (Cawthon, 2009) und andererseits sicherzustellen, dass das β-Globin-Produkt bei 83°C stabil ist, wurden den Primern *GC-clamps* hinzugefügt. Die Anwesenheit von Guanin oder Cytosin in den letzten fünf Basen eines Primers erhöht die Spezifität der Primerbindung (*GC-clamp*). Dabei ist zu beachten, dass die *GC-clamps* in der Reihenfolge und Länge verschieden sind, um eine *hairpin formation* (Haarnadelbildung), die eine korrekte Primerbindung erschweren könnte, zu verhindern. Die erwartete Produktgröße des β-Globin Primers mit *GC-clamps* ist 144 bp. Die Primersequenzen und PCR-Bedingungen (**Tabelle 2**) wurden aus dem Protokoll von Brown et al. (2012) mit kleinen Änderungen in den Primerkonzentrationen (Telomer: 7200 nM; β-Globin: 4000 nM) und Temperaturbedingungen der PCR (Annealingphase: 59°C; Elongationsphase: 72°C) übernommen. Die Spezifität der Primer wurde durch Gel-Elektrophorese überprüft.

**Tabelle 2:** Primer für die Multiplex qPCR

| Name                                   | Zugangsnummer | Primer Sequenz [5'-3']  | Fragmentlänge (bp) | Annealing (°C) | Zyklen          |
|--|---------------|---|--------------------|----------------|-----------------|
| <b>12S rRNA</b>                        | NM_U01920.1   | F = CGCGGTCATACGATTAACCC<br>R = AACCCATTTGGTATGGTGCTT   | 74                 | 59             | 40 <sup>2</sup> |
| <b>β-Globin<sup>1</sup></b>            |               | F = CGGCGGCGGGCGGCGCGGGCTGG<br>GCGGGAAGGCCCATGGCAAGAAGG<br>R = GCCGGCCCGCCGCGCCCGTCCCGC<br>CGCTCACTCAGCGCAGCAAAGG | 144                | 59             | 40 <sup>2</sup> |
| <b>telg/telc (Telomer)<sup>1</sup></b> |               | F = AACTAAGGTTTGGGTTTGGGTTT<br>GGGTTTGGGTTAGTGT<br>R = TGTTAGGTATCCCTATCCCTATCCC<br>TATCCCTATCCCTAACA             | 79                 | 59             | 40 <sup>2</sup> |

F: Forward Primer Sequenz; R: Reverse Primer Sequenz; bp: Basenpaare; 12S rRNA: mitochondrial kodierte 12S ribosomale RNA;

<sup>1</sup>: Primersequenzen übernommen von Brown et al. (2012);

<sup>2</sup>: die Multiplex PCR besteht aus 3 Abschnitten mit unterschiedlicher Zyklenzahl (1. Abschnitt: 1 Zyklus, 2. Abschnitt: 2 Zyklen, 3. Abschnitt: 40 Zyklen) gemäß Brown et al. (2012).

Jeder Multiplex qPCR-Lauf wurde mit einem Gesamtvolumen von 20 µL durchgeführt, welcher sich aus 2 µL DNA-Probe (10 ng/µL), beiden Forward und Reverse Primern (je 1 µL, je nach Messung 12S rRNA und β-Globin bzw. Telomer und β-Globin), 10 µL SYBRGreen® (ThermoFisher Scientific) und 0,12 µL ROX als passiven Referenz-Farbstoff (ThermoFisher Scientific) und Reinstwasser zusammensetzt. Außerdem wurde auf jede Multiplex qPCR-Platte neben den Proben eine Standardreihe, bestehend aus 6 Standards (1:3 verdünnt, ausgehend von einer Konzentration von 60 ng/µL), eine gepoolte DNA-Probe als IRC und eine NTC jeweils in einem Dreifachansatz aufgetragen.

Das Programm MxPro (Version 4.10, 2007) legt anhand der Amplifikationskurven aller Proben einer Messung eine „Baseline“ fest. Der Punkt, an dem alle Proben in die exponentielle Phase gehen, wird als „Threshold“ (Schwellenwert) bezeichnet. Dieser entspricht dem Analysepunkt der qPCR, an dem ein definiertes Fluoreszenzvolumen erreicht wird, bei dem die Fluoreszenz erstmals signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt. Die Anzahl von PCR-Zyklen, die jeweils benötigt wird, um den „Threshold“ zu erreichen, wird durch den C<sub>t</sub> (Cycle threshold)

angegeben. Mit Hilfe der DNA-Standardkurve ermittelt das Programm MxPro die PCR-Effizienz für jeden qPCR-Lauf.

Die Berechnung der relativen mtDNA-Kopienzahl in Bezug auf die Zellkern-DNA-Kopienzahl ( $\beta$ -Globin) wurde nach Anleitung von Nicklas et al. (2004) durchgeführt:

$$\text{relative Anzahl mtDNA-Kopien/Zelle} = \beta\text{-Globin Kopienzahl}^* \times \text{PCR-Effizienz}^{- (\text{Ct}_{12\text{S rRNA}} - \text{Ct}_{\beta\text{-Globin}})}$$

$$^*\beta\text{-Globin Kopienzahl} = 2 \text{ Kopien pro Zelle}$$

Und die Berechnung der relativen qT in Bezug auf  $\beta$ -Globin wurde wie folgt durchgeführt:

$$qT = \text{PCR-Effizienz (E)}^n, \text{ mit } n = \text{Ct}_{\beta\text{-Globin}} - \text{Ct}_{\text{Telomere}}$$

### 3.1.9 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm SPSS in der Version 24.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Zunächst wurden alle Daten der einzelnen Parameter auf Normalverteilung mit Hilfe des Shapiro-Wilk Tests und auf Varianzhomogenität mit Hilfe des Levene-Tests geprüft. Anschließend wurden die Daten, die keine Normalverteilung aufwiesen, logarithmiert. Für die Abbildungen wurden die nicht-logarithmierten Daten verwendet.

Um zu ermitteln, ob es generell Unterschiede zwischen den vier verschiedenen Biopsiezeitpunkten innerhalb der laktierenden bzw. nicht laktierenden Gruppe (abhängige Stichproben) gibt, wurde zunächst bei normalverteilten Daten eine Varianzanalyse mit Messwiederholungen und bei nicht normalverteilten Daten der Friedman-Test durchgeführt. Um anschließend herauszufinden zwischen welchen Biopsiezeitpunkten Unterschiede in der jeweiligen laktierenden bzw. nicht laktierenden Gruppe zu verzeichnen sind, wurde bei normalverteilten Daten der Students-t-Test bei verbundenen Proben und bei nicht normalverteilten Daten der Wilcoxon-Test angewendet. Unterschiede zwischen den laktierenden und den nicht laktierenden Tieren innerhalb desselben Biopsiezeitpunktes (unabhängige Stichproben) wurden bei normalverteilten Daten mit Hilfe des Students-t-Tests und bei nicht normalverteilten Daten mittels Mann-Whitney-U-Tests berechnet.

Unterschiede in der EB, der Milchmenge und dem Energiebedarf zwischen den Biopsiezeitpunkten innerhalb der laktierenden Gruppe (abhängige Stichproben) wurden bei normalverteilten Daten jeweils mit Varianzanalyse mit Messwiederholungen und anschließend mit dem Students-t-Test bei verbundenen Proben berechnet.

Zusammenhänge zwischen den untersuchten Daten wurden mit Hilfe des Spearman Korrelations-Tests geprüft.

Alle Werte werden als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (SEM) dargestellt. Als Signifikanzniveau wurde  $P \leq 0,05$  angenommen und Werte zwischen  $0,05 < P \leq 0,1$  wurden als Trend definiert.



## 3.2 Versuch 2

### 3.2.1 Tiere

Im Rahmen des zweiten Versuches wurden in der Lehr- und Forschungsstation Frankenforst, der Landwirtschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn in Königswinter, insgesamt 60 Tiere der Rasse Deutsche Holstein untersucht. Die Probenentnahme bei diesen Tieren wurde von der zuständigen Behörde, dem LANUV, genehmigt (Aktenzeichen 84-02.05.40.14.027). In diesem Versuch wurden 60 Tiere in 3 Gruppen zu je 20 Tieren eingeteilt. Zur ersten Gruppe gehörten 17 weibliche und 3 männliche Kälber im Alter von  $56 \pm 10$  Tagen ( $< 6$  Monate). Zur zweiten Gruppe zählten 20 Färsen im Alter zwischen 6 Monaten und der 1. Laktation ( $1,3 \pm 0,1$  Jahre). Die dritte Gruppe bestand aus 20 laktierenden Kühen mit der Laktationszahl 1 bis 3 ( $3,9 \pm 0,1$  Jahre).

### 3.2.2 Haltung und Fütterung

Die Kälber wurden in einem mit Stroh eingestreutem Kälberlaufstall gehalten und an den Tagen 1 – 3 p.p. mit Kolostrum (mind. 6 L/Tag) versorgt sowie von Tag 4 – 7 p.p. mit Vollmilch getränkt. An dem darauffolgendem 8. Tag p.p. bis zum Tag 70 p.p. wurden die Kälber über einen Tränkeautomaten mit Blattina®Profi Lac Milchaustauscher von Blattin® (Höveler, Dormagen, Deutschland) gemäß dort empfohlenem Tränkeplan gefüttert. Zusätzlich stand den Kälbern Raufutter (Heu) *ad libitum* und ein Ergänzungsfutter für Aufzuchtkälber (max. 2,5 kg/Tier/Tag; 11,0 MJ ME/kg; KälberTop press, Agrifirm, Drentwede, Deutschland) zur Verfügung. Ab dem 71. Tag p.p. bekamen die Kälber anstelle des Milchaustauschers und zusätzlich zum Raufutter (Heu) und zum Ergänzungsfutter für Aufzuchtkälber eine partielle Mischration, die auch an die laktierenden Kühe verfüttert wurde, *ad libitum* zur Verfügung gestellt.

Die Färsen waren in einem separaten, mit Stroh eingestreutem Laufstall untergebracht. In den Sommermonaten (Mai bis Oktober) stand diesen Tieren Gras von der Weide *ad libitum* zur Verfügung. In den Wintermonaten (November bis April) befanden sich die Färsen im Stall und erhielten Grassilage vom 2. und 3. Schnitt ( $6,13 - 6,19$  MJ NE<sub>L</sub>/kg TM).

Die laktierenden Kühe waren in einem Liegeboxenlaufstall untergebracht und wurden zweimal täglich gemolken. Die Fütterung erfolgte gemäß den Empfehlungen der Gesellschaft für Ernährungsphysiologie (GfE, 2001) mit einer partiellen Mischration ( $6,6$  MJ NE<sub>L</sub>/kg TM), die *ad libitum* angeboten wurde. Zusätzlich bekamen diese Tiere Kraftfutter ( $7,5$  MJ NE<sub>L</sub>/kg TM), abhängig von der individuellen Milchleistung des jeweiligen Tieres. In den Sommermonaten Mai bis Oktober hatten diese Tiere ebenfalls Zugang zur Weide.

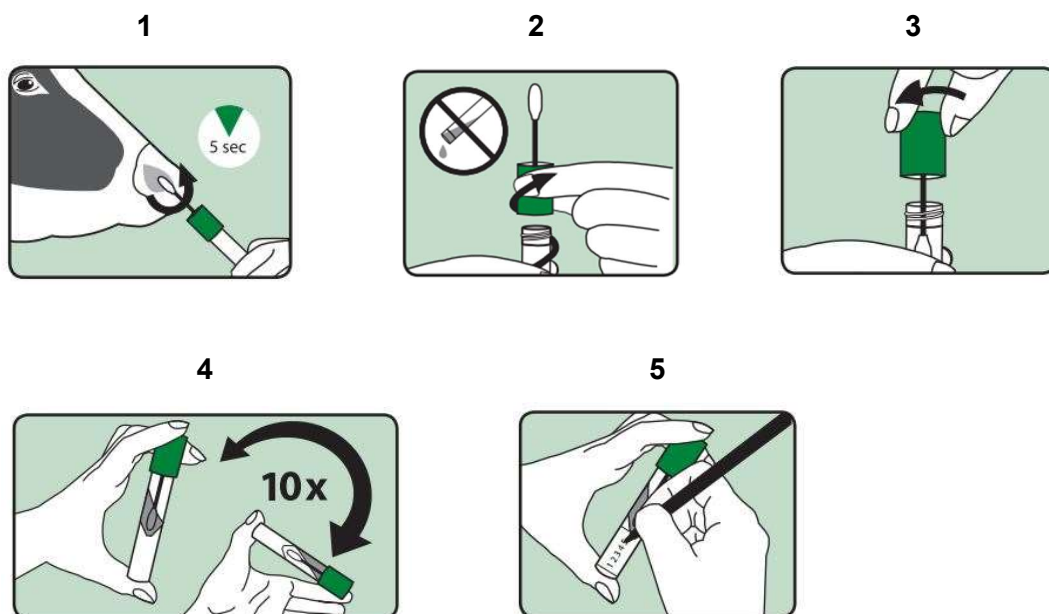
Allen drei Versuchsgruppen stand Wasser über Selbsttränken *ad libitum* zur Verfügung.

Zur Errechnung der Nettoenergiebilanz wurde wie im Versuch 1 die Summe aus dem täglichen Erhaltungsbedarf (GfE, 2001) und dem täglichen Energiebedarf für die Milchleistung (Tyrrell & Reid, 1965) mit bekanntem Fett- (4%) und Proteingehalt (3,4%) der Milch (GfE, 1991) von der täglichen Energieaufnahme subtrahiert. Die Berechnung der Energiebilanz und die Angabe der Milchleistung erfolgte ebenfalls anhand der Wochenmittelwerte.

### 3.2.3 Probenentnahmen

Die Beprobung der Tiere erfolgte in 3 Teilversuchen. Alle Tiere wurden morgens vor der Fütterung beprobt, um eine mögliche Kontamination des Naseneingangs mit Futterresten zu vermeiden und somit ein sauberes Arbeitsumfeld zu schaffen. Die Tiere wurden für die Probenentnahme im Fressgitter fixiert.

Im **1. Teilversuch** erfolgte bei allen 3 Gruppen (n = 20 je Gruppe) eine nichtinvasive Probenentnahme im Bereich der Nasenschleimhaut mittels Performagene™ LIVESTOCK nasal swab Probenentnahmekit PG-100 (**Abbildung 11**; DNA Genotek, Ottawa, CAN, USA) laut Herstellerangaben. Jeder nasale Tupfer enthielt eine Pufferlösung zur Stabilisierung der DNA.



**Abbildung 11:** Probenentnahme mittels Performagene™ LIVESTOCK nasal swab nach <http://www.dnagenotek.com/US/products/performagene/collection-instructions.html>, 19. Juni 2017.

Der Schwamm wurde für 5 Sekunden auf der Nasenschleimhaut hin und her bewegt (Bild 1). Danach wurde der Deckel mit dem Schwamm von dem aufrecht gehaltenen Röhrrchen gelöst und in die Pufferlösung eingetaucht (Bild 2 – 3). Anschließend wurde 10-mal kräftig geschwenkt und das Röhrrchen zur genauen Zuordnung der Proben entsprechend beschriftet (Bild 4 – 5).

Im **2. Teilversuch** erfolgte eine erneute Probenentnahme, allerdings nur bei der Kälbergruppe, im Bereich der Nasenschleimhaut mittels Performagene™ LIVESTOCK nasal swabs (DNA Genotek) an zwei unterschiedlichen Zeitpunkten, 6 und 18 Monate nach der ersten Probenentnahme (Teilversuch 1). Die Probenentnahme erfolgte jeweils ausschließlich bei den weiblichen Kälbern ( $n = 17$ ), da die männlichen Kälber ( $n = 3$ ) zu diesen Zeitpunkten bereits abgegangen waren.

Im **3. Teilversuch** wurden 12 Tiere der 2. und 3. Laktation ( $n = je\ 6$ ) aus der Gruppe der laktierenden Kühe 3 Monate nach der ersten Beprobung (Teilversuch 1) erneut beprobt. Es wurden Milchproben, Heparin-Vollblutproben und nasale Tupferproben zur Isolierung der DNA entnommen.

Die Entnahme der Milchproben der 12 Tiere mit somatischen Zellgehalten von  $0,15 \times 10^5$  bis  $2,7 \times 10^5$  Zellen/mL Milch erfolgte am Vorabend des Probenentnahmetages nach den DVG Leitlinien zur "Entnahme von Milchproben unter aseptischen Bedingungen und Isolierung und Identifizierung von Mastitiserregern" (2011). Zunächst wurden die Zitzen aller 4 Euterviertel der Kuh mittels Einwegtücher von groben Verschmutzungen gereinigt und danach mit 70-%igem Ethanol (Medite) desinfiziert. Die ersten 3 Milchstrahlen aus jeder Zitze wurden in einen Vormelkbecher gemolken und auf visuelle Veränderungen und somit Anzeichen einer Infektion (z.B. Flockenbildung der Milch) überprüft. Außerdem erfolgte eine Überprüfung der Zellzahlgehalte in der Milch dieser Tiere. Es wurden ausschließlich Kühe mit visuell unauffälligen Eutervierteln und mit einer Zellzahl unter  $3 \times 10^5$  Zellen/mL Milch (Kehrl & Shuster, 1994; Usman et al., 2014) für die Probenentnahme herangezogen. Nach erfolgtem Vormelken wurden die Zitzenkuppen und -öffnungen gründlich mit einem alkoholgetränkten Einwegtuch für etwa 15 Sekunden pro Zitze gereinigt und desinfiziert. Dabei wurden die Zitzen, der vom Probennehmer abgewandten Euterseite zuerst gereinigt und desinfiziert, jedoch zuletzt beprobt, um eine erneute Kontamination zu vermeiden. Aus jedem Euterviertel wurden in etwa gleich große Anteile der Milch in ein 50 mL Probenröhrchen (Sarstedt) mit möglichst geringem Druck gemolken. Nach Verschließen des Röhrchens wurde die Milchprobe mittels leichtem Schwenken durchmischt.

Am Morgen nach der Milchprobenentnahme wurden bei diesen 12 laktierenden Kühen mittels Performagene™ LIVESTOCK nasal swabs (DNA Genotek) Abstriche von der Nasenschleimhaut entnommen. Außerdem erfolgte eine Heparin-Vollblutentnahme aus der V. jugularis.

Nach der Probenentnahme wurden die nasalen Tupfer bis zur DNA-Isolierung bei Raumtemperatur gelagert. Laut Herstellerangaben sind sie in der Pufferlösung bis zu einem Jahr bei Raumtemperatur stabil.

Die Milchproben wurden unmittelbar nach der Entnahme in mit Eis gekühlten Boxen zum Labor transportiert, wo sie bis zur DNA-Isolierung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert wurden.

Bei den Heparin-Vollblutproben erfolgte noch am Tag der Probenentnahme die DNA-Isolierung. Anschließend wurde die isolierte DNA bei  $-20^{\circ}\text{C}$  für weitere Analysen gelagert.

### **3.2.4 DNA-Isolierung, -Quantität und -Qualität**

Die Isolierung der genomischen DNA der Epithelzellen aus den nasalen Tupferproben erfolgte gemäß des „Laborprotokolls zur manuellen DNA-Aufreinigung von 0,5 mL der Performagene™ Probe“ des Herstellers. Der dazu benötigte PG-L2P Performagene Purifier (PG-AC4) wurde zusätzlich zum Probenentnahmekit PG-100 verwendet (DNA Genotek).

Die DNA-Isolierung der somatischen Zellen aus den Milchproben wurde mit Hilfe des First-DNA all-tissue Kits (Gen-ial, Troisdorf, Deutschland) durchgeführt. Da Milch aufgrund der darin enthaltenen Hemmstoffe wie Fette und Proteine ein schwieriges Medium für eine DNA-Isolierung darstellt (Usman et al., 2014), mussten die Milchproben zunächst vorbehandelt werden. Hierfür wurden 2 mL der bei Raumtemperatur aufgetauten Milchprobe entnommen und zentrifugiert ( $2000 \times g$ , 20 Minuten, Raumtemperatur). Der Überstand wurde bis auf einen Rest von 200  $\mu\text{L}$  verworfen. Das bei der Zentrifugation entstandene Pellet wurde in diesem Restüberstand durch vortexen gelöst und in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß (Sarstedt) überführt. Danach wurden die weiteren Reaktionsschritte laut Protokollbeschreibung des Herstellers durchgeführt.

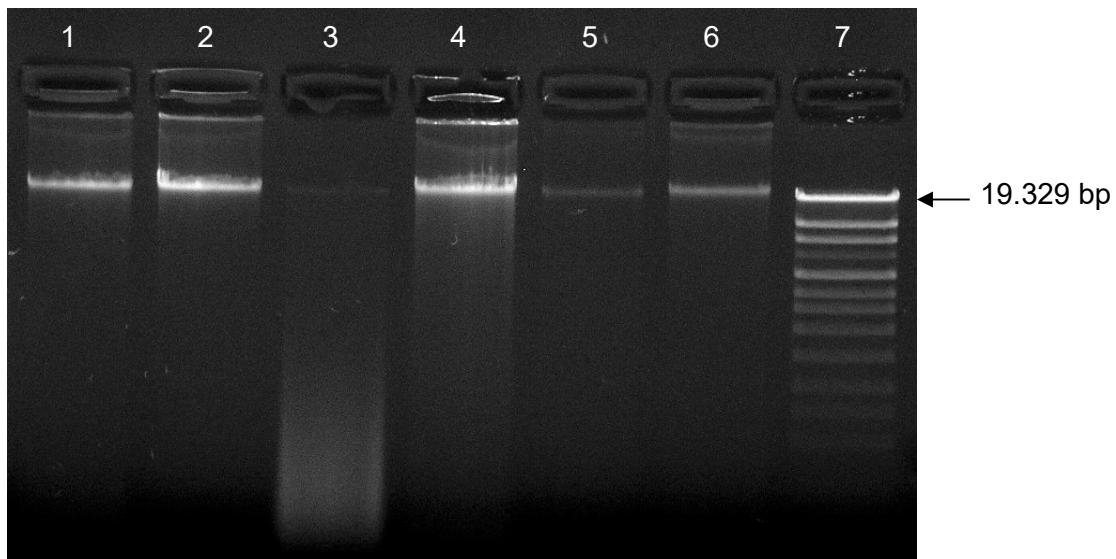
Die gesamte genomische DNA aus den Vollblutproben wurde unter Verwendung des Wizard Genomic DNA Purification Kits (Promega) entsprechend der Herstellerangaben isoliert.

Im Anschluss wurde die Konzentration und die Reinheit der DNA aller Proben ( $\text{ng}/\mu\text{L}$ ) mittels Nanodrop1000 (peQLab Biotechnology) bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm gemessen. Aus dem Verhältnis 260/280 nm erhält man eine Aussage über Proteinkontaminationen in der Lösung. Alle nasalen Tupferproben der Kälber wurden vor der Nanodrop-Messung in einem Verhältnis von 1:10 mit Reinstwasser verdünnt, da diese für die Messung aufgrund der hohen DNA-Konzentration sonst zu viskös gewesen wären und dadurch zu falschen Messergebnissen geführt hätten. In den Milchproben wurde im Gegensatz zu den nasalen Tupfer- ( $129 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ) und Vollblutproben ( $36 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ) der laktierenden Kühe der niedrigste DNA-Gehalt mit durchschnittlich  $9 \text{ ng}/\mu\text{L}$  gemessen.

Nachdem die Quantität der DNA in den Proben festgestellt wurde, erfolgte die Bestimmung der Qualität aller DNA-Proben mittels DNA-Gelelektrophorese gemäß den Angaben der Performagene™ Studie PD-WP-015. Diese Qualitätsprüfung war für die anschließende Multiplex qPCR eine Voraussetzung, da diese nur für intakte DNA verlässliche Ergebnisse liefert.

Falls DNA bei der Probenentnahme und/oder bei der Isolierung beschädigt wurde, grenzten sich die DNA-Banden im Gel nicht klar ab, sondern bildeten einen sogenannten „Schmier“ (degradierte DNA). In diesem Fall wurde die DNA-Isolierung der betreffenden Probe wiederholt und die Qualität nochmals überprüft.

Die DNA-Banden aller Proben lagen im Gel auf Höhe von 19.329 bp (**Abbildung 12**).



**Abbildung 12:** DNA-Gelelektrophorese (0,8% Agarose, 90V, 60 Minuten) der nasalen Tupferproben der laktierenden Kühe (n = 6). Je schwächer die Bande sichtbar ist (Lane 5), desto geringer ist der DNA-Gehalt (Nanodrop).

Lane 3: degradierte DNA („Schmier“); Lane 7: Lambda-pUC Mix Marker 4

### 3.2.5 Multiplex qPCR

In der anschließenden Multiplex qPCR wurde die qT mittels der Primerpaare, die Telomere und  $\beta$ -Globin vervielfältigen, wie bereits unter Punkt 3.1.8 beschrieben, mit folgenden Abänderungen bestimmt.

Zunächst wurden alle DNA-Proben (Nasenschleimhaut, Blut, Milch) auf eine einheitliche DNA-Konzentration von 5 ng/ $\mu$ L mit Reinstwasser verdünnt. Danach wurde eine Poolprobe aus der DNA der nasalen Tupferproben der Kälber, Färsen und laktierenden Kühe (n = 60, je 10  $\mu$ L/Probe) hergestellt und für den IRC auf 5 ng/ $\mu$ L und für die Standardreihe auf 60 ng/ $\mu$ L mit Reinstwasser verdünnt.

Außerdem wurden Forward und Reverse Primer auf die entsprechende Konzentration verdünnt (Telomer: 7200 nM;  $\beta$ -Globin: 4000 nM).

Jeder Multiplex qPCR Lauf wurde mit einem Gesamtvolumen von 20  $\mu$ L durchgeführt, das sich aus 2  $\mu$ L DNA-Probe (5 ng/ $\mu$ L), beiden Forward und Reverse Primern (Telomer: 2,5  $\mu$ L;  $\beta$ -Globin: 2  $\mu$ L), 10  $\mu$ L SYBRGreen® (ThermoFisher Scientific), 0,12  $\mu$ L ROX als passiven Referenz-Farbstoff (ThermoFisher Scientific) und Reinstwasser zusammensetzt.

### 3.2.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten wurde mittels Programm SPSS in der Version 24.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) durchgeführt.

Zunächst wurden alle Daten auf Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk Test und auf Varianzhomogenität mittels Levene-Tests geprüft.

Unterschiede zwischen den 3 verschiedenen Tiergruppen (weibliche Kälber, Färsen und Laktierende) wurden mittels Einfaktorieller ANOVA mit Bonferroni post hoc-Test analysiert. Bei den weiblichen Kälbern wurde der relative qT-Wert eines Kalbes in den Auswertungen nicht berücksichtigt, da dieser mehr als doppelt so hoch lag, wie die relativen qT-Werte der anderen weiblichen Kälber. Beim Vergleich zwischen weiblichen und männlichen Kälbern wurden Unterschiede mit Hilfe des Students-t-Tests bei unabhängigen Stichproben berechnet.

Ob es Unterschiede bei den weiblichen Kälbern zwischen den 3 verschiedenen Zeitpunkten gibt, wurde mittels Varianzanalyse mit Messwiederholungen überprüft. Anschließend wurde mit Hilfe des Students-t-Tests bei verbundenen Proben berechnet, zwischen welchen Zeitpunkten die Unterschiede bestehen.

Zusammenhänge zwischen den untersuchten Daten wurden bei normalverteilten Daten mit Hilfe des Pearson Korrelations-Tests und bei den nicht normalverteilten Daten der Milch mit Hilfe des Spearman Korrelations-Tests geprüft.

Alle Werte werden als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (SEM) dargestellt. Das festgelegte Signifikanzniveau war  $P \leq 0,05$  und Werte zwischen  $0,05 < P \leq 0,1$  wurden als Trend definiert.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Versuch 1

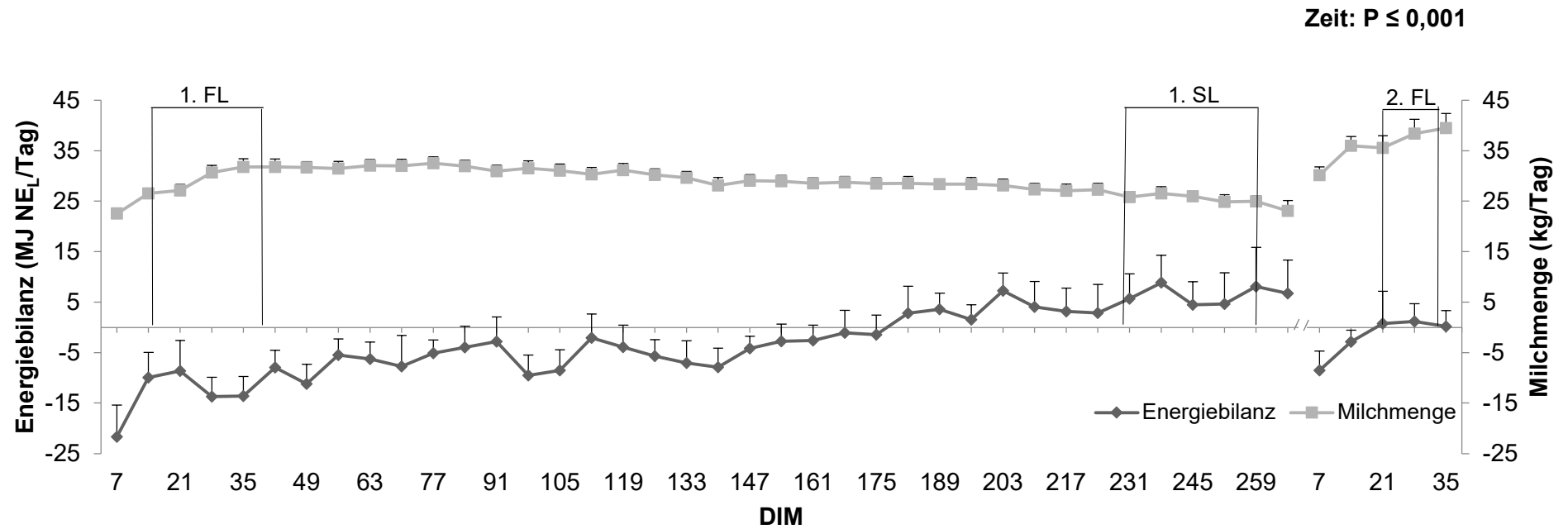
#### 4.1.1 Energiebilanz und Milchmenge

In folgendem Liniendiagramm (**Abbildung 13**) sind die EB und die Milchmenge der laktierenden Kühe (n = 8) dargestellt.

Die Tiere befanden sich zum Zeitpunkt der 1. FL in einer negativen EB. Diese stieg im Verlauf der Laktation um 21,2 MJ NE<sub>L</sub>, sodass die EB dieser Tiere in der 1. SL (P = 0,018) positiv war. Zum Zeitpunkt der 2. FL befanden sich die Tiere ebenfalls in einer negativen EB, die aber um 15,0 MJ NE<sub>L</sub> höher lag als die in der 1. FL (P = 0,026).

Die Milchmenge stieg von der 1. FL zur 2. FL um 33% (P = 0,029) und von der 1. SL zur 2. FL um 53% (P = 0,002).

Die Tiere hatten in der 2. FL den höchsten Energiebedarf ( $160 \pm 8,6$  MJ NE<sub>L</sub>/Tag), dieser war um 25% höher als in der 1. FL ( $128 \pm 5,3$  MJ NE<sub>L</sub>/Tag; P = 0,022) und um 36% höher als in der 1. SL ( $118 \pm 4,2$  MJ NE<sub>L</sub>/Tag; P = 0,003).



**Abbildung 13:** Veränderungen der Energiebilanz (Mittelwerte ± SEM) und der Milchmenge (Mittelwerte ± SEM) von laktierenden Kühen (n = 8) über einen Zeitraum von 2 Laktationen (1. FL - 2. FL).

P ≤ 0,05; 1. FL: 1. Frühlaktation; 1. SL: 1. Spätlaktation; 2. FL: 2. Frühlaktation; DIM: days in milk (Laktationstage)



#### 4.1.2 Körperkonditions- und Blutparameter

Die Ergebnisse der Körperkonditions- und Blutparameter sind in **Tabelle 3** dargestellt.

Bei den laktierenden Kühen zeigte sich während des Untersuchungszeitraumes (TK bis 2. FL) eine Körpermassenzunahme um 25% ( $P = 0,012$ ), wobei die Körpermasse von der 1. FL zur 1. SL um 5,5% ( $P = 0,012$ ) und von der 1. FL zur 2. FL um 7,5% zunahm ( $P = 0,012$ ). Bei den nicht laktierenden Kühen zeigte sich während des zuvor genannten Untersuchungszeitraumes eine Körpermassenzunahme um 48% ( $P = 0,018$ ). Diese zeigten von der 1. FL zur 1. SL eine Körpermassenzunahme um 9% ( $P = 0,036$ ) und von der 1. FL zur 2. FL um 11% ( $P = 0,018$ ). Nicht laktierende Kühe waren in der 1. FL um 6,5% ( $P = 0,065$ ), in der 1. SL und in der 2. FL jeweils um 10% ( $P = 0,028$ ;  $P = 0,009$ ) schwerer als die laktierenden Kühe.

Der BCS änderte sich bei den laktierenden Kühen an den verschiedenen Biopsiezeitpunkten nicht. Die nicht laktierenden Kühe zeigten hingegen von der TK zur 1. SL eine BCS-Zunahme um 19% ( $P = 0,023$ ), von der 1. SL zur 2. FL eine Abnahme des BCS um 10% ( $P = 0,041$ ) und hatten im Vergleich zu den laktierenden Kühen in der 1. FL um 21% ( $P = 0,028$ ), in der 1. SL um 15% ( $P = 0,05$ ) und in der 2. FL um 14% ( $P = 0,028$ ) höhere BCS-Werte.

Die NEFA-Konzentration stieg bei den laktierenden Kühen von der TK zur 1. FL um 54% ( $P = 0,05$ ) an. Die nicht laktierenden Kühe hatten die höchste NEFA-Konzentration in der 1. SL, wobei diese im Vergleich zur 2. FL etwa doppelt so hoch war ( $P = 0,017$ ). In der 1. FL hatten diese Tiere eine um 48% höhere NEFA-Konzentration als in der 2. FL ( $P = 0,05$ ). Die nicht laktierenden Kühe hatten im Vergleich zu den laktierenden Kühen in der 1. FL eine um 23% niedrigere ( $P = 0,05$ ) und in der 1. SL eine um 75% höhere ( $P = 0,028$ ) NEFA-Konzentration. Die BHB-Konzentrationen unterschieden sich lediglich bei den nicht laktierenden Kühen. Diese war in der 1. FL am höchsten, um 54% höher als in der 1. SL ( $P = 0,018$ ) und fast doppelt so hoch wie in der 2. FL ( $P = 0,05$ ). Es wurde ein positiver Zusammenhang zwischen der NEFA- und der BHB-Konzentration in der 2. FL bei den laktierenden Kühen ( $\rho = 0,719$ ;  $P = 0,045$ ) und in der 1. SL bei den nicht laktierenden Kühen ( $\rho = 0,714$ ;  $P = 0,047$ ) festgestellt.

Die Plasmakonzentrationen von Adiponektin, Haptoglobin und Progesteron unterschieden sich zwischen den verschiedenen Biopsiezeitpunkten, wobei die Konzentrationen aller drei Parameter bei den laktierenden Kühen jeweils in der TK am höchsten waren. Die Adiponektinkonzentration der laktierenden Kühe war in der TK um 35% höher als in der 1. FL ( $P = 0,012$ ), um 25% höher als in der 1. SL ( $P = 0,017$ ) und um 48% höher als in der 2. FL ( $P = 0,012$ ). Die Haptoglobinkonzentration der laktierenden Kühe war in der TK um 43% höher als in der 1. SL ( $P = 0,028$ ) und um 91% höher als in der 2. FL ( $P = 0,043$ ). In der 1. FL hatten diese Tiere eine um 72% höhere Haptoglobinkonzentration als in der 2. FL ( $P = 0,028$ ).

Bei den nicht laktierenden Kühen war die Adiponektinkonzentration in der 1. FL jeweils um 35% höher als in der 1. SL ( $P = 0,012$ ) und in der 2. FL ( $P = 0,017$ ). Diese Tiere hatten in der TK eine um 36% höhere Haptoglobinkonzentration als in der 1. SL ( $P = 0,025$ ) und eine um

74% höhere Haptoglobinkonzentration als in der 2. FL ( $P = 0,025$ ). In der 1. FL war die Haptoglobinkonzentration um 48% höher als in der 2. FL ( $P = 0,012$ ) und die Progesteronkonzentration um 62% höher als in der 2. FL ( $P = 0,05$ ). Unterschiede zwischen den nicht laktierenden und den laktierenden Kühen zeigten sich in der Adiponektinkonzentration. Diese war in der 1. FL bei den nicht laktierenden Kühen um 39% höher als bei den Laktierenden ( $P = 0,021$ ).

Die Serumkonzentrationen von dROM und TBARS unterschieden sich lediglich in der Gruppe der laktierenden Kühe. Die dROM Konzentration war in der 1. SL am höchsten und jeweils um 38% höher als in der TK ( $P = 0,036$ ) und in der 1. FL ( $P = 0,05$ ). Die TBARS Konzentration war in der TK am höchsten, jeweils um 71% höher als in der 1. FL ( $P = 0,009$ ) und in der 2. FL ( $P = 0,033$ ) und um 89% höher als in der 1. SL ( $P = 0,022$ ). Die Konzentrationen von AOPP/Albumin waren bei den laktierenden Kühen in der 1. SL am höchsten und um 62% höher als in der TK ( $P = 0,030$ ). Die nicht laktierenden Kühe hatten in der 2. FL die höchste AOPP/Albumin Konzentration. Diese war doppelt so hoch wie in der TK ( $P = 0,020$ ). In der 1. SL hatten diese Tiere ebenfalls eine fast doppelt so hohe AOPP/Albumin Konzentration wie in der TK ( $P = 0,002$ ).

Die Cholesterinkonzentration unterschied sich ausschließlich im Serum der Gruppe der laktierenden Kühe und war in der 1. SL am höchsten. Sie stieg von der TK zur 1. FL um 28% ( $P = 0,025$ ), von der TK zur 1. SL um 88% ( $P = 0,012$ ) und von der 1. FL zur 1. SL um 48% ( $P = 0,012$ ). Von der 1. SL zur 2. FL wurde ein Abfall der Cholesterinkonzentration um 24% ermittelt ( $P = 0,012$ ). Die laktierenden Tiere hatten in der 1. SL eine um 83% ( $P < 0,001$ ) und in der 2. FL eine um 44% ( $P = 0,028$ ) höhere Cholesterinkonzentration als die nicht laktierenden Tiere.

**Tabelle 3:** Körperkonditions- und Blutparameter von laktierenden und nicht laktierenden Kühen (je n = 8) während der Trächtigkeit (209 - 224 Tage a.p.), der 1. Früh-laktation (14 - 38 DIM), der 1. Spät-laktation (230 - 260 DIM) und der 2. Früh-laktation (22 - 34 DIM). Mittelwerte  $\pm$  SEM.

|  | Trächtigkeit                                  |   | 1. Früh-laktation                             |   | 1. Spät-laktation                               |   | 2. Früh-laktation                              |   |
|--|---|---|---|---|---|---|--|---|
|  | L   | NL  | L   | NL  | L   | NL  | L  | NL  |
| Körpergewicht (kg)                               | 509 $\pm$ 16,0 <sup>A</sup>                   | 472 $\pm$ 16,7 <sup>a</sup>                     | 591 $\pm$ 13,2 <sup>B</sup>                   | 630 $\pm$ 17,5 <sup>b</sup>                     | <b>624 <math>\pm</math> 11,2<sup>C</sup></b>    | <b>685 <math>\pm</math> 20,3<sup>c</sup></b>    | <b>636 <math>\pm</math> 13,3<sup>C</sup></b>   | <b>699 <math>\pm</math> 12,7<sup>c</sup></b>  |
| BCS  | 3,25 $\pm$ 0,16                               | 3,25 $\pm$ 0,16 <sup>a</sup>                    | <b>3,06 <math>\pm</math> 0,15</b>             | <b>3,69 <math>\pm</math> 0,21<sup>a,b</sup></b> | <b>3,38 <math>\pm</math> 0,16</b>               | <b>3,88 <math>\pm</math> 0,13<sup>b</sup></b>   | <b>3,06 <math>\pm</math> 0,06</b>              | <b>3,50 <math>\pm</math> 0,13<sup>a</sup></b> |
| NEFA (mmol/L)                                    | 0,26 $\pm$ 0,05 <sup>A</sup>                  | 0,34 $\pm$ 0,08 <sup>a,b</sup>                  | <b>0,40 <math>\pm</math> 0,03<sup>B</sup></b> | <b>0,31 <math>\pm</math> 0,03<sup>a</sup></b>   | <b>0,28 <math>\pm</math> 0,09<sup>A,B</sup></b> | <b>0,49 <math>\pm</math> 0,08<sup>a</sup></b>   | 0,30 $\pm$ 0,06 <sup>A,B</sup>                 | 0,21 $\pm$ 0,05 <sup>b</sup>                  |
| BHB (mmol/L)                                     | 0,62 $\pm$ 0,09                               | 0,72 $\pm$ 0,10 <sup>a,b</sup>                  | 1,17 $\pm$ 0,23                               | 1,00 $\pm$ 0,19 <sup>a</sup>                    | 0,67 $\pm$ 0,06                                 | 0,65 $\pm$ 0,16 <sup>b</sup>                    | 0,55 $\pm$ 0,09                                | 0,54 $\pm$ 0,08 <sup>b</sup>                  |
| Adiponektin ( $\mu$ g/mL)                        | 36,9 $\pm$ 2,41 <sup>A</sup>                  | 32,6 $\pm$ 2,23 <sup>a,b</sup>                  | <b>27,4 <math>\pm</math> 2,69<sup>B</sup></b> | <b>38,2 <math>\pm</math> 3,03<sup>a</sup></b>   | 29,6 $\pm$ 3,29 <sup>B</sup>                    | 28,3 $\pm$ 2,78 <sup>b</sup>                    | 24,9 $\pm$ 1,45 <sup>B</sup>                   | 28,4 $\pm$ 2,16 <sup>b</sup>                  |
| Leptin (ng/mL)                                   | 8,80 $\pm$ 1,29                               | 8,34 $\pm$ 0,88                                 | 7,66 $\pm$ 1,18                               | 9,19 $\pm$ 0,77                                 | 7,16 $\pm$ 1,02                                 | 9,11 $\pm$ 0,75                                 | 7,82 $\pm$ 1,15                                | 10,6 $\pm$ 1,02                               |
| Haptoglobin ( $\mu$ g/mL)                        | 53,7 $\pm$ 3,39 <sup>A</sup>                  | 52,4 $\pm$ 4,22 <sup>a</sup>                    | 48,3 $\pm$ 5,17 <sup>A,B</sup>                | 44,6 $\pm$ 1,78 <sup>a,b</sup>                  | 37,6 $\pm$ 4,21 <sup>B,C</sup>                  | 38,6 $\pm$ 2,62 <sup>b,c</sup>                  | 28,1 $\pm$ 3,76 <sup>C</sup>                   | 30,1 $\pm$ 2,88 <sup>c</sup>                  |
| Progesteron (ng/mL)                              | <b>14,6 <math>\pm</math> 1,84<sup>A</sup></b> | <b>6,33 <math>\pm</math> 1,79<sup>a,b</sup></b> | 3,06 $\pm$ 0,86 <sup>B</sup>                  | 5,37 $\pm$ 0,91 <sup>a</sup>                    | <b>9,86 <math>\pm</math> 0,83<sup>C</sup></b>   | <b>5,47 <math>\pm</math> 0,97<sup>a,b</sup></b> | 5,17 $\pm$ 1,26 <sup>B</sup>                   | 3,31 $\pm$ 1,15 <sup>b</sup>                  |
| dROM ( $\mu$ gH <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /mL) | 66,4 $\pm$ 13,5 <sup>A</sup>                  | 77,0 $\pm$ 7,12                                 | 66,2 $\pm$ 9,96 <sup>A</sup>                  | 78,8 $\pm$ 12,6                                 | 91,9 $\pm$ 8,66 <sup>B</sup>                    | 87,6 $\pm$ 19,0                                 | 77,6 $\pm$ 9,71 <sup>A,B</sup>                 | 76,0 $\pm$ 9,58                               |
| TBARS ( $\mu$ mol/L)                             | 0,36 $\pm$ 0,06 <sup>A</sup>                  | 0,31 $\pm$ 0,04                                 | 0,21 $\pm$ 0,02 <sup>B</sup>                  | 0,28 $\pm$ 0,03                                 | 0,19 $\pm$ 0,01 <sup>B</sup>                    | 0,23 $\pm$ 0,02                                 | 0,21 $\pm$ 0,02 <sup>B</sup>                   | 0,21 $\pm$ 0,02                               |
| AOPP/Alb. ( $\mu$ mol/g)                         | 1,83 $\pm$ 0,19 <sup>A</sup>                  | 1,56 $\pm$ 0,13 <sup>a</sup>                    | 2,39 $\pm$ 0,65 <sup>A,B</sup>                | 2,27 $\pm$ 0,43 <sup>a,b</sup>                  | 2,97 $\pm$ 0,40 <sup>B</sup>                    | 2,97 $\pm$ 0,27 <sup>b</sup>                    | 2,00 $\pm$ 0,28 <sup>A,B</sup>                 | 3,15 $\pm$ 0,61 <sup>b</sup>                  |
| Cholesterin (mg/dL)                              | 95,5 $\pm$ 5,21 <sup>A</sup>                  | 91,7 $\pm$ 5,08                                 | 122 $\pm$ 6,11 <sup>B</sup>                   | 106 $\pm$ 9,65                                  | <b>180 <math>\pm</math> 5,86<sup>C</sup></b>    | <b>98,4 <math>\pm</math> 12,8</b>               | <b>137 <math>\pm</math> 18,2<sup>A,B</sup></b> | <b>95,2 <math>\pm</math> 6,10</b>             |

Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Zeitpunkten, Unterschiede bei den laktierenden Kühen sind mit Großbuchstaben gekennzeichnet, Unterschiede bei den nicht laktierenden Kühen mit Kleinbuchstaben. Die mit Fettdruck hervorgehobenen Werte zeigen signifikante Unterschiede zwischen laktierenden und nicht laktierenden Kühen innerhalb eines Zeitpunktes ( $P \leq 0,05$ ).

DIM: days in milk; L: laktierende Kühe; NL: nicht laktierende Kühe; BCS: Body condition score; NEFA: non-esterified fatty acid; BHB:  $\beta$ -Hydroxybutyrat; dROM: derivatives of reactive oxygen metabolites; TBARS: Thiobarbituric acid reactive substances; AOPP/Alb.: advanced oxidation protein products/Albumin

#### 4.1.3 Gewebs- und laktationsspezifische Unterschiede in der Anzahl der mtDNA-Kopien

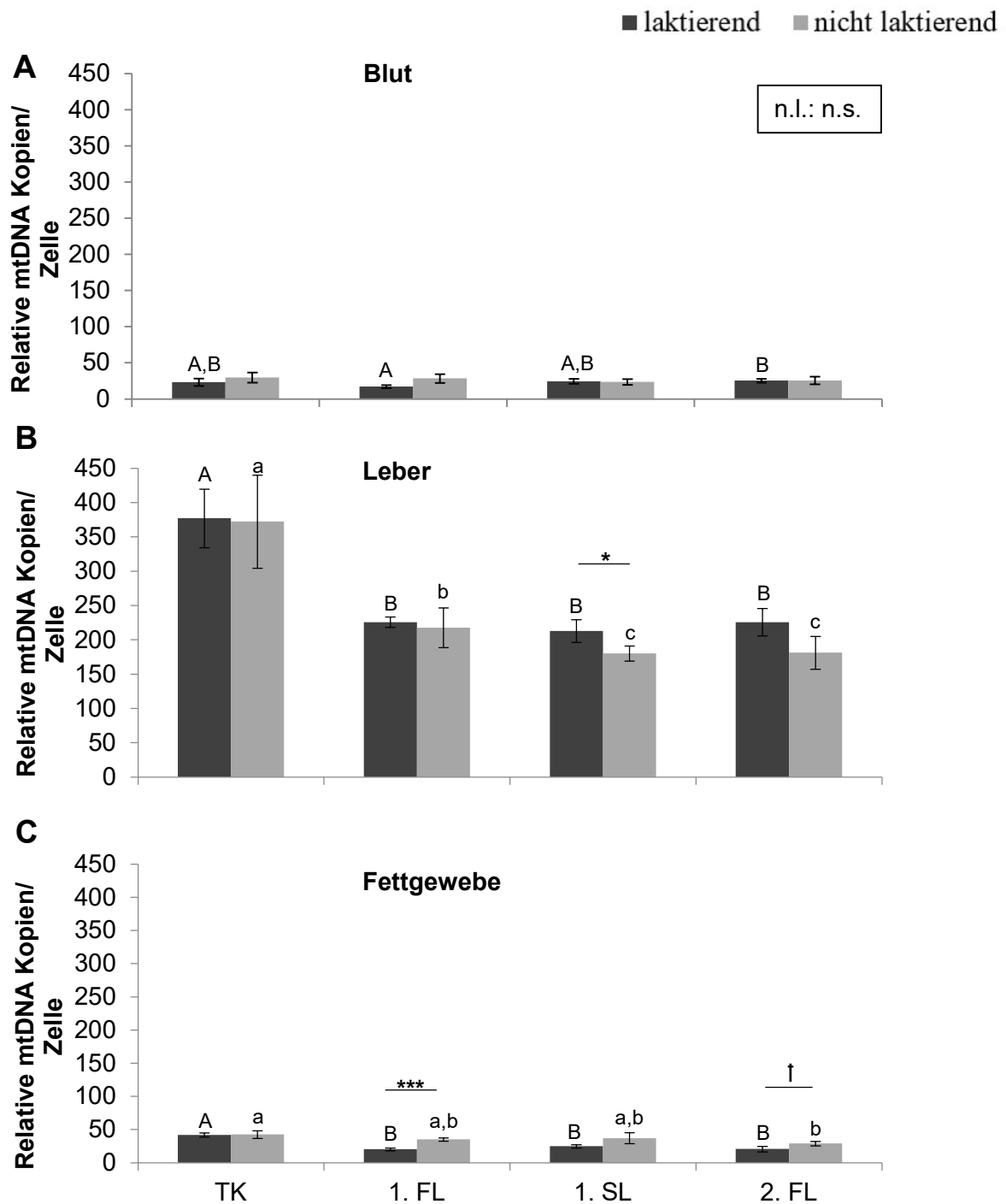
Die Anzahl der mtDNA-Kopien pro Zelle wurde im subkutanen Fettgewebe, in der Leber und im peripheren Blut von laktierenden und nicht laktierenden Kühen in der TK, der 1.FL, der 1. SL und der 2. FL bestimmt.

Im Blut stieg die Anzahl der mtDNA-Kopien pro Zelle bei den laktierenden Kühen von der 1.FL zur 2.FL um 48% ( $P = 0,035$ ; **Abbildung 14A**). Bei den nicht laktierenden Kühen gab es keinen Unterschied in der mtDNA-Kopienzahl zwischen den verschiedenen Zeitpunkten.

In der Leber der laktierenden Kühe war die Anzahl an mtDNA-Kopien zum Zeitpunkt der TK am höchsten: um jeweils 67% höher als in der 1. FL ( $P = 0,012$ ) und in der 2. FL ( $P = 0,012$ ) und um 77% höher als in der 1. SL ( $P = 0,012$ ; **Abbildung 14B**). Bei den nicht laktierenden Kühen war die Anzahl der mtDNA-Kopien ebenso zum Zeitpunkt der TK am höchsten: um 71% höher als in der 1. FL ( $P = 0,036$ ) und fast doppelt so hoch wie in der 1. SL ( $P = 0,025$ ) und in der 2. FL ( $P = 0,012$ ). Diese Tiere hatten in der 1. FL jeweils 20% mehr mtDNA-Kopien als in der 1. SL ( $P = 0,036$ ) und in der 2. FL ( $P = 0,012$ ). Beim Vergleich der zwei Tiergruppen hatten die nicht laktierenden Kühe in der 1. SL eine um 15% geringere Anzahl an mtDNA-Kopien als die laktierenden Kühe ( $P = 0,038$ ).

Auch im subkutanen Fettgewebe hatten die laktierenden Kühe die höchste mtDNA-Kopienzahl in der TK. Diese war fast doppelt so hoch wie in der 1. FL ( $P = 0,012$ ) und in der 2. FL ( $P = 0,017$ ) und um 68% höher als in der 1. SL ( $P = 0,012$ ; **Abbildung 14C**). Die nicht laktierenden Kühe hatten in der TK 47% mehr mtDNA-Kopien als in der 2. FL ( $P = 0,05$ ). Beim Vergleich der zwei Tiergruppen hatten die nicht laktierenden Kühe in der 1. FL eine um 73% höhere ( $P = 0,001$ ) und in der 2. FL eine tendenziell um 40% höhere ( $P = 0,065$ ) mtDNA-Kopienzahl als die laktierenden Kühe.

Beim Vergleich der Anzahl der mtDNA-Kopien der untersuchten Gewebe und des peripheren Blutes zeigte sich der höchste mtDNA-Gehalt in der Leber. Dieser war 8-mal höher als im subkutanen Fettgewebe ( $P < 0,001$ ) und 10-mal höher als im peripheren Blut ( $P < 0,001$ ).



**Abbildung 14:** Anzahl der mitochondrialen DNA (mtDNA) Kopien pro Zelle (Mittelwerte  $\pm$  SEM) in verschiedenen Geweben bei laktierenden ( $n = 8$ ) und nicht laktierenden Kühen ( $n = 8$ ). Blutproben (A) und Biopsien von Leber (B) und Fettgewebe (C) wurden in der TK (209 – 224 Tage a.p.), in der 1. FL (14 – 38 DIM), in der 1. SL (230 – 260 DIM) und in der 2. FL (22 – 34 DIM) entnommen.

Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Zeitpunkten, Großbuchstaben = laktierende Kühe, Kleinbuchstaben = nicht laktierende Kühe ( $P \leq 0,05$ ). Unterschiede zwischen beiden Tiergruppen während eines Zeitpunktes sind wie folgt gekennzeichnet: \*:  $P \leq 0,05$ ; \*\*\*:  $P \leq 0,001$ ; †:  $0,05 < P \leq 0,1$ ; n.s.: nicht signifikant.

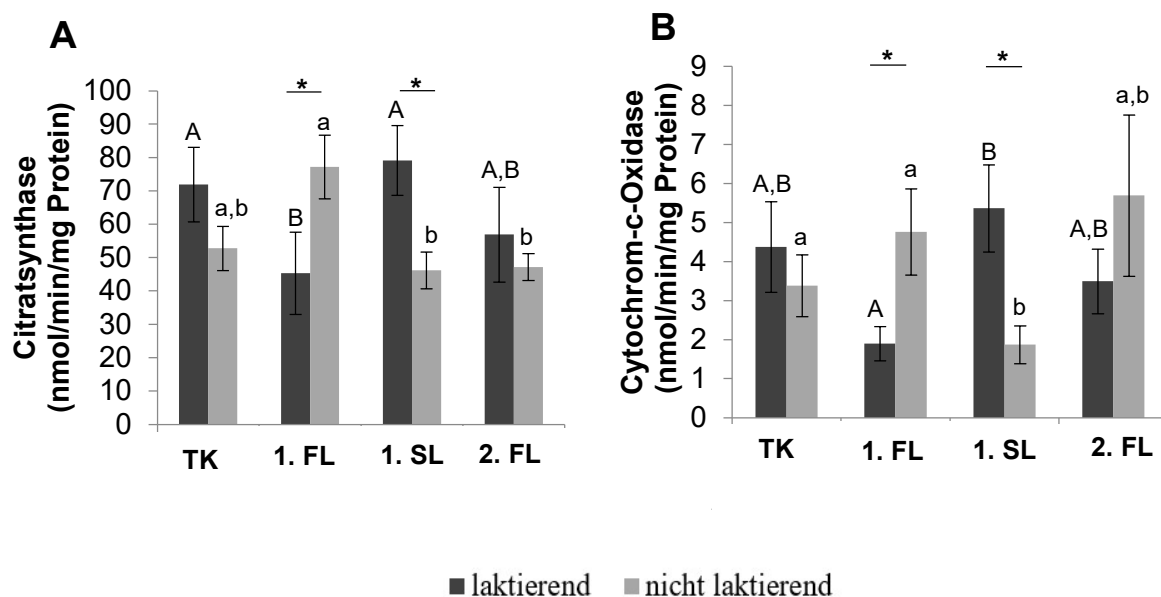
TK: Trächtigkeit; 1.FL: 1. Frühlaktation; 1. SL: 1. Spätlaktation; 2. FL: 2. Frühlaktation; n.l.: nicht laktierend

#### 4.1.4 Citrat-Synthase- und Cytochrom-c-Oxidase Aktivität im Fettgewebe

In der Abbildung 15 ist die Aktivität der CS und der COX im Fettgewebe dargestellt.

Die laktierenden Kühe wiesen die geringste CS-Aktivität in der 1. FL auf (**Abbildung 15A**). Diese war um 37% geringer als in der TK ( $P = 0,035$ ) und um 43% geringer als in der 1. SL ( $P = 0,015$ ). Im Gegensatz dazu war die CS-Aktivität bei den nicht laktierenden Kühen in der 1. FL am höchsten, um jeweils 65% höher als in der 1. SL ( $P = 0,012$ ) und in der 2. FL ( $P = 0,034$ ). Beim Vergleich der zwei Tiergruppen war die CS-Aktivität bei den nicht laktierenden Kühen in der 1. FL um 70% höher ( $P = 0,021$ ) und in der 1. SL um 42% geringer ( $P = 0,011$ ) als bei den laktierenden Kühen. Die COX-Aktivität war bei den laktierenden Kühen ebenfalls in der 1. FL am geringsten (**Abbildung 15B**). Diese war um 65% geringer als in der 1. SL ( $P = 0,043$ ). Die nicht laktierenden Kühe hatten in der 1. SL die geringste COX-Aktivität. Diese war um 45% geringer als in der TK ( $P = 0,046$ ) und um 61% geringer als in der 1. FL ( $P = 0,043$ ). Beim Vergleich der zwei Tiergruppen war die COX-Aktivität bei den nicht laktierenden Kühen in der 1. FL 2,5-mal höher ( $P = 0,021$ ) und in der 1. SL um 65% ( $P = 0,021$ ) geringer als bei den laktierenden Kühen.

Es wurde ein positiver Zusammenhang zwischen der CS- und der COX-Aktivität in der 1. SL bei den laktierenden Kühen ( $\rho = 0,881$ ;  $P = 0,004$ ) festgestellt.



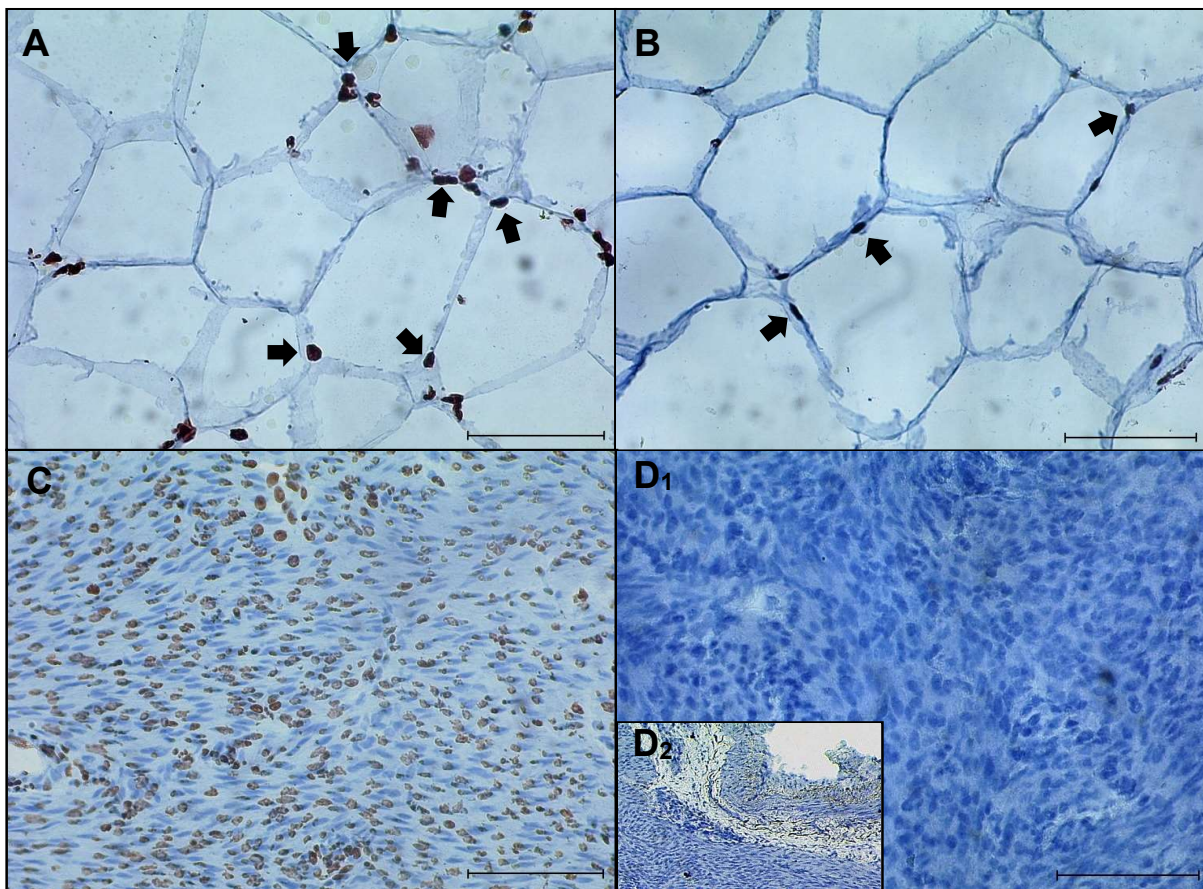
**Abbildung 15:** Aktivität der beiden mitochondrialen Enzyme Citratsynthase (**A**; nmol/min/mg Protein) und Cytochrom-c-Oxidase (**B**; nmol/min/mg Protein) im Fettgewebe von laktierenden und nicht laktierenden Kühen (je  $n = 8$ ) während der TK (209 - 224 Tage a.p.), der 1. FL (14 - 38 DIM), der 1. SL (230 - 260 DIM) und der 2. FL (22 - 34 DIM). Mittelwerte  $\pm$  SEM. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Zeitpunkten, Großbuchstaben = laktierende Kühe, Kleinbuchstaben = nicht laktierende Kühe ( $P \leq 0,05$ ). Unterschiede zwischen beiden Tiergruppen während eines Zeitpunktes sind mit \* gekennzeichnet. \*:  $P \leq 0,05$ .

TK: Trächtigkeit; 1.FL: 1. Frühlaktation; 1. SL: 1. Spätlaktation; 2. FL: 2. Frühlaktation

#### 4.1.5 Apoptoserate im subkutanen Fettgewebe und Adipozytengröße

Die apoptotischen Zellen im subkutanen Fettgewebe einer laktierenden Kuh (**A**) und deren nicht laktierendem Kontrolltier (**B**) in der 1. FL sind exemplarisch in der **Abbildung 16** durch die mit Pfeilen gekennzeichneten rot gefärbten Zellkerne dargestellt.

Die laktierenden Kühe hatten in der 1. FL 1,5-mal so viele apoptotische Zellen wie die nicht laktierenden Kühe ( $P = 0,05$ ). Diese Aussage spiegelt sich ebenso in der **Abbildung 17A** wider.

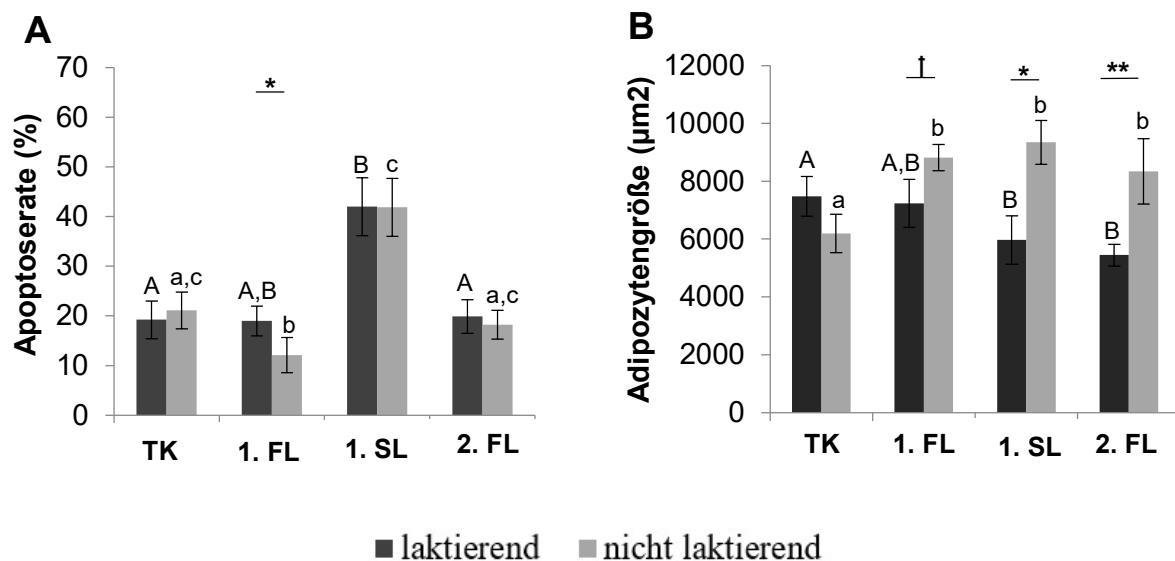


**Abbildung 16:** Beispiele für Apoptose (TUNEL – Test) positive Zellkerne in histologischen Schnitten des subkutanen Fettgewebes laktierender Kühe (**A**) und deren nicht laktierender Kontrolltiere (**B**) in der 1. FL. Als Positiv- (**C**) und Negativkontrolle (**D<sub>1</sub>**, **D<sub>2</sub>**) diente bovine Plazenta.

Vergrößerung: 200fach (**D<sub>2</sub>**: 100fach); positive, rot gefärbte Zellkerne sind durch Pfeile markiert; Skalierungsbalken entsprechen 100  $\mu\text{m}$ .

Die Apoptoserate der Adipozyten im subkutanen Fettgewebe und die Adipozytengröße sind in der Abbildung 17 dargestellt. Die laktierenden Kühe wiesen die höchste Apoptoserate in der 1. SL auf (**Abbildung 17A**). Diese war in etwa doppelt so hoch wie die in der TK ( $P = 0,05$ ) und die in der 2. FL ( $P = 0,017$ ). Die nicht laktierenden Kühe hatten ebenfalls die höchste Apoptoserate in der 1. SL und zeigten im Vergleich zur 1. FL eine 3,5-mal höhere Apoptoserate ( $P = 0,017$ ). In der TK hatten diese Tiere im Vergleich zur 1. FL eine um 74% höhere Apoptoserate ( $P = 0,036$ ) und in der 2. FL eine um 50% höhere Apoptoserate als in der 1. FL ( $P = 0,05$ ). Beim Vergleich der zwei Tiergruppen hatten die laktierenden Kühe in der 1. FL eine um 57% höhere Apoptoserate als die nicht laktierenden Kühe ( $P = 0,05$ ).

Die Adipozyten der laktierenden Kühe waren in der TK um 25% größer als in der 1. SL ( $P = 0,05$ ) und um 37% größer als in der 2. FL ( $P = 0,036$ ; **Abbildung 17B**). Bei den nicht laktierenden Kühen waren die Adipozyten in der TK am kleinsten; um 30% kleiner als in der 1. FL ( $P = 0,017$ ), um 34% kleiner als in der 1. SL ( $P = 0,012$ ) und um 26% kleiner als in der 2. FL ( $P = 0,012$ ). Die laktierenden Kühe hatten im Vergleich zu den nicht laktierenden Kühen in der 1. FL tendenziell um 18% ( $P = 0,065$ ), in der 1. SL und in der 2. FL jeweils um 35% ( $P = 0,015$ ;  $P = 0,010$ ) kleinere Adipozyten.



**Abbildung 17:** Apoptoserate im subkutanen Fettgewebe (**A**) und Adipozytengröße (**B**) von laktierenden und nicht laktierenden Kühen (je  $n = 8$ ) in der TK (209 - 224 Tage a.p.), in der 1. FL (14 - 38 DIM), in der 1. SL (230 - 260 DIM) und in der 2. FL (22 - 34 DIM). Mittelwerte  $\pm$  SEM. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Zeitpunkten, Großbuchstaben = laktierende Kühe, Kleinbuchstaben = nicht laktierende Kühe ( $P \leq 0,05$ ). Unterschiede zwischen beiden Tiergruppen während eines Zeitpunktes sind mit \* gekennzeichnet:

\*:  $P \leq 0,05$ ; \*\*:  $P \leq 0,01$ ; †:  $0,05 < P \leq 0,1$ .

TK: Trächtigkeit; 1.FL: 1. Frühlaktation; 1. SL: 1. Spätlaktation; 2. FL: 2. Frühlaktation



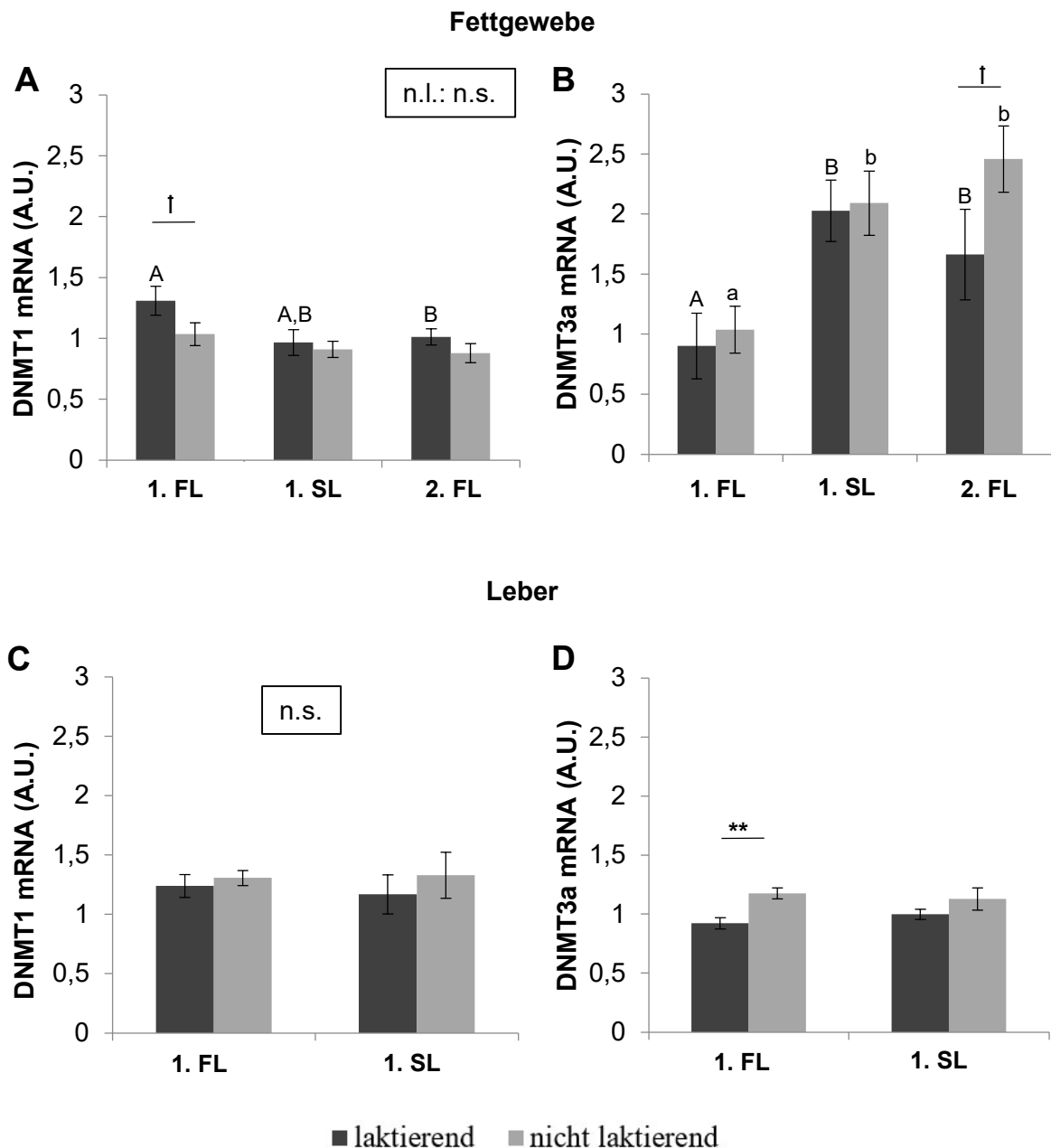
#### 4.1.6 Gewebs- und laktationsspezifische Veränderungen der Telomerlänge und der mRNA Expression der DNA-Methyltransferasen

Die relative Menge an qT wurde im subkutanen Fettgewebe und in der Leber bestimmt, wobei es bei beiden Geweben in Bezug auf Laktation und Biopsiezeitpunkt keine signifikanten Unterschiede gab.

Die Erhaltungsmethyltransferase DNMT1 und die *de-novo* Methyltransferase DNMT3a wurden ebenfalls im subkutanen Fettgewebe und in der Leber gemessen, die Ergebnisse sind in Abbildung 18 dargestellt.

Im Fettgewebe zeigte sich bei den laktierenden Kühen die höchste DNMT1 mRNA Expression in der 1. FL (**Abbildung 18A**). Diese war um 30% höher als in der 2. FL ( $P = 0,032$ ) und ebenfalls um 30% höher als bei den nicht laktierenden Kühen in der 1. FL ( $P = 0,078$ ). In Bezug auf die Biopsiezeitpunkte gab es bei den nicht laktierenden Kühen keine Unterschiede in der Expression der DNMT1 mRNA. Im Gegensatz zur DNMT1 mRNA Expression war sowohl bei den laktierenden als auch bei den nicht laktierenden Kühen die DNMT3a mRNA Expression in der 1. FL am geringsten (**Abbildung 18B**). Die laktierenden Kühe hatten in der 1. SL eine 2,3-mal höhere ( $P = 0,018$ ) und in der 2. FL eine 1,8-mal höhere ( $P = 0,046$ ) DNMT3a mRNA Expression als in der 1. FL. Die nicht laktierenden Kühe hatten in der 1. SL eine doppelt so hohe ( $P = 0,018$ ) und in der 2. FL eine 2,4-mal höhere ( $P = 0,028$ ) DNMT3a Expression als in der 1. FL. Beim Vergleich dieser zwei Tiergruppen war die DNMT3a mRNA Expression im Fettgewebe bei den nicht laktierenden Kühen in der 2. FL tendenziell um 48% höher als bei den laktierenden Kühen ( $P = 0,073$ ).

In der Leber gab es in der Expression der DNMT1 mRNA in Bezug auf Laktation und Biopsiezeitpunkt keine Unterschiede (**Abbildung 18C**). Lediglich in der Expression der DNMT3a mRNA wurde beim Vergleich der laktierenden und nicht laktierenden Kühe ein Unterschied festgestellt. Letztere hatten in der 1. FL eine um 28% höhere DNMT3a mRNA Expression als die laktierenden Kühe ( $P = 0,002$ ; **Abbildung 18D**).



**Abbildung 18:** Menge der mRNA von Methyltransferase DNMT1 (A) und DNMT3a (B) im Fettgewebe laktierender und nicht laktierender Kühe in der 1. FL (14 - 38 DIM; l.: n = 7; n.l.: n = 8), in der 1. SL (230 - 260 DIM; l.: n = 8; n.l.: n = 7) und in der 2. FL (22 - 34 DIM; l.: n = 7; n.l.: n = 8). Methyltransferase DNMT1 (C) und DNMT3a (D) in der Leber laktierender und nicht laktierender Kühe in der 1. FL (14 - 38 DIM; l.: n = 8; n.l.: n = 8) und in der 1. SL (230 - 260 DIM; l.: n = 3; n.l.: n = 3).

Mittelwerte  $\pm$  SEM. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Zeitpunkten, Großbuchstaben = laktierende Kühe, Kleinbuchstaben = nicht laktierende Kühe ( $P \leq 0,05$ ). Unterschiede zwischen beiden Tiergruppen während eines Zeitpunktes sind wie folgt gekennzeichnet: \*\*:  $P \leq 0,01$ ; †:  $0,05 < P \leq 0,1$ ; n.s.: nicht signifikant.

1.FL: 1. Frühlaktation; 1. SL: 1. Spätlaktation; 2. FL: 2. Frühlaktation; l.: laktierend; n.l.: nicht laktierend

#### **4.1.7 Zusammenhänge zwischen der Apoptoserate und der zellulären Energieversorgung sowie der Zellalterung im subkutanen Fettgewebe**

Die Zusammenhänge zwischen dem Apoptoserate und der zellulären Energieversorgung sowie der Zellalterung im subkutanen Fettgewebe unter Berücksichtigung der oxidativen Stressparameter dROM, TBARS und AOPP sind in der **Tabelle 4** dargestellt.

**Tabelle 4:** Spearman-Rho Korrelationskoeffizienten zwischen der Apoptoserate, den oxidativen Stressparametern (dROM, TBARS, AOPP/Alb.) und der zellulären Energieversorgung (mtDNA, CS, COX) sowie der Zellalterung (qT, DNMT3a) im subkutanen Fettgewebe von laktierenden und nicht laktierenden Kühen ohne Berücksichtigung der verschiedenen Biopsiezeitpunkte (je n = 32).

|                  | zelluläre Energieversorgung      |                                   |                                  |                                   |                                  |                                   | Zellalterung |                                   |                                   |      |
|------------------|----------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|--------------|-----------------------------------|-----------------------------------|------|
|                  | mtDNA                            |                                   | CS                               |                                   | COX                              |                                   | qT           |                                   | DNMT3a                            |      |
|                  | L                                | NL                                | L                                | NL                                | L                                | NL                                | L            | NL                                | L                                 | NL   |
| <b>Apoptose</b>  | n.s.                             | <i><math>\rho = -0,298</math></i> | n.s.                             | <b><math>\rho = -0,552</math></b> | n.s.                             | <b><math>\rho = -0,414</math></b> | n.s.         | n.s.                              | n.s.                              | n.s. |
| <b>dROM</b>      | n.s.                             | n.s.                              | n.s.                             | n.s.                              | n.s.                             | n.s.                              | n.s.         | <b><math>\rho = -0,457</math></b> | n.s.                              | n.s. |
| <b>TBARS</b>     | <b><math>\rho = 0,346</math></b> | n.s.                              | n.s.                             | n.s.                              | n.s.                             | n.s.                              | n.s.         | n.s.                              | <b><math>\rho = -0,486</math></b> | n.s. |
| <b>AOPP/Alb.</b> | n.s.                             | n.s.                              | <i><math>\rho = 0,297</math></i> | n.s.                              | <b><math>\rho = 0,447</math></b> | n.s.                              | n.s.         | n.s.                              | n.s.                              | n.s. |

**Hervorgehoben:**  $P \leq 0,05$ ; *Kursiv:*  $0,05 < P \leq 0,1$ ; n.s.: nicht signifikant;

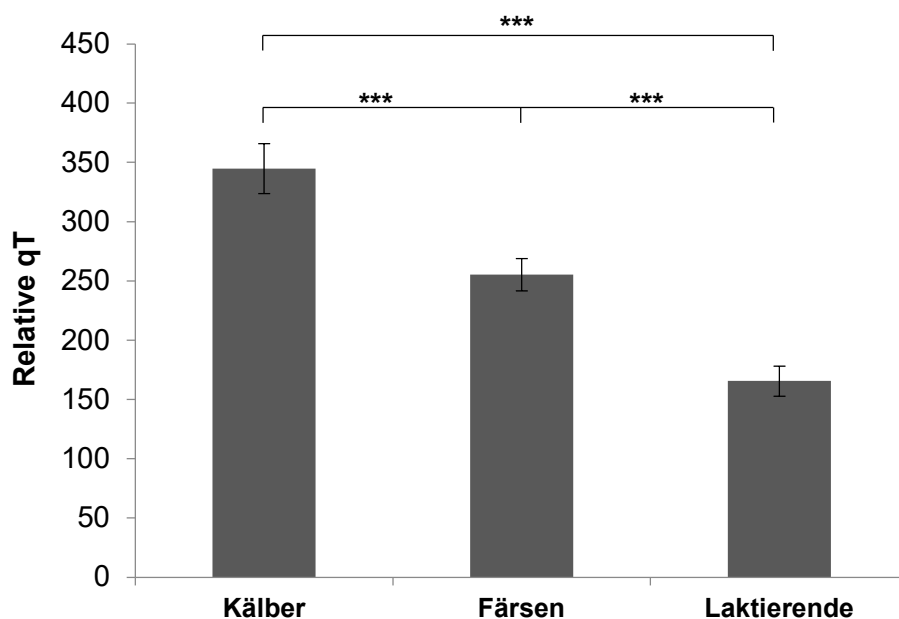
L: laktierende Kühe; NL: nicht laktierende Kühe; mtDNA: mitochondriale DNA; CS: Citrat-Synthase; COX: Cytochrom-c-Oxidase; qT: relative Telomerlänge; DNMT3a: DNA-Methyltransferase 3a; dROM: derivatives of reactive oxygen metabolites; TBARS: Thiobarbituric acid reactive substances; AOPP/Alb.: advanced oxidation protein products/Albumin

Bei den laktierenden Kühen gab es einen positiven Zusammenhang zwischen der mtDNA-Kopienzahl und der CS-Aktivität ( $\rho = 0,388$ ;  $P = 0,028$ ), wohingegen sich die CS-Aktivität und die DNMT1 mRNA Expression ( $\rho = -0,490$ ;  $P = 0,021$ ) gegenteilig beeinflussten. Es wurde ein positiver Zusammenhang einerseits zwischen der CS- und COX-Aktivität ( $\rho = 0,483$ ;  $P = 0,006$ ) und andererseits zwischen der mtDNA-Kopienanzahl und der Adiponektinkonzentration ( $\rho = 0,486$ ;  $P = 0,005$ ) ermittelt. Bei den laktierenden Kühen konnte in der Spätlaktation auch ein positiver Zusammenhang zwischen dem Körpergewicht dieser Tiere und der mtDNA-Kopienzahl ( $\rho = 0,790$ ;  $P = 0,020$ ) festgestellt werden. Das Körpergewicht und die Adiponektinkonzentration ( $\rho = -0,384$ ;  $P = 0,03$ ) korrelierten bei diesen Tieren negativ, wohingegen zwischen dem Körpergewicht und der Leptinkonzentration ( $\rho = 0,370$ ;  $P = 0,044$ ) der nicht laktierenden Tiere ein positiver Zusammenhang ermittelt wurde. Auch die Apoptoserate und die Adipozytengröße ( $\rho = -0,304$ ;  $P = 0,09$ ) beeinflussten sich bei den laktierenden Tieren tendenziell gegenteilig. Bei diesen Tieren wurde ein positiver Zusammenhang zwischen der NEFA- und der BHB-Konzentration ( $\rho = 0,470$ ;  $P = 0,008$ ) festgestellt.

## 4.2 Versuch 2

### 4.2.1 Teilversuch 1: nasale Tupferproben - Kälber, Färsen und laktierende Kühe

In **Abbildung 19** ist die relative Menge an qT in den nasalen Epithelzellen von weiblichen Kälbern, Färsen und laktierenden Kühen dargestellt. Dabei zeigte sich, dass die Kälber die längsten Telomere besitzen. Diese waren um 35% länger als bei den Färsen ( $P = 0,001$ ) und doppelt so lang wie bei den laktierenden Kühen ( $P < 0,001$ ). Die Färsen hatten um 54% längere Telomere als die laktierenden Kühe ( $P < 0,001$ ).



**Abbildung 19:** Relative Menge an Telomerprodukten (qT; Mittelwerte  $\pm$  SEM) in den nasalen Epithelzellen von weiblichen Kälbern ( $n = 16$ ,  $< 6$  Monate), Färsen ( $n = 20$ ,  $> 6$  Monate  $< 1$ . Laktation) und laktierenden Kühen ( $n = 20$ , 1. - 3. Laktation).

Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind gekennzeichnet (\*\*\*:  $P \leq 0.001$ ).

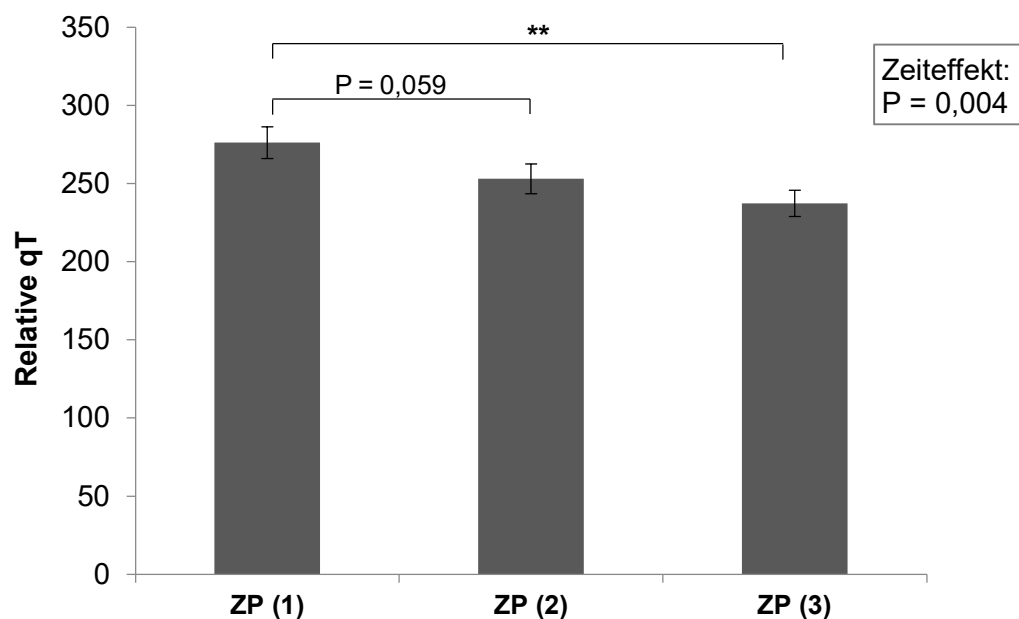
Die weiblichen Kälber ( $n = 16$ ; qT:  $345 \pm 21$ ) unterschieden sich in der relativen Menge an qT von den männlichen Kälbern ( $n = 3$ ; qT:  $247 \pm 34$ ). Diese hatten um 40% längere Telomere als die männlichen Kälber ( $P = 0,073$ ).

#### 4.2.2 Teilversuch 2: nasale Tupferproben – Kälber (3 Zeitpunkte)

Für die nasale Tupferprobenentnahme wurden in diesem Teilversuch dieselben 16 weiblichen Kälber aus Teilversuch 1 ausgewählt. Bei dieser Vergleichsgruppe wurden die Proben zu drei verschiedenen Zeitpunkten entnommen. Zur ersten nasalen Tupferprobenentnahme (Zeitpunkt 1; ZP 1) waren die Kälber in einem Alter von höchstens 6 Monaten. Die zweite nasale Tupferprobenentnahme (Zeitpunkt 2; ZP 2) erfolgte 6 Monate später und die dritte Entnahme (Zeitpunkt 3; ZP 3) erfolgte nochmals 12 Monate später.

Die dabei in der DNA der nasalen Epithelzellen gemessene relative Menge an qT ist in **Abbildung 20** dargestellt.

Die Kälber hatten zum ZP 1 um 9% längere Telomere als zum ZP 2 ( $P = 0,059$ ) und um 16% längere Telomere als zum ZP 3 ( $P = 0,003$ ).

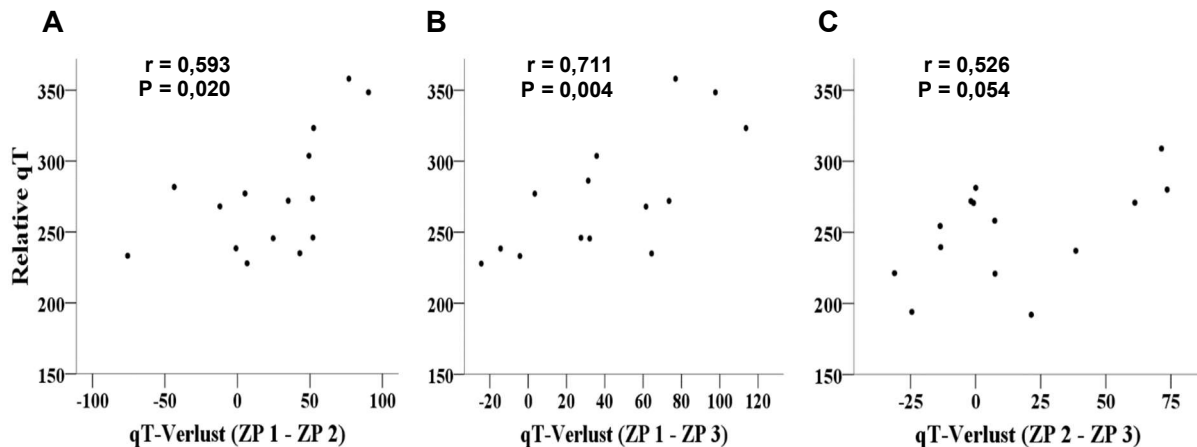


**Abbildung 20:** Relative Menge an Telomerprodukten (qT; Mittelwerte  $\pm$  SEM) in den nasalen Epithelzellen von weiblichen Kälbern zum Zeitpunkt 1 ( $n = 16$ , Alter  $\leq 6$  Monate), Zeitpunkt 2 ( $n = 16$ , ZP (1) + 6 Monate) und Zeitpunkt 3 ( $n = 15$ , ZP (2) + 12 Monate).

Signifikante Unterschiede zwischen den Zeitpunkten sind gekennzeichnet (\*\*:  $P \leq 0,01$ ).

Es zeigte sich ein positiver Zusammenhang zwischen der relativen qT (ZP 1) und dem qT-Verlust vom ZP 1 zum ZP 2 ( $r = 0,593$ ;  $P = 0,020$ ; **Abbildung 21A**) sowie dem qT-Verlust vom ZP 1 zum ZP 3 ( $r = 0,711$ ;  $P = 0,004$ ; **Abbildung 21B**).

Von ZP 2 zu ZP 3 gab es einen positiven Zusammenhang zwischen der relativen qT (ZP 2) und dem qT-Verlust ( $r = 0,526$ ;  $P = 0,054$ ; **Abbildung 21C**).

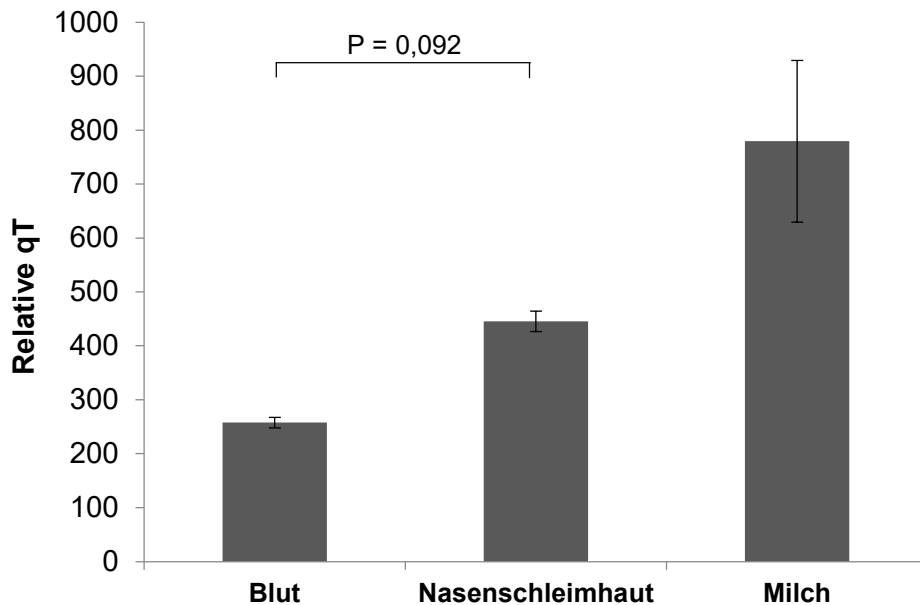


**Abbildung 21:** Zusammenhang zwischen der relativen Menge an Telomerprodukten (qT) von weiblichen Kälbern zum Zeitpunkt 1 und dem qT-Verlust vom Zeitpunkt 1 (ZP 1; Alter  $\leq 6$  Monate) zum Zeitpunkt 2 (ZP 2; ZP (1) + 6 Monate; **A**;  $n = 15$ ) sowie vom ZP 1 zum Zeitpunkt 3 (ZP 3; ZP (2) + 12 Monate; **B**;  $n = 14$ ). In der dritten Abbildung wird der Zusammenhang zwischen der relativen Menge an qT von weiblichen Kälbern zum Zeitpunkt 2 und dem qT-Verlust vom ZP 2 zum ZP 3 (**C**;  $n = 14$ ) gezeigt.  $P \leq 0,05$ .



#### 4.2.3 Teilversuch 3: Blut-, nasale Tupfer- und Milchproben – laktierende Kühe

In diesem Teilversuch wurden 12 Tiere der 2. und 3. Laktation (n = je 6) aus der Gruppe der laktierenden Kühe beprobt. Es wurden Heparin-Vollblutproben, nasale Tupferproben und Milchproben zur Isolierung der DNA entnommen. Die gemessene relative Menge an qT im Blut, in der Nasenschleimhaut und in der Milch der laktierenden Kühe ist in **Abbildung 22** dargestellt.



**Abbildung 22:** Relative Menge an Telomerprodukten (qT; Mittelwerte ± SEM) im Blut (n = 12), in der Nasenschleimhaut (nasale Epithelzellen; n = 12) und in der Milch (n = 10) von laktierenden Kühen,  $0,05 < P \leq 0,1$ .

Es wurde ein positiver Zusammenhang zwischen der TL im Blut und der DNA der nasalen Epithelzellen ( $r = 0,532$ ;  $P = 0,092$ ;  $n = 11$ ) ermittelt. Im Gegensatz dazu konnte kein Zusammenhang zwischen der TL im Blut und in der Milch festgestellt werden.

Die TL in der Milch korrelierte stark negativ mit den Zellzahlgehalten in der Milch ( $\rho = -0,770$ ;  $P = 0,009$ ). Die Kühe der 3. Laktation hatten mit durchschnittlich  $92.580 \pm 18.780$  Zellen/mL Milch um 33% höhere Zellzahlgehalte als die Kühe der 2. Laktation ( $P = 0,1$ ). In Bezug auf die relative Menge an qT in der Milch wurde zwischen der 2. und 3. Laktation kein Unterschied festgestellt. Ein Zusammenhang zwischen der TL in der Milch und der Laktationstage sowie der Milchmenge wurde nicht ermittelt.

## 5 Diskussion

### 5.1 Versuch 1

Mit dem Einsetzen der Laktation, die einen großen Einfluss auf den Energiebedarf hochleistender Milchkühe hat, erhöht sich vor allem durch die Intensivierung der Milchleistung der Nährstoffbedarf so enorm, dass die dafür benötigte Energie nicht ausreichend über die aufgenommene Nahrung bereitgestellt werden kann (Bell, 1995; Grummer, 1995). Diese Anpassung an die Laktation erfordert eine entsprechende Regulierung und Koordinierung des Energiestoffwechsels zwischen wichtigen Organen wie zum Beispiel des Fettgewebes und der Leber (Block et al., 2001). Mitochondrien stellen die Hauptquelle für die Energieproduktion in Säugetierzellen dar und die mtDNA-Kopienzahl, die die Anzahl an Mitochondrien in einer Zelle widerspiegelt, kann sich dem aktuellen Energiebedarf der Zelle und den zellulären Umweltbedingungen anpassen (Jakobs et al., 2003; Kaaman et al., 2007; Al-Kafaji & Golbahar, 2013). Ein Rückgang der Anzahl an mtDNA-Kopien könnte im Zusammenhang mit einer altersbedingten Reduzierung des Energiestoffwechsels stehen (Clay Montier et al., 2009). Neben den Mitochondrien nehmen auch die Telomere im physiologischen Alterungsprozess eine wichtige Rolle ein (Passos et al., 2007).

#### 5.1.1 Gewebs- und laktationsspezifische Unterschiede in der Anzahl der mtDNA Kopien

Die Menge an mtDNA-Kopien pro Zelle variiert je nach Art des Gewebes (Clay Montier et al., 2009) und wird durch die Laktation und dem damit verbundenem erhöhten Energieumsatz beeinflusst (Valencak et al., 2016). Laubenthal et al. (2016a) beschrieben einen höheren mitochondrialen Energieumsatz in der Leber bei laktierenden Kühen im Vergleich zu Fettgewebe, Eutergewebe und Blut. In der vorliegenden Studie wurden ebenfalls die meisten mtDNA-Kopien in der Leber ermittelt. Beim Vergleich der 2 Tiergruppen hatten die laktierenden Kühe in der 1. SL einen höheren mtDNA-Gehalt als die nicht laktierenden Kontrolltiere. Bei dem Wiederaufbau der Fettreserven in der SL durch die energieverbrauchende Lipogenese spielen Mitochondrien als Energieproduzenten eine wichtige Rolle. Dabei wird über eine Erhöhung der Mitochondrienzahl und somit einer Erhöhung der mtDNA-Kopienzahl eine ausreichende Energieversorgung der Zellen gewährleistet (Kaaman et al., 2007; De Pauw et al., 2009; Lu et al., 2010).

Die Leber als zentrales Stoffwechselorgan übernimmt eine wichtige Rolle bei der Regulierung der verschiedenen Stoffwechselforgänge bei der Milchkuh wie zum Beispiel der des Fettstoffwechsels (Weber et al., 2017). In der vorliegenden Studie wurde bei den laktierenden Kühen ein Anstieg der Cholesterinkonzentration von der 1. FL zur 1. SL festgestellt. Diese

Erhöhung könnte mit einer Erhöhung des Fettstoffwechsels zusammenhängen, da die in der FL verbrauchten Energiereserven regeneriert werden müssen, damit sie für die nächste Laktation wieder zur Verfügung stehen. Auch dass die laktierenden Tiere in der 1. SL eine fast doppelt so hohe Cholesterinkonzentration als die nicht laktierenden Tiere aufwiesen, verstärkt die Annahme einer laktationsbedingten Erhöhung des Fettstoffwechsels in der SL.

Der hohe Energiebedarf der Milchkuh in der FL wird durch eine starke Mobilisierung von Fettreserven (Lipolyse) kompensiert, die wiederum zu einer Erhöhung der Fettsäuren (NEFA) im Blut führt (Drackley, 1999; Adewuyi et al., 2005). Ein Anzeichen der daraus resultierenden negativen EB stellen NEFA-Konzentrationen  $> 0,2$  mmol/l (Drackley, 2000) dar. In der vorliegenden Studie erhöhte sich die NEFA-Konzentration bei den laktierenden Kühen in der 1. FL im Vergleich zur TK. Auch im Vergleich zu den nicht laktierenden Kühen zeigten die Laktierenden in der 1. FL höhere NEFA-Konzentrationen. Ein weiteres Anzeichen für eine negative EB stellt die nach der Geburt steigende BHB-Konzentration dar (Bell, 1995). Auch in der vorliegenden Arbeit waren die NEFA- und BHB-Konzentrationen der laktierenden Kühe positiv korreliert.

In der 2. FL hatten die laktierenden Kühe einen höheren mtDNA – Gehalt im Blut als in der 1. FL, was auf einen erhöhten Energiebedarf wegen der höheren Milchleistung in der 2. FL zurückzuführen ist. In Bezug auf die EB befanden sich die laktierenden Kühe in der SL im Vergleich zur 1. FL infolge der abfallenden Milchleistungskurve und der vermutlich steigenden Futteraufnahme in einer positiven EB. Diese erreichten die Tiere jedoch erst nach 25 Laktationswochen (175 DIM) und nicht wie durchschnittlich angegeben nach 15 Laktationswochen (Coppock, 1985). Eine Erklärung dafür könnte sein, dass Färsen in der ersten Laktation eine intensive Mobilisation von Fettreserven zeigen. Zudem müssen sie zusätzlich einen erheblichen Bedarf für ihr Wachstum decken, sodass einerseits der Energiebedarf für Laktations- und andererseits für Wachstumsleistungen bereitgestellt werden muss und sich die Tiere somit in einer längeren Phase der negativen EB befinden (Rossow, 2004). Während der negativen EB können vermehrt Infektions- und Stoffwechselkrankheiten auftreten (Drackley, 1999). Haptoglobin, ein Akute-Phase-Protein, das in Folge von Verletzungen oder Infektionen erhöht ist, wird zunehmend zur routinemäßigen Analyse von Entzündungen und unterschiedlichen Erkrankungen eingesetzt (Jawor et al., 2008; Huzzey et al., 2009). Laut der Studie von Saremi et al. (2012) und Jawor et al. (2016) kommt es bei primiparen Kühen in der ersten Woche nach der Kalbung zu einem Anstieg der Haptoglobinkonzentration. In der vorliegenden Studie lag die Haptoglobinkonzentration nach der Kalbung (1. FL) im Bereich des von Jawor et al. (2008) beschriebenen Normalwertes für gesunde Kühe ( $< 0,1$  g/L). Ebenfalls wie bei Jawor et al. (2016) beeinflussten die in der vorliegenden Arbeit während der Laktation durchgeführten Leberbiopsien die Haptoglobinkonzentration nicht.

Dass Kühe in der 1. Laktation eine negativere EB haben als in der 2. Laktation (Pettersson et al., 2006) konnte auch in dieser Studie festgestellt werden. Einerseits benötigen die Kühe, von dem in der 2. Laktation höheren Energiebedarf aufgrund höherer Milchleistung, nicht mehr so viel Energie um ihre Wachstumsleistung zu decken, was sich auch in einer Körpermassenzunahme von der 1. zur 2. Laktation von etwa 8% widerspiegelt. Andererseits hat die Milchkuh in der 1. Laktation den Wechsel zwischen der Mobilisation von Fettreserven (Lipolyse) in der FL und ihrem Wiederaufbau (Lipogenese) in der SL (Lanna et al., 1995) schon einmal durchlaufen und ist somit für einen erneuten Wechsel zwischen Lipolyse und Lipogenese in der 2. Laktation besser angepasst, was sich auch in einer niedrigeren Haptoglobinkonzentration in der 2. FL widerspiegelt. Auch die Milchmenge stieg in der vorliegenden Studie von der 1. zur 2. Laktation. Ray et al. (1992) und Vijayakumar et al. (2017) beschrieben ebenso eine Erhöhung der Milchmenge mit zunehmender Laktationsnummer, was auf eine zunehmende Entwicklung und Volumenzunahme des Euters mit Erhöhung der Menge an sekretorischen Zellen zurückzuführen ist (Sorensen et al., 2006). Vor allem in der 1. Laktation befinden sich die Kühe in einer Wachstumsphase, das Euter ist noch nicht vollständig entwickelt und leistungsfähig (Vijayakumar et al., 2017). Bei Laubenthal et al. (2016a) zeigte sich ein tendenzieller Anstieg der mtDNA-Kopienanzahl im Eutergewebe von der FL zur SL.

Der Wechsel zwischen Lipolyse und Lipogenese zeigt sich besonders durch die Veränderung der Adipozytengröße, welche in der FL in Abhängigkeit vom Energiebedarf um bis zu 63% abnimmt und mit dem verstärkten Körperfettansatz in der SL wieder zunimmt (Smith & McNamara, 1990). In der vorliegenden Studie konnten weder Änderungen in Bezug auf die Adipozytengröße noch auf den BCS in der FL und SL der laktierenden Kühe festgestellt werden. Allerdings erhöhte sich das Körpergewicht von der 1. FL zur SL um 5,5%. Da der Wechsel zwischen Lipolyse und Lipogenese in Zusammenhang mit der Laktation steht, scheint eine Änderung der Adipozytengröße ebenfalls laktationsabhängig zu sein. Auch in der vorliegenden Arbeit waren die Adipozyten im subkutanen Fettgewebe der laktierenden Kühe in der 1. FL um 18%, in der 1. SL und 2. FL jeweils um 35% kleiner als die der nicht laktierenden Tiere, was eine laktationsabhängige Änderung der Adipozytengröße widerspiegelt. Während der energieverbrauchenden Lipogenese spielen Mitochondrien durch die Produktion und Bereitstellung von ATP eine wichtige Rolle (De Pauw et al., 2009; Lu et al., 2010). Der mtDNA-Gehalt im humanen weißen Fettgewebe steht somit in engem Zusammenhang mit der Lipogenese (Kaaman et al., 2007). In der vorliegenden Studie wurde ein positiver Zusammenhang zwischen dem Körpergewicht der laktierenden Kühe und deren Anzahl an mtDNA-Kopien im subkutanen Fettgewebe in der SL festgestellt.

Adiponektin, ein Peptidhormon des Fettstoffwechsels (Hulgan et al., 2013) wird vermehrt in kleinen Fettzellen, wozu die neu differenzierten Adipozyten zählen, synthetisiert (Yu & Zhu,

2004). Die Differenzierung der Adipozyten erfordert viel Energie, was mit einer Erhöhung der Mitochondrienanzahl und somit des mtDNA-Gehaltes einhergeht. Dieser Zusammenhang zwischen der Mitochondrienfunktion und der Synthese von Adiponektin (Koh et al., 2007) spiegelte sich auch in der positiven Korrelation zwischen der mtDNA-Kopienanzahl im subkutanen Fettgewebe und der Plasma-Adiponektinkonzentration bei den laktierenden Tieren in der vorliegenden Studie wider. Zum Zeitpunkt der FL (Kalbung) erreichten die Tiere die niedrigste Adiponektinkonzentration (Singh et al., 2014). Bei Menschen und Pferden wurde ein Rückgang der Adiponektinkonzentration bei gleichzeitiger Zunahme an Körpermasse beobachtet (Kern et al., 2003; Kearns et al., 2006). Auch bei den laktierenden Kühen konnte in der vorliegenden Studie eine negative Korrelation zwischen Adiponektin und dem Körpergewicht festgestellt werden. Leptin, ein weiteres Fettgewebshormon, wird fast ausschließlich vom weißen Fettgewebe produziert und sezerniert (Zhang et al., 1994). Es beeinflusst die Nahrungsaufnahme, indem es Informationen über die Menge an Fettgewebe und den Ernährungszustand an das zentrale Nervensystem und periphere Organe übermittelt und über spezielle Regionen des Hypothalamus somit die Nahrungsaufnahme und den Energieverbrauch reguliert (Pellemounter et al., 1995; Ahima et al., 1996; Prolo et al., 1998). Die Plasmaspiegel von Leptin korrelieren positiv mit der Menge der im weißen Fettgewebe abgelagerten Lipiden (Pratley et al., 1997). In der vorliegenden Studie wurde bei den nicht laktierenden Kühen ein positiver Zusammenhang zwischen der Leptinkonzentration und dem Körpergewicht dieser Tiere ermittelt. Neben den Wirkungen am zentralen Nervensystem wird für Leptin unter anderem auch eine Wirkung bei der Reproduktion beschrieben (Chehab et al., 1997). Ratten, die mit Progesteron behandelt wurden, zeigten eine geringere Freisetzung von Leptin als Ratten ohne Progesteronbehandlung (Abelenda & Puerta, 2004). Die hemmende Wirkung von Progesteron auf Leptin, die bei Rattenversuchen nachgewiesen wurde (Grueso et al., 2001; Abelenda & Puerta, 2004), konnte in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Progesteron, auch Gelbkörperhormon oder Trächtigkeitsschutzhormon genannt, wird beim Rind im Corpus luteum der Ovarien gebildet (Ruiz et al., 1989; Schnurrbusch & Vogler, 2005). Es schafft für die Aufnahme und Entwicklung des Embryos optimale Bedingungen, indem es die Gebärmutterschleimhaut anregt nährstoffreiches Sekret zur Ernährung der Frucht zu bilden und ist somit Voraussetzung für eine TK (Bostedt, 2003). Bei erfolgreicher Besamung bleibt der Gelbkörper über die gesamte TK erhalten, sodass Progesteron im Blut, Urin, Kot und in der Milch nachweisbar ist (Hoffmann & Hamburger, 1973; Schnurrbusch & Vogler, 2005). Kurz vor und während der Geburt nimmt die Progesteronproduktion abrupt ab (Concannon et al., 1977). Dass die im peripheren Blut gemessenen Progesteronkonzentrationen in unmittelbarer Beziehung zur Gelbkörperfunktion stehen und somit trächtigkeitsabhängig unterschiedlich sind (Hoffmann & Hamburger, 1973; Ruiz et al., 1989), konnte in der vorliegenden Studie ebenso festgestellt werden. Die laktierenden Kühe

hatten in der TK im Vergleich zur FL und SL mit  $14,6 \pm 1,84$  ng/mL die höchste Progesteronkonzentration. Diese war mehr als doppelt so hoch wie die der nicht tragenden Kontrollgruppe. Nach der Kalbung (1. FL) wurde bei den laktierenden Tieren eine niedrigere Progesteronkonzentration von  $3,06 \pm 0,86$  ng/mL gemessen.

### **5.1.2 Beeinflusst oxidativer Stress die zelluläre Energieverfügbarkeit?**

Eine Erhöhung der Konzentrationen an dROM, TBARS und AOPP/Alb., die auf ein Ungleichgewicht zwischen der Bildung von ROS und deren antioxidativer Neutralisierung zurückzuführen ist, wird als oxidativer Stress bezeichnet (Witko-Sarsat et al., 1998; Bernabucci et al., 2005). In der vorliegenden Studie wurde bei den laktierenden Kühen eine Erhöhung der dROM Konzentration von der 1. FL zur SL festgestellt, wohingegen TBARS und AOPP/Alb. konstant blieben. Beim Vergleich der laktierenden und nicht laktierenden Kühe konnte in Bezug auf die Parameter des oxidativen Stress kein Unterschied und somit kein Laktationseinfluss festgestellt werden. Bei den laktierenden Kühen wurde einerseits tendenziell ein Zusammenhang zwischen dem Stressparameter AOPP/Alb. und der CS-Aktivität im Fettgewebe festgestellt und andererseits erhöhte sich neben der dROM Konzentration ebenso die CS- und COX-Aktivität von der 1. FL zur SL. ROS, die als Nebenprodukt der Atmungskette in den Mitochondrien gebildet werden, führen in hohen Konzentrationen zu oxidativen Schäden unter anderem an der mtDNA (Wallace, 2005; Finley & Haigis, 2009), was zur Beeinträchtigung der Mitochondrienfunktion und somit des Energiemetabolismus führen kann (Kusminski & Scherer, 2012). Um die Situation des erhöhten oxidativen Stress und die daraus resultierenden mitochondrialen Schäden zu kompensieren, kommt es durch die Erhöhung der CS- und COX-Aktivität zu einer gesteigerten Energieversorgung innerhalb der Adipozyten. Sowohl die CS, ein Schlüsselenzym des Tricarbonsäurezyklus der Mitochondrienmatrix, als auch die COX, ein Enzym der inneren Mitochondrienmembran (Komplex IV), können als Biomarker für die Mitochondriendichte herangezogen werden (Picard et al., 2011; Larsen et al., 2012). Diese Aussage wird durch den in der vorliegenden Studie ermittelten Zusammenhang zwischen mtDNA und CS-Aktivität im subkutanen Fettgewebe der laktierenden Kühe bestätigt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass oxidativer Stress in Form einer gesteigerten Energieversorgung innerhalb der Zellen des Fettgewebes die Energieverfügbarkeit beeinflusst.

### **5.1.3 Energetische Unterversorgung, Alterung und Zelltod im subkutanen Fettgewebe – gibt es einen Zusammenhang?**

Oxidativer Stress (ROS) könnte zur Schädigung der Mitochondrien und anderer Zellorganellen führen (Al-Kafaji & Golbahar, 2013), wobei dabei der zelluläre Energiestoffwechsel beeinträchtigt werden und dies schlussendlich in der Alterung der Zellen oder sogar dem Zelltod (Apoptose) enden könnte (Passos et al., 2007; Loeser, 2017). In der vorliegenden Studie hatten die laktierenden Kühe in der SL sowohl eine höhere dROM-Konzentration als auch eine höhere Apoptoserate im subkutanen Fettgewebe als in der TK. Dass laktierende Kühe im Vergleich zu nicht laktierenden Kühen in der FL eine erhöhte Apoptoserate durch den nach der Kalbung erhöhten oxidativen Stress (Abd Ellah, 2016) zeigten, konnte in der vorliegenden Studie nur in Bezug auf die Apoptoserate bestätigt werden. Die laktierenden Kühe zeigten in der 1. FL eine höhere Apoptoserate im subkutanen Fettgewebe als die nicht laktierende Kontrollgruppe, wohingegen in Bezug auf die oxidativen Stressparameter kein Unterschied zwischen den beiden Tiergruppen bestand. Die Aussage, dass die Apoptoserate bei Rindern von der Adipozytengröße abhängt und es laktationsbedingt zu einer erhöhten Apoptoserate kommt (Häussler et al., 2013), konnte in der vorliegenden Arbeit zusätzlich mit dem Vergleich der histologischen Schnitte des subkutanen Fettgewebes in der FL zwischen den laktierenden und nicht laktierenden Kühen bestätigt werden. In der Studie von Häussler et al. (2013) wurde eine erhöhte Apoptoserate in Fettdepots mit kleineren Adipozyten ermittelt. Kleinere Adipozyten verlieren ihre Funktion als Lipidspeicher sobald sie eine kritische (kleine) Größe erreicht haben. Die Zellen sind folglich energetisch unterversorgt, was schließlich zur Apoptose führt (Cianzio et al., 1985; Häussler et al., 2013). In der vorliegenden Studie wurde in der FL ein tendenziell negativer Zusammenhang zwischen der CS-Aktivität, die den zellulären Energiestatus wiedergibt, und der Apoptoserate ermittelt. Die Adipozytengröße nimmt in der FL durch die Mobilisierung von Fettreserven (Lipolyse) um bis zu 63% ab, was zu einer energetischen Unterversorgung führt und eine erhöhte Apoptoserate begünstigt (Cianzio et al., 1985; Smith & McNamara, 1990). In der vorliegenden Studie wurde eine negative Korrelation zwischen der Adipozytengröße und der Apoptoserate bei den laktierenden Kühen ermittelt. Je kleiner die Adipozyten waren, umso größer war die Apoptoserate. Dass die Adipozytengröße von der Laktation beeinflusst wird, konnte in der vorliegenden Studie durch den Vergleich der beiden Tiergruppen bestätigt werden. Die laktierenden Kühe hatten sowohl in der FL als auch in der SL kleinere Adipozyten als die nicht laktierenden Kontrolltiere. Somit führt die laktationsabhängige Adipozytengröße zu einer energetischen Unterversorgung der Zellen und dies zum Zelltod. Ein erhöhter oxidativer Stress während der Laktation und dessen Beeinflussung der Apoptoserate konnte anhand der Ergebnisse der vorliegenden Studie nicht festgestellt werden. Ob die Laktation in Form einer zellulären energetischen Unterversorgung auch zur Alterung der Zellen führen kann und wie

sich oxidativer Stress auswirkt, wurde einerseits durch Bestimmung der relativen qT und andererseits durch Bestimmung der Methyltransferasen DNMT1 und DNMT3a im subkutanen Fettgewebe untersucht. In der vorliegenden Studie konnte kein Zusammenhang zwischen der CS-Aktivität und der relativen qT festgestellt werden. Dies führt zu der Annahme, dass die TL in Zellen des subkutanen Fettgewebes nicht durch deren energetischen Status beeinflusst wird. Als Haupteinflussfaktor der TL-Verkürzung in Rindergeweben wird die Länge der anfänglichen Telomere gesehen. Die TL-Verkürzungsrate ist demnach umso größer, je länger die Ausgangstelomere sind (Ehrlenbach et al., 2009; Nordfjäll et al., 2009; Laubenthal et al., 2016b). In der vorliegenden Studie wurden weder Unterschiede in der relativen qT von der FL zur SL noch zwischen den laktierenden und den nicht laktierenden Kühen ermittelt. Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Laktation bei Milchkühen zumindest im subkutanen Fettgewebe keinen Einfluss auf die TL und somit einem beschleunigtem Alterungsprozess hat. Auch die Anzahl von Laktationen hat laut Laubenthal et al. (2016b) keinen Einfluss auf die TL von Milchkühen. Das Fettgewebe gehört zu den langsam proliferierenden Geweben (Daniali et al., 2013), die laut einer Humanstudie längere Telomere aufweisen als schnell proliferierende Gewebe (Aubert & Lansdorp, 2008). Darüber hinaus zeigte sich im subkutanen Fettgewebe von Milchkühen in der FL nur eine geringe Zellproliferationsrate (Häussler et al., 2013). In einer Humanstudie von Nussey et al. (2014) wurden im Erwachsenenalter nur marginale TL-Veränderungen in Geweben mit geringen Replikationsraten beobachtet, was zu der Annahme führt, dass TL-Verkürzungen möglicherweise keinen Einfluss auf den zellulären Alterungsprozess von langsam proliferierenden Geweben, wie dem subkutanen Fettgewebe, haben (Tzanetakou et al. 2012). Dass sich oxidativer Stress in Form von dROM negativ auf die relative qT im subkutanen Fettgewebe auswirkt, konnte in der vorliegenden Studie bei den nicht laktierenden Tieren gezeigt werden. Eine mögliche Erklärung dafür, dass dieser Zusammenhang nur bei den nicht laktierenden Kühen beobachtet wurde und somit laktationsunabhängig zu sein scheint, könnte in der unterschiedlichen Körperkondition der beiden Tiergruppen liegen. Die nicht laktierenden Kühe hatten im Vergleich zu den laktierenden Kühen höhere BCS-Werte. Einerseits wurde ein Zusammenhang zwischen einer Gewichtserhöhung und einer erhöhten dROM-Konzentration bei nicht laktierenden Kühen festgestellt (Laubenthal et al., 2017). In einer Humanstudie konnte andererseits ein Zusammenhang zwischen der Körperkondition und der TL festgestellt werden, wobei eine Gewichtserhöhung zu vermehrtem oxidativem Stress und dies wiederum zu einer stärkeren Verkürzung der Telomere führt (Müezzinler et al., 2016).

Oxidativer Stress, als Folge einer Ansammlung von ROS, nimmt mit dem Alter zu und führt gleichzeitig zu einem Rückgang des Zellreparaturmechanismus (Sohal & Weindruch, 1996; Arita & Costa, 2014), wozu unter anderem die DNA-Methylierung zählt (Illi et al., 2009). In der vorliegenden Studie konnte bei den laktierenden Kühen gezeigt werden, dass eine Erhöhung



des mtDNA-Gehaltes und somit der CS-Aktivität, um durch den oxidativen Stress entstandene mitochondriale Schäden zu kompensieren (Lee et al., 2000), mit einem Rückgang der Erhaltungsmethyltransferase DNMT1 im subkutanen Fettgewebe einhergeht. Außerdem konnte die Aussage eines Rückgangs der DNA-Methylierung mit einem Rückgang der DNMT1 mRNA-Expression im subkutanen Fettgewebe bei den laktierenden Kühen von der 1. FL zur 2. FL unterstützt werden. Im Gegensatz zu den laktierenden Kühen änderte sich die DNMT1 mRNA-Expression bei den nicht laktierenden Kühen im Untersuchungszeitraum nicht, was neben der Tatsache eines tendenziell ermittelten Unterschiedes der DNMT1 mRNA Expression zwischen den laktierenden und den nicht laktierenden Kühen in der 1. FL zu der Annahme führt, dass die Laktation einen Einfluss auf die DNA-Methylierung hat. Im Gegensatz zur DNMT1 mRNA-Expression im subkutanen Fettgewebe konnte in der Leber ein hoch signifikanter Unterschied in der DNMT3a mRNA-Expression zwischen laktierenden und nicht laktierenden Kühen festgestellt werden. Die laktierenden Kühe zeigten in der 1. FL eine niedrigere DNMT3a mRNA-Expression im Vergleich zu den nicht laktierenden Kühen, was die Annahme einer laktationsabhängigen Methylierung ebenfalls stützt. Dass oxidativer Stress zu einem Rückgang der DNA-Methylierung führt, konnte durch den ermittelten konträren Zusammenhang zwischen TBARS und DNMT3a im subkutanen Fettgewebe in der vorliegenden Studie gezeigt werden. Die DNMT3a mRNA-Expression erhöhte sich im subkutanen Fettgewebe, entgegen der Aussage eines Rückgangs der DNA-Methylierung, bei beiden Tiergruppen von der 1. FL zur 2. FL. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass die *de novo* Methyltransferase DNMT3a (Jurkowska et al., 2011) dem zellulären Alterungsprozess durch Aufrechterhaltung der Chromosomenstabilität (Arita & Costa, 2014) entgegenzuwirken scheint.

Basierend auf den aktuellen Ergebnissen scheint oxidativer Stress in Form einer gesteigerten Energieversorgung innerhalb der Zellen des Fettgewebes die Energieverfügbarkeit zu beeinflussen. Sowohl der mtDNA-Gehalt der Zellen des Leber- und Fettgewebes als auch die Adipozytengröße und die Apoptoserate im subkutanen Fettgewebe verändern sich laktationsbedingt, wobei die laktationsabhängige Adipozytengröße zu einer energetischen Unterversorgung der Zellen führt und dies im Zelltod endet. Die Laktation bei Milchkühen hat im subkutanen Fettgewebe keinen Einfluss auf die TL und somit einem beschleunigtem Alterungsprozess, wohingegen die DNA-Methylierung im Leber- und Fettgewebe vermutlich durch die Laktation beeinflusst wird.

Um die umfassenden Mechanismen der zellulären Energieversorgung bei Milchkühen zu verstehen und den Einfluss mehreren Laktationen in weiteren Gewebearten zu untersuchen, sind zukünftige Studien notwendig.

## 5.2 Versuch 2

### 5.2.1 Telomerlängenbestimmung in nasalen Tupferproben

Bei der dieser Dissertation zu Grunde liegenden Studie handelt es sich um eine der ersten Untersuchungen zur TL-Bestimmung der DNA aus nasalen Tupferproben von Kühen unterschiedlichen Alters und Laktationsstatus. Bisherige Untersuchungen zur TL-Bestimmung beziehen sich weitestgehend auf humane Studien, wodurch es bislang nur wenige Erkenntnisse bei Kühen gibt. Bisher sind Daten über TL bei Milchkühen auf Messungen aus invasiven Probenentnahmen, wie Blutproben und Biopsien verschiedener Gewebe, wie Leber-, Fett- oder Eutergewebe, beschränkt (Brown et al., 2012; Laubenthal et al., 2016b). Als Alternative zu dieser invasiven DNA-Probenentnahme beschrieben Foley et al. (2011) die nichtinvasive Probenentnahme bei Kühen mit Hilfe der Performagene™LIVESTOCK nasal swabs. Vorteile sind laut Foley et al. (2011) die universelle Einsetzbarkeit der nasalen Tupfer, unabhängig vom Alter oder Geschlecht der Tiere und die qualitativ und quantitativ sehr hohe DNA-Ausbeute. In der von Brown et al. (2012) durchgeführten Untersuchung von Holstein Rindern und der damit verbundenen Aussage, dass sich die TL mit fortschreitendem Alter der Kühe verkürzt, konnte sowohl im vorliegenden Teilversuch 1 als auch im Teilversuch 2 bestätigt werden. Im Teilversuch 1 hatte die Gruppe der laktierenden Kühe, die in dem Versuch die Gruppe mit den ältesten Tieren darstellte, im Vergleich zur Gruppe der Färsen und der Kälber, die kürzesten Telomere in der DNA der Nasenepithelzellen. Im Teilversuch 2 wurden dieselben weiblichen Tiere der Kälbergruppe zu drei verschiedenen Zeitpunkten (1. Beprobung: im Alter  $\leq 6$  Monate; 2. Beprobung: 6 Monate später; 3. Beprobung: nochmals 12 Monate später) beprobt.

Es wurde ebenso eine Verkürzung der TL von der 1. Beprobung bis hin zur 3. Beprobung festgestellt.

Bisher ist nur wenig darüber bekannt, warum jedes Individuum zur Geburt mit einer unterschiedlichen Länge an Telomeren ausgestattet ist. Eine Humanstudie von Marchetto et al. (2016) zeigte, dass eine Ursache dafür die Umwelteinflüsse während der Schwangerschaft darstellen können. So hatten die Neugeborenen von Müttern, die in der Schwangerschaft Stress hatten, kürzere Telomere als solche von Müttern, die eine stressfreie Schwangerschaft hatten. Eine weitere mögliche Ursache könnte in der unterschiedlichen TL von weiblichen und männlichen Individuen zu sehen sein, wobei die Datenlage bezüglich der geschlechterspezifischen Länge der Telomere verschieden ist und sich fast ausschließlich auf Humanstudien bezieht. Einerseits gab es laut Okuda et al. (2002) keine Unterschiede in der TL von neugeborenen Mädchen und Jungen. Factor-Litvak et al. (2016) zeigten andererseits, dass weibliche Neugeborene längere Telomere hatten als männliche Neugeborene. In der vorliegenden Studie hatten die weiblichen Kälber tendenziell längere Telomere als die Männlichen, wobei sich die Anzahl der männlichen Kälber in der Untersuchung allerdings auf

nur 3 beschränkte. Nachfolgende Studien sollten sich einerseits in Bezug auf die geschlechterspezifische Länge der Telomere auf eine größere Anzahl beprobter Kühe beziehen und andererseits mit der Frage auseinandersetzen, ob Stress während der Trächtigkeit auch einen Einfluss auf die TL der Kälber hat. Auch die Aussage von Frenck et al. (1998), dass die humane TL-Verkürzung nicht konstant abläuft, sondern es nach der Geburt zu einer starken Verkürzung der Telomere kommt, die dann etwa im Alter von 4 Jahren abschwächt, sollte in zukünftigen Studien bei Kühen untersucht werden, da es bis zum jetzigen Stand in der Literatur keinerlei Angaben zu derartigen Studien gibt.

Nordfjäll et al. (2009) zeigten, dass Individuen mit den längsten Ausgangs-TL im Untersuchungszeitraum die stärkste TL-Verkürzung aufwiesen und Individuen mit kürzeren Ausgangs-TL eine nicht so starke Verkürzung zeigten. Im Teilversuch 2 der vorliegenden Studie wurde bei weiblichen Kälbern ebenfalls ein Zusammenhang zwischen der Ausgangs-TL und dem qT-Verlust ermittelt, wobei die TL-Verkürzung einerseits bei längeren Telomeren am stärksten war und andererseits bei den Zeitpunkten, die am weitesten auseinander lagen (ZP1 – ZP3), am größten war. Ein Grund hierfür könnte laut Ouellette et al. (2000) sein, dass die Telomerase, ein Enzym, welches der Verkürzung der Telomere entgegenwirkt, bevorzugt an kurzen Telomeren ansetzt. Da in der vorliegenden Studie die Telomeraseaktivität nicht berücksichtigt wurde, sollte diese in nachfolgenden Studien untersucht werden.

Um nun zu überprüfen, ob die ermittelten Daten der TL in der Nasenschleimhaut mit den TL im Blut zusammenhängen und somit vergleichbar sind, wurde ein weiterer Versuch (Teilversuch 3) durchgeführt.

### **5.2.2 Können nichtinvasive Probenentnahmen die invasiven Blutprobenentnahmen zur Telomerlängenbestimmung ersetzen?**

Analog zu Foley et al. (2011) wurden in dem vorliegenden Teilversuch 3 nasale Tupfer- und Milchproben sowie Blutproben als Bezugsgröße von 12 Kühen entnommen, um aus diesen Proben DNA für die anschließende multiplex qPCR-Messung zur TL-Bestimmung zu extrahieren. Dabei wurde ein tendenziell positiver Zusammenhang ( $r = 0,532$ ;  $P = 0,092$ ) zwischen der TL in den nasalen Tupferproben und der TL in den Blutproben derselben Tiere ermittelt. Dass es sich um einen Trend handelt, könnte einerseits an der geringen Anzahl an beprobten Kühen liegen, andererseits könnte es mit der unterschiedlichen Art an Zellen zusammenhängen. Die TL im Blut wurden aus zirkulierenden Zellen, den Leukozyten, bestimmt, während die TL in der Nasenschleimhaut Gewebe-TL vollständig differenzierter Zellen reflektieren (Daniali et al., 2013). Mit diesen Untersuchungen wurden erste Grundkenntnisse im Zusammenhang zwischen der TL in der Nasenschleimhaut und der TL im Blut bei Kühen erreicht. Da es sich bei den vorliegenden Daten nicht um signifikante

Ergebnisse, sondern um einen Trend handelt, kann zum jetzigen Zeitpunkt keine eindeutige Aussage über eine nichtinvasive Alternative in Form von nasalen Tupferprobenentnahmen zur Bestimmung der TL bei Kühen getroffen werden. Hierzu sind zukünftig weitere Studien mit einer größeren Anzahl an zu beprobenden Tieren notwendig.

Milchproben verschiedener Kühe können sich einerseits erheblich in den Zellzahlgehalten und andererseits hinsichtlich des Infektionsstatus, wie zum Beispiel Mastitis, unterscheiden (Kehrl & Shuster, 1994) und sind zudem nicht vielseitig einsetzbar, da sich die Probenentnahme auf die Gruppe der laktierenden Kühe beschränkt (Foley et al., 2011). Aus diesen Gründen ist Milch kein geeignetes Medium, um eine einheitliche DNA-Menge zu erhalten. Um in dem vorliegenden Teilversuch 3 die Unterschiede im Zellzahlgehalt der 12 laktierenden Kühe möglichst gering zu halten, wurde einerseits die Milchprobe jeder Kuh nicht nur aus einem Euterviertel, sondern aus allen vier Eutervierteln gleichermaßen entnommen (Murphy et al., 2002) und die Milchprobenentnahme ausschließlich bei Kühen mit gesunden, nicht infizierten Eutervierteln (Zellzahlgehalt  $< 3 \times 10^5$  Zellen/ml Milch; Kehrl & Shuster, 1994) durchgeführt. Die anschließenden PCR-Messungen der isolierten DNA einerseits aus den somatischen Zellen der 12 Milchproben und andererseits aus den Leukozyten der Blutproben derselben 12 Tiere des vorliegenden Versuches ergaben, dass kein Zusammenhang zwischen der TL im Blut und in der Milch bestand. Das könnte daran liegen, dass die Milchprobenentnahme aufgrund der starken Beeinflussung der DNA-Ausbeute aus den somatischen Zellen der Milch unter anderem durch den Zellzahlgehalt keine zuverlässige und effiziente Methode zur DNA-Isolierung darstellt. Auch dass die Isolierung qualitativ und quantitativ hochwertiger DNA durch Milch Inhaltsstoffe, wie Fette und Proteine, erschwert wird (Usman et al., 2014) und deshalb der Aufwand der DNA-Isolierung aus den Milchproben ein größerer ist als zum Beispiel der aus nasalen Tupferproben, stellt einen weiteren Grund dar, weshalb die Milchprobenentnahme keine Alternative zur invasiven Blutprobenentnahme ist.

Es wurde ein starker negativer Zusammenhang zwischen der TL in den Milchproben und dem Zellzahlgehalt in denselben Milchproben festgestellt. Mrode et al. (1998), Haile-Mariam et al. (2001) und Bielfeldt et al. (2004) beschrieben, dass es mit steigender Laktationsnummer und somit mit zunehmendem Alter der Tiere zu einem Anstieg des Zellzahlgehaltes in der Milch kommt. Im Teilversuch 3 der vorliegenden Studie hatten die Kühe der 3. Laktation tendenziell höhere Zellzahlgehalte als die Kühe der 2. Laktation. Eine Erklärung dafür sieht Schutz et al. (1990) darin, dass die Milchmenge mit steigender Laktationsnummer zurückgeht und somit der somatische Zellzahlgehalt ansteigt, weil sich die somatischen Zellen in einem kleineren Volumen konzentrieren. Laut Brown et al. (2012) verkürzt sich die TL bei Kühen mit fortschreitendem Alter. In der vorliegenden Studie wurde weder eine Verkürzung der Telomere in der Milch von der 2. zur 3. Laktation ermittelt, noch veränderte sich die Milchmenge mit steigender Laktationsnummer. Ein Grund dafür könnte zum einen die geringe Probenanzahl

sein und zum anderen der geringe Abstand zwischen den beiden Laktationen sein. Da sich zwischen einer Laktation vermutlich noch keine Unterschiede in der TL und der Milchmenge feststellen lassen, sollten nachfolgende Studien noch weitere aufeinanderfolgende Laktationen untersuchen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die TL mit zunehmendem Alter verkürzt, dass weibliche Kälber von Geburt an tendenziell mit längeren Telomeren ausgestattet sind als Männliche und dass die TL-Verkürzung umso größer ist, je länger die Ausgangs-TL ist. Nasale Tupferproben könnten im Gegensatz zu Milchproben eine nichtinvasive Alternative zu Blutproben auch aufgrund der besseren Praktikabilität der Probenentnahme für die TL-Bestimmung bei Kühen darstellen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie geben nur einen begrenzten Einblick auf das vielseitige Gebiet der TL-Untersuchung, vorallem in Nasenepithelzellen von Kühen. Zukünftige Studien mit einer größeren Probenanzahl sind notwendig, um Unterschiede in der geschlechterspezifischen TL und Auswirkungen von Stress während der TK zu untersuchen. Haarproben könnten eine weitere potenzielle nichtinvasive Alternative zur TL-Bestimmung darstellen und sollten in nachfolgenden Studien untersucht werden.

## 6 Zusammenfassung

### **Untersuchung der zellulären Energieversorgung und Alterung in verschiedenen Geweben bei Milchkühen unter Berücksichtigung der Laktation**

Der Energiebedarf von Hochleistungskühen wird entscheidend von der Laktation geprägt und führt zu Veränderungen in der Energiebilanz (EB) und im Stoffwechsel. Sobald der Energiebedarf die über das Futter aufgenommene Energie übertrifft, mobilisieren hochleistende Milchkühe verstärkt ihre Körperreserven, vorallem von Fett. Während es nach dem Kalben und in der Früh-laktation (FL) vermehrt zur Fettmobilisierung (Lipolyse) kommt, findet in den späteren Laktationsphasen und in der Trockenstehzeit eine Fetteinlagerung (Lipogenese) statt. In der während der Lipolyse auftretenden Phase der negativen EB wirkt sich der Energiemangel auf die Energieversorgung der Zellen aus. Dabei wird ein großer Teil der zellulären Energieversorgung von den Mitochondrien, die ein eigenes Genom besitzen (mtDNA), bereitgestellt. Oxidative Schäden an der DNA der Mitochondrien, die durch eine langfristig hohe Stoffwechselbelastung (oxidativer Stress) hervorgerufen werden, können zu zellulären Fehlfunktionen und zur Beeinträchtigung des Energiestoffwechsels führen und den Alterungsprozess beschleunigen. Die Zellalterung kann einerseits über die DNA-Methylierung und andererseits durch Telomere gesteuert werden.

Ziel dieser Arbeit war es, in einem ersten Versuch den Einfluss der Laktation und die Auswirkungen von oxidativem Stress auf die zelluläre Energieversorgung sowie auf den Alterungsprozess zu untersuchen und zu prüfen, ob diese Prozesse in einem Zusammenhang stehen. Ein weiterer Schwerpunkt bestand im zweiten Versuch in der Fragestellung, ob sich die Telomerlänge (TL) auch in der Nasenschleimhaut von Kühen mit zunehmendem Alter verkürzen und ob somit nichtinvasive Probenentnahmen in Form von nasalen Tupfern die invasiven Blutprobenentnahmen zur TL-Bestimmung bei Milchkühen ersetzen können.

Für die Untersuchungen innerhalb des ersten Versuches wurden tragende Färsen (n = 8) mit einer Kontrollgruppe, die aus gleichaltrigen, nicht tragenden Färsen (n = 8) bestand, über einen Zeitraum von zwei Laktationen (Trächtigkeit (TK); 1. FL; 1. Spätlaktation (SL); 2. FL) miteinander verglichen. Den Tieren wurden Biopsien aus der Leber und dem subkutanen Fettgewebe im Bereich des Schwanzansatzes sowie Blutproben entnommen. In den Proben wurde oxidativer Stress, die Mitochondriendichte und -aktivität, Apoptose und die Adipozytengröße, die mtDNA-Kopienanzahl, die relative Anzahl an Telomerprodukten (qT) und die DNA-Methylierung (DNMT1, DNMT3a) untersucht. In einem zweiten Versuch, der in 3 Teilversuche untergliedert war, wurden 60 Tiere der Rasse Deutsche Holstein in 3 Versuchsgruppen eingeteilt. Die erste Gruppe bestand aus 20 Kälbern, die zweite Gruppe aus

20 Färsen und die dritte Gruppe aus 20 laktierenden Kühen mit der Laktationszahl 1 bis 3. Im 1. Teilversuch wurde bei allen 60 Tieren im Bereich der Nasenschleimhaut mit Hilfe von nasalen Tupfern Proben entnommen. Im 2. Teilversuch wurde die Kälbergruppe erneut mit nasalen Tupfern 6 und 18 Monate nach der ersten Probenentnahme (Teilversuch 1) beprobt. Im 3. Teilversuch wurden bei je 6 laktierenden Kühen der 2. und 3. Laktation 3 Monate nach der ersten Beprobung (Teilversuch 1) Milch-, Heparin-Vollblut- und nasale Tupferproben entnommen, um anschließend in den gesamten Proben die qT zu bestimmen.

Die Ergebnisse des ersten Versuches zeigten, dass oxidativer Stress in Form einer gesteigerten Energieversorgung innerhalb der Zellen des Fettgewebes die Energieverfügbarkeit beeinflusst. Sowohl der mtDNA-Gehalt der Zellen des Leber- und Fettgewebes als auch die Adipozytengröße und die Apoptoserate im subkutanen Fettgewebe verändern sich laktationsbedingt, wobei die laktationsabhängige Adipozytengröße zu einer energetischen Unterversorgung der Zellen führt und dies im Zelltod endet. Eine Laktation bei Milchkühen hat im subkutanen Fettgewebe keinen Einfluss auf die TL und somit einem beschleunigtem Alterungsprozess, wohingegen die DNA-Methylierung im Leber- und Fettgewebe durch eine Laktation beeinflusst wird. Im zweiten Versuch zeigte sich, dass sich die TL mit zunehmendem Alter verkürzt, dass weibliche Kälber von Geburt an tendenziell mit längeren Telomeren ausgestattet sind als Männliche und dass die TL-Verkürzung umso größer ist, je länger die Ausgangs-TL ist. Nasale Tupferproben könnten im Gegensatz zu Milchproben eine nichtinvasive Alternative zur TL-Bestimmung bei Kühen darstellen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie geben nur einen begrenzten Einblick. Um die umfassenden Mechanismen der zellulären Energieversorgung bei Milchkühen zu verstehen und den Einfluss mehrerer Laktationen in weiteren Gewebearten zu untersuchen, sind zukünftige Studien notwendig. Auch eine größere Probenanzahl und weitere potenzielle nichtinvasive Alternativen, wie Haarproben, zur TL-Bestimmung sollten in nachfolgenden Studien berücksichtigt werden.

## 7 Summary

### **Investigation of cellular energy supply and aging in different tissues of dairy cows under consideration of lactation**

The energy requirements of high-performance dairy cows are significantly influenced by lactation and lead to changes in their energy balance (EB) and metabolism. As soon as their energy requirement exceeds the energy absorbed through feed, high-performance dairy cows mobilise their body fat reserves. While fat mobilisation (lipolysis) occurs increasingly after calving and during early lactation, fat storage (lipogenesis) takes place in the later lactation phases and in the dry period. During the phase of negative EB occurring during lipolysis, the cow's energy deficiency affects the energy supply of the cells. A large part of the cellular energy supply is provided by the mitochondria, which have their own genome (mtDNA). Oxidative damage to the mitochondrial DNA caused by long-term high metabolic stress (oxidative stress) can lead to cellular malfunctions and impairment of the energy metabolism and thus accelerate the aging process. Cell ageing can be controlled by DNA methylation on the one hand and by telomeres on the other.

The aim of the first experiment of this study was to investigate the influence of lactation, the effects of oxidative stress on cellular energy supply and on the ageing process, to check whether these processes are related. The second experiment focused on the question whether whether the telomere length (TL) in the nasal mucosa of cows also decreases with age and whether non-invasive sampling in the form of nasal swabs can replace invasive blood sampling for TL determination in dairy cows.

For the investigations in the first experiment, pregnant heifers (n = 8) were compared with a control group consisting of non-pregnant heifers of the same age (n = 8) over a period of two lactations (pregnancy; 1<sup>st</sup> early lactation; 1<sup>st</sup> late lactation; 2<sup>nd</sup> early lactation). In addition to blood samples, tissue biopsies were collected from liver and subcutaneous adipose tissue from the tail stock region. In those samples, oxidative stress, mitochondrial density and activity, apoptosis and adipocyte size, amount of mtDNA copies, relative quantity of telomere products (qT) and DNA methylation (DNMT1, DNMT3a) were investigated. In a second experiment, which was subdivided into 3 partial experiments, 60 animals of the breed Deutsche Holstein were divided into 3 experimental groups. The first group consisted of 20 calves, the second group of 20 heifers and the third group of 20 lactating cows with the lactation numbers 1 to 3. In the first partial experiment, swab samples were taken from all 60 animals from the nasal mucosa. In the second partial experiment, the group of calves was additionally sampled with nasal swabs 6 and 18 months after the first sampling (partial experiment 1).



## Summary

---

In the third partial experiment, milk, heparinised whole blood and nasal swab samples were taken from 6 lactating cows of the 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> lactation, 3 months after the initial sampling (partial experiment 1), in order to subsequently determine the qT in all samples.

The results of the first experiment showed that oxidative stress in the form of an increased energy supply within the cells of adipose tissue influences energy availability. Both the mtDNA content of the liver and adipose tissue cells, as well as adipocyte size and apoptosis rate in the subcutaneous adipose tissue change in correlation to lactation. The lactation-dependent adipocyte size leads to an energetic undersupply of the cells, which results in cell death. For the subcutaneous adipose tissue lactation has no influence on TL in dairy cows and thus an accelerated aging process, whereas DNA methylation in liver and adipose tissue is influenced by lactation. The second experiment showed that TL shortens with age, that female calves tend to have longer telomeres than male calves at birth, and that the initial TL is directly correlated to subsequent TL shortening: the longer the initial TL, the greater the TL shortening. In contrast to milk samples, nasal swab samples may be a non-invasive alternative for TL determination in cows.

The results of the present study only give a limited insight in cellular energy supply and tissue aging in consideration of lactation. In order to understand the comprehensive mechanisms of cellular energy supply in dairy cows and to investigate the influence of several lactations in other tissue types, future studies are necessary. A larger number of samples and other potential non-invasive alternatives for TL determination, such as hair samples, should also be considered in subsequent studies.

## 8 Literaturverzeichnis

- Abd Ellah, M.R. (2016). Oxidant and antioxidants during the transition period in dairy cows. *Journal of Advanced Veterinary Research*, 6(4), 130-133.
- Abelenda, M. & Puerta, M. (2004). Leptin release is decreased in white adipocytes isolated from progesterone-treated rats. *Endocrine Research*, 30(3), 335-342.
- Adewuyi, A.A., Gruys, E. & van Eerdenburg, F.J. (2005). Non esterified fatty acids (NEFA) in dairy cattle. A review. *Veterinary Quarterly*, 27(3), 117-126.
- Ahima, R.S. & Flier, J.S. (2000). Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 11(8), 327–332.
- Ahima, R.S., Prabakaran, D., Mantzoros, C., Qu, D., Lowell, B., Maratos-Flier, E. & Flier, J.S. (1996). Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature*, 382(6588), 250-252.
- Ailhaud, G. & Hauner, H. (2004). Development of white adipose tissue. In: Bray, G.A. & Bouchard, C. (eds) *Handbook of obesity*. Dekker, New York, 481-514.
- Akter, S.H., Häussler, S., Dänicke, S., Müller, U., von Soosten, D., Rehage, J. & Sauerwein, H. (2011). Physiological and conjugated linoleic acid-induced changes of adipocyte size in different fat depots of dairy cows during early lactation. *Journal of Dairy Science*, 94(6), 2871-2882.
- Alberti, A., Bolognini, L., Macciantelli, D. & Caratelli, M. (2000). The radical cation of N,N-diethyl-paraphenyldiamine: A possible indicator of oxidative stress in biological samples. *Research on Chemical Intermediates*, 26(3), 253-267.
- Al-Kafaji, G. & Golbahar, J. (2013). High glucose-induced oxidative stress increases the copy number of mitochondrial DNA in human mesangial cells. *BioMed Research International*, 2013, 754946.
- Amacher, D.E. (2005). Drug-associated mitochondrial toxicity and its detection. *Current Medicinal Chemistry*, 12(16), 1829–1839.
- Anderson, S., de Bruijn, M.H., Coulson, A.R., Eperon, I.C., Sanger, F. & Young, I.G. (1982). Complete sequence of bovine mitochondrial DNA. Conserved features of the mammalian mitochondrial genome. *Journal of Molecular Biology*, 156(4), 683-717.
- Arand, J., Spieler, D., Karius, T., Branco, M.R., Meilinger, D., Meissner, A., Jenuwein, T., Xu, G., Leonhardt, H., Wolf, V. & Walter, J. (2012). In vivo control of CpG and non-CpG DNA methylation by DNA methyltransferases. *PLoS Genetics*, 8(6), e1002750.
- Arita, A. & Costa, M. (2014). Oxidative stress and the epigenome in human disease. *Journal of Genetics and Genome Research*, 1(1), 2.
- Aubert, G. & Lansdorp, P.M. (2008). Telomeres and aging. *Physiological Reviews*, 88(2), 557-579.

- Autexier, C. & Lue, N.F. (2006). The structure and function of telomerase reverse transcriptase. *Annual Review of Biochemistry*, 75(1), 493–517.
- Bacolla, A., Pradhan, S., Roberts, R.J. & Wells, R.D. (1999). Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. II. Steady-state kinetics reveal allosteric activation by methylated dna. *Journal of Biological Chemistry*, 274(46), 33011-33019.
- Balaban, R.S., Nemoto, S. & Finkel, T. (2005). Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell*, 120(4), 483–495.
- Barrientos, A., Casademont, J., Cardellach, F., Ardite, E., Estivill, X., Urbano-Marquez, A., Fernández-Checa, J.C. & Nunes, V. (1997a). Qualitative and quantitative changes in skeletal muscle mtDNA and expression of mitochondrial-encoded genes in the human aging process. *Biochemical and Molecular Medicine*, 62(2), 165–171.
- Barrientos, A., Casademont, J., Cardellach, F., Estivill, X., Urbano-Marquez, A. & Nunes, V. (1997b). Reduced steady-state levels of mitochondrial RNA and increased mitochondrial DNA amount in human brain with aging. *Molecular Brain Research*, 52(2), 284–289.
- Bell, A.W. (1995). Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. *Journal of Animal Science*, 73(9), 2804-2819.
- Berg, F., Gustafson, U. & Andersson, L. (2006). The uncoupling protein 1 gene (UCP1) is disrupted in the pig lineage: a genetic explanation for poor thermoregulation in piglets. *PLoS Genetics*, 2(8), e129.
- 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), 2017-2026.
- Bertics, S.J., Grummer, R.R., Cadorniga-Valino, C. & Stoddard, E.E. (1992). Effect of prepartum dry matter intake on liver triglyceride concentration and early lactation. *Journal of Dairy Science*, 75(7), 1914-1922.
- Bertoni-Freddari, C., Fattoretti, P., Casoli, T., Di Stefano, G., Solazzi, M., Gracciotti, N. & Pompei, P. (2001). Mapping of mitochondrial metabolic competence by cytochrome oxidase and succinic dehydrogenase cytochemistry. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 49(9), 1191-1192.
- Bertoni-Freddari, C., Fattoretti, P., Giorgetti, B., Solazzi, M., Baliotti, M., Casoli, T. & Di Stefano, G. (2004). Cytochrome oxidase activity in hippocampal synaptic mitochondria during aging: a quantitative cytochemical investigation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1019(1), 33-36.
- Bielfeldt, J.C., Badertscher, R., Tölle, K.H. & Krieter, J. (2004). Factors influencing somatic cell score in Swiss dairy production systems. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde*, 146(12), 555-560.

- Blackburn, E.H. (2000). Telomere states and cell fates. *Nature*, 408(6808), 53–56.
- Blackburn, E.H. (2001). Switching and signaling at the telomere. *Cell*, 106(6), 661–673.
- Blasco, M.A. (2005). Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nature Reviews Genetics*, 6(8), 611–622.
- 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*, 171(2), 339-348.
- Bostedt, H. (2003). *Fruchtbarkeitsmanagement bei Rindern* (4. Auflage). DLG-Verlag, Frankfurt am Main, Deutschland.
- Bratic, A. & Larsson, N.G. (2013). The role of mitochondria in aging. *Journal of Clinical Investigation*, 123(3), 951-957.
- Breiling, A. & Lyko, F. (2015). Epigenetic regulatory functions of DNA modifications: 5-methylcytosine and beyond. *Epigenetics & Chromatin*, 8(1), 24.
- Brown, D.E., Dechow, C.D., Liu, W.S., Harvatine, K.J. & Ott, T.L. (2012). Hot topic: association of telomere length with age, herd, and culling in lactating Holsteins. *Journal of Dairy Science*, 95(11), 6384-6387.
- Brown, W.M., George, M. & Wilson, A.C. (1979). Rapide evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(4), 1967-1971.
- Brown, W.M., Prager, E.M., Wang, A. & Wilson, A.C. (1982). Mitochondrial DNA sequences of primates: tempo and mode of evolution. *Journal of Molecular Evolution*, 18(4), 225-239.
- Butler, W.R. (2003). Energy balance relationships with follicular development, ovulation and fertility in postpartum dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 83(2-3), 211-218.
- Cawthon, R.M. (2009). Telomere length measurement by a novel monochrome multiplex quantitative PCR method. *Nucleic Acids Research*, 37(3), e21.
- Cedikova, M., Kripnerová, M., Dvorakova, J., Pitule, P., Grundmanova, M., Babuska, V., Mullerova, D. & Kuncova, J. (2016). Mitochondria in white, brown, and beige adipocytes. *Stem Cells International*, 2016(1), 1-11.
- Celi, P., Merlo, M., Da Dalt, L., Stefani, A., Barbato, O. & Gabai, G. (2011). Relationship between late embryonic mortality and the increase in plasma advanced oxidised protein products (AOPP) in dairy cows. *Reproduction, Fertility and Development*, 23(4), 527-533.
- Chehab, F.F., Mounzih, K., Lu, R. & Lim, M.E. (1997). Early onset of reproductive function in normal female mice treated with leptin. *Science*, 275(5296), 88-90.

- Chibisa, G.E., Gozho, G.N., Van Kessel, A.G., Olkowski, A.A. & Mutsvangwa, T. (2008). Effects of peripartum propylene glycol supplementation on nitrogen metabolism, body composition, and gene expression for the major protein degradation pathways in skeletal muscle in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 91(9), 3512–3527.
- Choe, S.S., Huh, J.Y., Hwang, I.J., Kim, J.I. & Kim, J.B. (2016). Adipose tissue remodeling: its role in energy metabolism and metabolic disorders. *Frontiers in Endocrinology*, 7(1), 30.
- Cianzio, D.S., Topel, D.G., Whitehurst, G.B., Beitz, D.C. & Self, H.L. (1985). Adipose tissue growth and cellularity: changes in bovine adipocyte size and number. *Journal of Animal Science*, 60(4), 970-976.
- Clay Montier, L.L., Deng, J.J. & Bai, Y. (2009). Number matters: control of mammalian mitochondrial DNA copy number. *Journal of Genetics and Genomics*, 36(3), 125-131.
- Collins, K. (2006). The biogenesis and regulation of telomerase holoenzymes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(7), 484–494.
- Concannon, P.W.; Powers, M.E.; Holder, W. & Hansel, W. (1977). Pregnancy and parturition in the bitch. *Biology of Reproduction*, 16(4), 517-526.
- Cooke, H.J. & Smith, B.A. (1986). Variability at the telomeres of the human X/Y pseudoautosomal region. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 51(1), 213–219.
- Coppock, C.E. (1985). Energy nutrition and metabolism of the lactating dairy cow. *Journal of Dairy Science*, 68(12), 3403-3410.
- Counter, C.M., Avilion, A.A., LeFeuvre, C.E., Stewart, N.G., Greider, C.W., Harley, C.B. & Bacchetti, S. (1992). Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *EMBO Journal*, 11(5), 1921-1929.
- Dada, L.A., Chandel, N.S., Ridge, K.M., Pedemonte, C., Bertorello, A.M. & Sznajder, J.I. (2003). Hypoxia-induced endocytosis of Na, K-ATPase in aveolar epithelial cells is mediated by mitochondrial reactive oxygen species and PKC-zeta. *Journal of Clinical Investigation*, 111(7), 1057– 1064.
- Daniali, L., Benetos, A., Susser, E., Kark, J.D., Labat, C., Kimura, M., Desai, K., Granick, M., & Aviv, A. (2013). *Nature Communications*, 4(1), 1597.
- Darzynkiewicz, Z., Galkowski, D. & Zhao, H. (2008). Analysis of apoptosis by cytometry using TUNEL assay. *Methods*, 44(3), 250-254.
- David, H. (1979). Quantitative and qualitative changes in the mitochondria in hepatocytes during postnatal development of male rats. *Experimental Pathology (Jena)*, 17(7-8), 359-373.

- Davidovic, M., Sevo, G., Svorcan, P., Milosevic, D.P., Despotovic, N. & Erceg, P. (2010). Old age as a privilege of the “selfish ones”. *Aging and Disease*, 1(2), 139–146.
- De Meyer, T., Rietzschel, E.R., De Buyzere, M.L., Van Criekinge, W. & Bekaert, S. (2008). Studying telomeres in a longitudinal population based study. *Frontiers in Bioscience*, 13(1), 2960–2970.
- De Pauw, A., Tejerina, S., Raes, M., Keijer, J. & Arnould, T. (2009). Mitochondrial (dys)function in adipocyte (de)differentiation and systemic metabolic alterations. *American Journal of Pathology*, 175(3), 927–939.
- Deaton, A.M. & Bird, A. (2011). CpG islands and the regulation of transcription. *Genes & Development*, 25(10), 1010-1022.
- Denis, H., Ndlovu, M.N. & Fuks, F. (2011). Regulation of mammalian DNA methyltransferases: a route to new mechanisms. *EMBO Reports*, 12(7), 647-656.
- Detmer, S.A. & Chan, D.C. (2007). Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(11), 870–879.
- Domecq, J.J., Skidmore, A.L., Lloyd, J.W. & Kaneene, J.B. (1997). Relationship between body condition scores and conception at first artificial insemination in a large dairy herd of high yielding Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 80(1), 113-120.
- Drackley, J.K. (1999). ADSA Foundation Scholar Award. Biology of dairy cows during the transition period: the final frontier? *Journal of Dairy Science*, 82(11), 2259-2273.
- Drackley, J.K. (2000). Use NEFA as a tool to monitor energy balance in transition dairy cows. *Illinois Dairy Days*.
- DVG (Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft). (2011). Leitlinien zur Entnahme von Milchproben unter antiseptischen Bedingungen und Isolierung und Identifizierung von Mastitiserregern. 3. Auflage, Giessen, Germany.
- Edmonson, A.J., Lean, I.J., Weaver, L.D., Farver, T. & Webster, G. (1989). A body condition scoring chart for holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 72(1), 68-78.
- Ehrlenbach, S., Willeit, P., Kiechl, S., Willeit, J., Reindl, M., Schanda, K., Kronenberg, F. & Brandstätter, A. (2009). Influences on the reduction of relative telomere length over 10 years in the population-based Bruneck Study: introduction of a well-controlled high-throughput assay. *International Journal of Epidemiology*, 38(6), 1725-1734.
- Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A. & Nagata, S. (1998). A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*, 391(6662), 43–50.
- Factor-Litvak, P., Susser, E., Kezios, K., McKeague, I., Kark, J.D., Hoffman, M., Kimura, M., Wapner, R. & Aviv, A. (2016). Leukocyte telomere length in newborns: implications for the role of telomeres in human disease. *Pediatrics*, 137(4), e20153927.

- Fain, JN. (2006). Release of interleukins and other inflammatory cytokines by human adipose tissue is enhanced in obesity and primarily due to the nonfat cells. *Vitamins and Hormones*, 74(1), 443-477.
- Fatemi, M., Hermann, A., Gowher, H. & Jeltsch, A. (2002). Dnmt3a and Dnmt1 functionally cooperate during de novo methylation of DNA. *European Journal of Biochemistry*, 269(20), 4981-4984.
- Fatemi, M., Hermann, A., Pradhan, S. & Jeltsch, A. (2001). The activity of the murine DNA methyltransferase Dnmt1 is controlled by interaction of the catalytic domain with the N-terminal part of the enzyme leading to an allosteric activation of the enzyme after binding to methylated DNA. *Journal of Molecular Biology*, 309(5), 1189-1199.
- Finley, L.W. & Haigis, M.C. (2009). The coordination of nuclear and mitochondrial communication during aging and calorie restriction. *Ageing Research Reviews*, 8(3), 173-188.
- Foley, C., O'Farrelly, C. & Meade, K.G. (2011). Technical note: Comparative analyses of the quality and yield of genomic DNA from invasive and noninvasive, automated and manual extraction methods. *Journal of Dairy Science*, 94(6), 3159-3165.
- Fraga, M.F. & Esteller, M. (2007). Epigenetics and aging: the targets and the marks. *Trends in Genetics*, 23(8), 413-418.
- Frayn, K.N., Karpe, F., Fielding, B.A., Macdonald, I.A. & Coppack, S.W. (2003). Integrative physiology of human adipose tissue. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders*, 27(8), 875-888.
- Frenck, R.W., Blackburn, E.H. & Shannon, K.M. (1998). The rate of telomere sequence loss in human leukocytes varies with age. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(10), 5607-5610.
- Frühbeck, G., Gómez-Ambrosi, J., Muruzábal, F.J. & Burrell, M.A. (2001). The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 280(6), E827-847.
- Galluzzi, L., Bravo-San Pedro, J.M. & Kroemer, G. (2014). Organelle-specific initiation of cell death. *Nature Cell Biology*, 16(8), 728-736.
- Galluzzi, L., Kepp, O., Trojel-Hansen, C. & Kroemer, G. (2012). Mitochondrial control of cellular life, stress, and death. *Circulation Research*, 111(9), 1198-1207.
- Galluzzi, L., Maiuri, M.C., Vitale, I., Zischka, H., Castedo, M., Zitvogel, L. & Kroemer, G. (2007). Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death and Differentiation*, 14(7), 1237-1243.
- Gardiner-Garden, M. & Frommer, M. (1987). CpG islands in vertebrate genomes. *Journal of Molecular Biology*, 196(2), 261-282.

- Gavrieli, Y., Sherman, Y. & Ben-Sasson, S.A., (1992). Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *Journal of Cell Biology*, 119(3), 493-501.
- GfE (German Society of Nutrition Physiology). (1991). Leitlinien für die Bestimmung der Verdaulichkeit von Roh Nährstoffen an Wiederkäuern. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 65(1), 229-234.
- GfE (German Society of Nutrition Physiology). (2001). Ausschuss für Bedarfsnormen der Gesellschaft für Ernährungsphysiologie. Nr. 8. Empfehlungen zur Energie- und Nährstoffversorgung der Milchkühe und Aufzuchttrinder. DLG-Verlag, Frankfurt am Main, Germany.
- Goldenthal, M.J. & Marin-Garcia, J. (2004). Mitochondrial signaling pathways: a receiver/integrator organelle. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 262(1-2), 1–16.
- Golding, M.C., Williamson, G.L., Stroud, T.K., Westhusin, M.E. & Long, C.R. (2011). Examination of DNA Methyltransferase expression in cloned embryos reveals an essential role for Dnmt1 in bovine development. *Molecular Reproduction and Development*, 78(5), 306-317.
- Goll, M.G. & Bestor, T.H. (2005). Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annual Review of Biochemistry*, 74(1), 481-514.
- Grasl-Kraupp, B., Ruttkay-Nedecky, B., Koudelka, H., Bukowska, K., Bursch, W. & Schulte-Hermann, R. (1995). In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: a cautionary note. *Hepatology*, 21(5), 1465-1468.
- Griffith, J.D., Comeau, L., Rosenfield, S., Stansel, R.M., Bianchi, A., Moss, H. & de Lange, T. (1999). Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell*, 97(4), 503–514.
- Groot, G.S. & Kroon, A.M. (1979). Mitochondrial DNA from various organisms does not contain internally methylated cytosine in -CCGG- sequences. *Biochimica et Biophysica Acta*, 564(1), 355-357.
- Gruoso, E., Rocha, M. & Puerta, M. (2001). Plasma and cerebrospinal fluid leptin levels are maintained despite enhanced food intake in progesterone-treated rats. *European Journal of Endocrinology*, 144, 659–665.
- Grummer, R.R. (1995). Impact of changes in organic nutrient metabolism on feeding the transition dairy cow. *Journal of Animal Science*, 73(9), 2820-2833.
- Haile-Mariam, M., Goddard, M.E. & Bowman, P.J. (2001). Estimates of genetic parameters for daily somatic cell count of Australian dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 84(5), 1255-1264.
- Harley, C.B., Futcher, A.B. & Greider, C.W. (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*, 345(6274), 458-460.



- Harman, D. (1988). Free radicals in aging. *Molecular and cellular Biochemistry*, 84(2), 155–161.
- Hastie, N.D., Dempster, M., Dunlop, M.G., Thompson, A.M., Green, D.K. & Allshire, R.C. (1990). Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing. *Nature*, 346(6287), 866–868.
- Häussler, S., Germeroth, D., Friedauer, K., Akter, A.H., Dänicke, S. & Sauerwein, H. (2013). Characterization of the dynamics of fat cell turnover in different bovine adipose tissue depots. *Research in Veterinary Science*, 95(1), 1142-1150.
- Hengartner, M.O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407(6805), 770-776.
- Hermann, A., Gowher, H. & Jeltsch, A. (2004). Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases. *Cellular and molecular life sciences*, 61(19-20), 2571 -2587.
- Hiss, S., Weinkauf, C., Hachenberg, S. & Sauerwein, H. (2009). Short communication: Relationship between metabolic status and the milk concentrations of haptoglobin and lactoferrin in dairy cows during early lactation. *Journal of Dairy Science*, 92(9), 4439-4443.
- Hoffmann, B. & Hamburger, R. (1973). Progesteron in der Milch: Radioimmunologische Bestimmung, Beziehungen zur Gelbkörperfunktion und zur Milchfettkonzentration. *Zuchthygiene* 8, 154-162.
- Hosseini, A., Sauerwein, H. & Mielenz, M. (2010). Putative reference genes for gene expression studies in propionate and beta-hydroxybutyrate treated bovine adipose tissue explants. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 94(5), e178-e184.
- Hulgan, T., Stein, J.H., Bruno, R.C., Deborah, G.M., Ritchie, M.D., Dube, M.P., Gerschenson, M., Haas, D.W. & Torriani, F.J. (2013). Mitochondrial DNA variation and changes in adiponectin and endothelial function in HIV-infected adults after antiretroviral therapy initiation. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 29(10), 1293-1299.
- Huzzey, J.M., Duffield, T.F., LeBlanc, S.J., Veira, D.M., Weary, D.M. & von Keyserlingk, M.A. (2009). Short communication: Haptoglobin as an early indicator of metritis. *Journal of Dairy Science*, 92(2), 621-625.
- Ide, T., Tsutsui, H., Hayashidani, S., Kang, D., Suematsu, N., Nakamura, K., Utsumi, H., Hamasaki, N. & Takeshita, A. (2001). Mitochondrial DNA damage and dysfunction associated with oxidative stress in failing hearts after myocardial infarction. *Circulation Research*, 88(5), 529-535.
- Illi, B., Colussi, C., Grasselli, A., Farsetti, A., Capogrossi, M.C. & Gaetano, C. (2009). NO sparks off chromatin: tales of a multifaceted epigenetic regulator. *Pharmacology & Therapeutics*; 123(3), 344–352.

- Jackson, M., Krassowska, A., Gilbert, N., Chevassut, T., Forrester, L., Ansell, J., Ramsahoye, B. (2004). Severe global DNA hypomethylation blocks differentiation and induces histone hyperacetylation in embryonic stem cells. *Molecular and Cellular Biology*, 24(20), 8862-8871.
- Jair, K.W., Bachman, K.E., Suzuki, H., Ting, A.H., Rhee, I., Yen, R.W., Baylin, S.B. & Schuebel, K.E. (2006). De novo CpG island methylation in human cancer cells. *Cancer Research*, 66(2), 682- 692.
- Jakobs, S., Martini, N., Schauss, A.C., Egner, A., Westermann, B. & Hell, S.W. (2003). Spatial and temporal dynamics of budding yeast mitochondria lacking the division component Fis1p. *Journal of Cell Science*, 116(10), 2005-2014.
- Jastroch, M., Oelkrug, R. & Keipert, S. (2018). Insights into brown adipose tissue evolution and function from non-model organisms. *Journal of Experimental Biology*, 221 (Pt Suppl 1).
- Jawor, P., Brzozowska, A., Sloniewski, K., Kowalski, Z.M. & Stefaniak, T. (2016). Acute phase response in the primiparous dairy cows after repeated percutaneous liver biopsy during the transition period. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 19(2), 393-399.
- Jawor, P., Steiner, S., Stefaniak, T., Baumgartner, W. & Rzasa, A. (2008). Determination of selected acute phase proteins during the treatment of limb diseases in dairy cows. *Veterinarni Medicina*, 53(4), 173-183.
- Jeyapalan, J.C. & Sedivy, J.M. (2008). Cellular senescence and organismal aging. *Mechanisms of Ageing and Development*, 129(7-8), 467–474.
- Jin, K. (2010). Modern Biological Theories of Aging. *Aging and Disease*, 1(2), 72-74.
- Jung, M. & Pfeifer, G.P. (2015). Aging and DNA methylation. *BMC Biology*, 13(1), 7.
- Jorritsma, R., Wensing T., Kruip, T.A., Vos, P.L. & Noordhuizen, J.P. (2003). Metabolic changes in early lactation and impaired reproductive performance in dairy cows. *Veterinary Research*, 34(1), 11-26.
- Jurkowska, R.Z., Jurkowski, T.P. & Jeltsch, A. (2011). Structure and function of mammalian DNA methyltransferases. *ChemBioChem*, 12(2), 206-222.
- Kaaman, M., Sparks, L.M., van Harmelen, V., Smith, S.R., Sjölin, E., Dahlman, I. & Arner, P. (2007). Strong association between mitochondrial DNA copy number and lipogenesis in human white adipose tissue. *Diabetologia*, 50(12), 2526-2533.
- Kadegowda, A.K., Bionaz, M., Thering, B., Piperova, L.S., Erdman, R.A. & Loor, J.J. (2009). Identification of internal control genes for quantitative polymerase chain reaction in mammary tissue of lactating cows receiving lipid supplements. *Journal of Dairy Science*, 92(5), 2007–2019.
- Kearns, C.F., McKeever, K.H., Roegner, V., Brady, S.M. & Malinowski, K. (2006). Adiponectin and leptin are related to fat mass in horses. *Veterinary Journal*, 172(3), 460–465.

- Kehrli, M.E. & Shuster, D.E. (1994). Factors affecting milk somatic cells and their role in health of the bovine mammary gland. *Journal of Dairy Science*, 77(2), 619-627.
- Kelly, D.P. (2011). Cell biology: Ageing theories unified. *Nature*, 470(7334), 342-343.
- Kenéz, A., Kulcsár, A., Kluge, F., Benbelkacem, I., Hansen, K., Locher, L., Meyer, U., Rehage, J., Dänicke, S. & Huber, K. (2015). Changes of adipose tissue morphology and composition during late pregnancy and early lactation in dairy cows. *PLoS ONE*, 10(5), e0127208.
- Kern, P.A., Di Gregorio, G.B., Lu, T., Rassouli, N. & Ranganathan, G. (2003). Adiponectin expression from human adipose tissue: relation to obesity, insulin resistance, and tumor necrosis factor-alpha expression. *Diabetes*, 52(7), 1779–1785.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H. & Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, 26(4), 239-257.
- Kershaw, E.E. & Flier, J.S. (2004). Adipose tissue as an endocrine organ. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 89(6), 2548–2556.
- Kirkwood, T.B. & Austad, S.N. (2000). Why do we age? *Nature*, 408(6809), 233-238.
- Klengel, T., Pape, J., Binder, E.B. & Mehta, D. (2014). The role of DNA methylation in stress-related psychiatric disorders. *Neuropharmacology*, 80(1), 115-132.
- Koh, E.H., Park, J.Y., Park, H.S., Jeon, M.J., Ryu, J.W., Kim, M., Kim, S.Y., Kim, M.S., Kim, S.W., Park, I.S., Youn, J.H. and Lee, K.U. (2007). Essential role of mitochondrial function in adiponectin synthesis in adipocytes. *Diabetes*, 56(12), 2973–2981.
- Kusminski, C.M. & Scherer, P.E. (2012). Mitochondrial dysfunction in white adipose tissue. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 23(9), 435-443.
- Lanna, D.P., Houseknecht, K.L., Harris D.M. & Bauman, D.E. (1995). Effect of somatotropin treatment on lipogenesis, lipolysis, and related cellular mechanisms in adipose tissue of lactating cows. *Journal of Dairy Science*, 78(8), 1703-1712.
- Lansdorp, P.M., Verwoerd, N.P., van de Rijke, F.M., Dragowska, V., Little, M.T., Dirks, R.W., Raap, A.K. & Tanke, H.J. (1996). Heterogeneity in telomere length of human chromosomes. *Human Molecular Genetics*, 5(5), 685–691.
- Larsen, S., Nielsen, J., Neigaard Hansen, C., Nielsen, L.B., Wibrand, F., Stride, N., Daa Schroder, H., Boushel, R., Wulff Helge, J., Dela, F. & Hey-Mogensen, M. (2012). Biomarkers of mitochondrial content in skeletal muscle of healthy young human subjects. *Journal of Physiology*, 14(2012), 3349-3360.
- Laubenthal, L., Hoelker, M., Frahm, J., Dänicke, S., Gerlach, K., Südekum, K.H., Sauerwein, H. & Häussler, S. (2016a). Mitochondrial DNA copy number and biogenesis in different tissues of early- and late-lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 99(2), 1571-1583.

- Laubenthal, L., Hoelker, M., Frahm, J., Dänicke, S., Gerlach, K., Südekum, K.H., Sauerwein, H. & Häussler, S. (2016b). Short communication: Telomere lengths in different tissues of dairy cows during early and late lactation. *Journal of Dairy Science*, 99(6), 4881-4885.
- Laubenthal, L., Ruda, L., Sultana, N., Winkler, J., Rehage, J., Meyer, U., Dänicke, S., Sauerwein, H. & Häussler, S. (2017). Effect of increasing body condition on oxidative stress and mitochondrial biogenesis in subcutaneous adipose tissue depot of nonlactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 100(6), 4976-4986.
- Lee, H.C. & Wei, Y.-H. (2005). Mitochondrial biogenesis and mitochondrial DNA maintenance of mammalian cells under oxidative stress. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 37(4), 822–834.
- Lee, H.C., Yin, P.H., Lu, C.Y., Chi, C.W. & Wie, Y.H. (2000). Increase of mitochondria and mitochondrial DNA in response to oxidative stress in human cells. *Biochemical Journal*, 348(Pt 2), 425-432.
- Lee, H.W., Blasco, M.A., Gottlieb, G.J., Horner, J.W. 2nd, Greider, C.W. & DePinho, R.A. (1998). Essential role of mouse telomerase in highly proliferative organs. *Nature*, 392(6676), 569-574.
- Lenaz, G. (1998). Role of mitochondria in oxidative stress and ageing. *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics*, 1366 (1-2), 53–67.
- Li, E. (1997). Role of DNA methylation in development. In: Reik, W. & Surani, A. (Eds) *Genomic Imprinting: Frontiers in Molecular Biology*. IRL Press, Oxford, 1-20.
- Li, P., Zhu, Z., Lu, Y. & Granneman, J.G. (2005). Metabolic and cellular plasticity in white adipose tissue II: role of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 289(4), E617-626.
- Liang, G., Chan, M.F., Tomigahara, Y., Tsai, Y.C., Gonzales, F.A., Li, E., Laird, P.W. & Jones, P.A. (2002). Cooperativity between DNA methyltransferases in the maintenance methylation of repetitive elements. *Molecular and Cellular Biology*, 22(2), 480-491.
- Lindinger, A., Peterli, R., Peters, T., Kern, B., von Flüe, M., Calame, M., Hoch, M., Eberle, A.N. & Lindinger, P.W. (2010). Mitochondrial DNA content in human omental adipose tissue. *Obesity Surgery*, 20(1), 84-92.
- Liu, C.-S., Tsai, C.-S., Kuo, C.-L., Chen, H.-W., Lii, C.-K., Ma, Y.-S. & Wei, Y.-H. (2003). Oxidative stress-related alteration of the copy number of mitochondrial DNA in human leukocytes. *Free Radical Research*, 37(12), 1307–1317.
- Liu, X., Kim, C.N., Yang, J., Jemmerson, R. & Wang, X. (1996). Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*, 86(1), 147–157.
- Loeser, R.F. (2017). The role of aging in the development of osteoarthritis. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association*, 128(1), 44-54.

- López-Otín, C., Blasco, M.A., Partridge, L., Serrano, M. & Kroemer, G. (2013). The hallmarks of aging. *Cell*, 153(6), 1194–1217.
- Lu, R.H., Ji, H., Chang, Z.G., Su, S.S. & Yang, G.S. (2010). Mitochondrial development and the influence of its dysfunction during rat adipocyte differentiation. *Molecular Biology Reports*, 37(5), 2173-2182.
- Mancuso, P. (2016). The role of adipokines in chronic inflammation. *ImmunoTargets and Therapy*, 5(1), 47-56.
- Mandavilli, B.S., Santos, J.H. & Van Houten, B. (2002). Mitochondrial DNA repair and aging. *Mutation Research*, 36(41), 127-151.
- Marchetto, N.M., Glynn, R.A., Ferry, M.L., Ostojic, M., Wolff, S.M., Yao, R. & Haussmann, M.F. (2016). Prenatal stress and newborn telomere length. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 215(1), 94.e1-8.
- McNamara, J.P. (1991). Regulation of adipose tissue metabolism in support of lactation. *Journal of Dairy Science*, 74(2), 706–719.
- Meissner, A., Mikkelsen, T.S., Gu, H., Wernig, M., Hanna, J., Sivachenko, A., Zhang, X., Bernstein, B.E., Nusbaum, C., Jaffe, D.B., Gnirke, A., Jaenisch, R. & Lander, E.S. (2008). Genomescale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells. *Nature*, 454(7205), 766-770.
- Messerschmidt, D.M., Knowles, B.B. & Solter, D. (2014). DNA methylation dynamics during epigenetic reprogramming in the germline and preimplantation embryos. *Genes & Development*, 28(8), 812-828.
- Mielenz, M., Mielenz, B., Singh, S.P., Kopp, C., Heinz, J., Häussler, S. & Sauerwein, H. (2013). Development, validation and pilot application of a semi-quantitative Western blot and a sandwich ELISA for bovine adiponectin. *Domestic Animal Endocrinology*, 44(3), 121-130.
- Miller, J.K., Brzezinska-Slebodzinska, E. & Madsen, F.C. (1993). Oxidative stress, antioxidants, and animal function. *Journal of Dairy Science*, 76(9), 2812-2823.
- Minn, A.J., Velez, P., Schendel, S.L., Liang, H., Muchmore, S.W., Fesik, S.W., Fill, M. & Thompson, C.B. (1997). Bcl-x(L) forms an ion channel in synthetic lipid membranes. *Nature*, 385(6614), 353–357.
- Moe, P.W. & Tyrrell, H.F. (1972). Metabolizable energy requirements of pregnant dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 55(4), 480-483.
- Moe, P.W., Tyrrell, H.F. & Flatt, W.P. (1971). Energetics of body tissue mobilization. *Journal of Dairy Science*, 54(4), 548–553.
- Mooi, W.J. & Peeper, D.S. (2006). Oncogene-induced cell senescence—halting on the road to cancer. *The New England Journal of Medicine*, 355(10), 1037–1046.

- Moyzis, R.K., Buckingham, J.M., Cram, L.S., Dani, M., Deaven, L.L., Jones, M.D., Meyne, J., Ratliff, R.L. & Wu, J.R. (1988). A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)<sub>n</sub>, present at the telomeres of human chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 85(18), 6622–6626.
- Mrode, R.A., Swanson, G.J. & Winters, M.S. (1998). Genetic parameters and evaluation for somatic cell counts and its relationship with production and type traits in some dairy breeds in the United Kingdom. *Animal Science*, 66(3), 569–576.
- Müezzinler, A., Mons, U., Dieffenbach, A.K., Butterbach, K., Saum, K.U., Schick, M., Stammer, H., Boukamp, P., Holleczeck, B., Stegmaier, C. & Brenner, H. (2016). Body mass index and leukocyte telomere length dynamics among older adults: Results from the ESTHER cohort. *Experimental gerontology*, 74(1), 1-8.
- Muráni, E., Murániová, M., Ponsuksili, S., Schellander, K. & Wimmers, K. (2007). Identification of genes differentially expressed during prenatal development of skeletal muscle in two pig breeds differing in muscularity. *BMC Developmental Biology*, 7(1), 109.
- Murphy, M.A., Shariflou, M.R. & Moran, C. (2002). High quality genomic DNA extraction from large milk samples. *Journal of Dairy Research*, 69(4), 645-649.
- Nadanaciva, S., Bernal, A., Aggeler, R., Capaldi, R. & Will, Y. (2007). Target identification of drug induced mitochondrial toxicity using immunocapture based OXPHOS activity assays. *Toxicology in Vitro*, 21(5), 902–911.
- Nagata, S. (2000). Apoptotic DNA fragmentation. *Experimental Cell Research*, 256(1), 12–18.
- Nemoto, S., Takeda, K., Yu, Z.X., Ferrans, V.J. & Finkel, T. (2000). Role for mitochondrial oxidants as regulators of cellular metabolism. *Molecular and Cellular Biology*, 20(19), 7311-7318.
- Nicklas, J.A., Brooks, E.M., Hunter, T.C., Single, R. & Branda, R.F. (2004). Development of a quantitative PCR (TaqMan) assay for relative mitochondrial DNA copy number and the common mitochondrial DNA deletion in the rat. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 44(4), 313-320.
- Nogueira, V., Rigoulet, M., Piquet, M.A., Devin, A., Fontaine, E. & Leverve, X.M. (2001). Mitochondrial respiratory chain adjustment to cellular energy demand. *Journal of Biological Chemistry*, 276(49), 46104–46110.
- Nordfjäll, K., Svenson, U., Norrback, K.F., Adolfsson, R., Lenner, P. & Roos, G. (2009). The individual blood cell telomere attrition rate is telomere length dependent. *PLoS Genetics*, 5(2), e1000375.
- Nussey, D.H., Baird, D., Barrett, E., Boner, W., Fairlie, J., Gemmell, N., Hartmann N., Horn, T., Haussmann, M., Olsson, M., Turbill, C., Verhulst, S., Zahn, S. & Monaghan, P. (2014). Measuring telomere length and telomere dynamics in evolutionary biology and ecology. *Methods in Ecology and Evolution*, 5(4), 299-310.

- O'Brien, M.A. & Kirby, R. (2008). Apoptosis: A review of pro-apoptotic and anti-apoptotic pathways and dysregulation in disease. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 18(6), 572-585.
- Okano, M., Bell, D.W., Haber, D.A. & Li, E. (1999). DNA Methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b Are Essential for De Novo Methylation and Mammalian Development. *Cell*, 99(3), 247-257.
- Okuda, K., Bardeguet, A., Gardner, J.P., Rodriguez, P., Ganesh, V., Kimura, M., Skurnick, J., Awad, G. & Aviv, A. (2002). Telomere length in the newborn. *Pediatric Research*, 52(3), 377-381.
- Ouellette, M.M., Liao, M., Herbert, B.S., Johnson, M., Holt, S.E., Liss, H.S., Shay, J.W. & Wright, W.E. (2000). Subsenescent telomere lengths in fibroblasts immortalized by limiting amounts of telomerase. *Journal of Biological Chemistry*, 275(14), 10072-10076.
- Passos, J.F., Saretzki, G. & von Zglinicki, T. (2007). DNA damage in telomeres and mitochondria during cellular senescence: is there a connection? *Nucleic Acids Research*, 35(22), 7505-7513.
- Pelleymounter, M.A., Cullen, M.J., Baker, M.B., Hecht, R., Winters, D., Boone, T. & Collins, F. (1995). Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science*, 269(5223), 540-543.
- Pettersson, K.J., Gustafsson, H., Strandberg, E. & Berglund, B. (2006). Atypical progesterone profiles and fertility in Swedish dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 89(7), 2529-2538.
- Picard, M., Taivassalo, T., Ritchie, D., Wright, K.J., Thomas, M.M., Romestaing, C. & Hepple, R.T. (2011). Mitochondrial structure and function are disrupted by standard isolation methods. *PLoS One*, 6(3), e18317.
- Pichaud, N., Garratt, M., Ballard, J.W. & Brooks, R.C. (2013). Physiological adaptations to reproduction. II. Mitochondrial adjustments in livers of lactating mice. *Journal of Experimental Biology*, 216(15), 2889-2895.
- Pires, J.A., Delavaud, C., Faulconnier, Y., Pomiès, D. & Chilliard, Y. (2013). Effects of body condition score at calving on indicators of fat and protein mobilization of periparturient Holstein-Friesian cows. *Journal of Dairy Science*, 96(10), 6423-6439.
- Pollina, E.A. & Brunet, A. (2011). Epigenetic regulation of aging stem cells. *Oncogene*, 30(28), 3105-3126.
- Pratley, R.E., Nicolson, M., Bogardus, C. & Ravussin, E. (1997). Plasma leptin responses to fasting in Pima Indians. *American Journal of Physiology*, 273(3 Pt 1), E644-E649.
- Prolo, P., Wong, M.L. & Licinio, J. (1998). Leptin. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 30(12), 1285-1290.

- Ravagnan, L., Roumier, T. & Kroemer, G. (2002). Mitochondria, the killer organelles and their weapons. *Journal of Cellular Physiology*, 192(2), 131–137.
- Ray, D.E., Halbach, T.J. & Armstrong, D.V. (1992). Season and lactation number effects on milk production and reproduction of dairy cattle in Arizona. *Journal of Dairy Science*, 75(11), 2976–2983.
- Regenhard, P., Nakov, D. & Sauerwein, H. (2014). Applicability of a spectrophotometric method for assessment of oxidative stress in poultry. *Macedonian Veterinary Review*, 37(1), 43-47.
- Robertson, K.D. (2005). DNA methylation and human disease. *Nature Reviews Genetics*, 6(8), 597-610.
- Romanov, G.A. & Vanyushin, B.F. (1981). Methylation of reiterated sequences in mammalian DNAs. Effects of the tissue type, age, malignancy and hormonal induction. *Biochimica et Biophysica Acta*, 653(2), 204–218.
- Rossow, N. (2004). Die Energiebilanzsituation der Milchkuh in der Früh lactation. [http://www.portal-rind.de/data/artikel/49/artikel\\_49.pdf](http://www.portal-rind.de/data/artikel/49/artikel_49.pdf), 26. Februar 2018
- Roth, T.L., Lubin, F.D., Funk, A.J. & Sweatt, J.D. (2009). Lasting epigenetic influence of early-life adversity on the BDNF gene. *Biological Psychiatry*, 65(9), 760-769.
- Ruiz, F.J., Oltenacu, P.A. & Smith, R.D. (1989). Evaluation of on-farm milk progesterone tests for determine nonpregnant cows and to prevent insemination errors. *Journal of Dairy Science*, 72(10), 2718-2727.
- Santos, J.H., Hunakova, L., Chen, Y., Bortner, C. & Van Houten, B. (2003). Cell sorting experiments link persistent mitochondrial DNA damage with loss of mitochondrial membrane potential and apoptotic cell death. *Journal of Biological Chemistry*, 278(3), 1728–1734.
- Saremi, B., Al-Dawood, A., Winand, S., Müller, U., Pappritz, J., von Soosten, D., Rehage, J., Dänicke, S., Häussler, S., Mielenz, M. & Sauerwein, H. (2012). Bovine haptoglobin as an adipokine: Serum concentrations and tissue expression in dairy cows receiving a conjugated linoleic acids supplement throughout lactation. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 146(2012), 201-211.
- Sauerwein, H., Heintges, U., Bruhns, S.C., Hennies, M. & Gertler, A. (2006). Active immunization against leptin failst o affect reproduction and exerts only marginal effects on glucose metabolism in young female goats. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 90(7-8), 278-288.
- Sauerwein, H., Heintges, U., Hennies, A., Selhorst, T. & Daxenberger, A. (2004). Growth hormone induced alterations of leptin serum concentrations in dairy cows as measured by a novel enzyme immunoassay. *Livestock Production Science*, 87(2-3), 189-195.



- Scarpulla, R.C. (2002). Nuclear activators and coactivators in mammalian mitochondrial biogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1576(1-2), 1-14.
- Schnurrbusch, U. & Vogler, B. (2005). *Gynäkologie für Veterinärmediziner (Teil 1)* (3. Auflage). Verlag Wissenschaftlicher Schriften, Zwickau, Deutschland.
- Schübeler, D. (2015). Function and information content of DNA methylation. *Nature*, 517(7534), 321-326.
- Schutz, M.M., Hansen, L.B., Steuernagel, G.R. & Kuck, A.L. (1990). Variation of milk, fat, protein, and somatic cells for dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 73(2), 484–493.
- Shen, W., Wang, Z., Punyanita, M., Lei, J., Sinav, A., Kral, J.G., Imielinska, C., Ross, R. & Heymsfield, S.B. (2003). Adipose tissue quantification by imaging methods: a proposed classification. *Obesity Research*. 11(1), 5-16.
- Shimizu, S. & Tsujimoto, Y. (2000). Proapoptotic BH3-only Bcl-2 family members induce cytochrome c release, but not mitochondrial membrane potential loss, and do not directly modulate voltage-dependent anion channel activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(2), 577-582.
- Singal, R. & Ginder, G.D. (1999). DNA methylation. *Blood*, 93(12), 4059-4070.
- Singh, S.P., Häussler, S., Gross, J.J., Schwarz, F.J., Bruckmaier, R.M. & Sauerwein, H. (2014). Short communication: Circulating and milk adiponectin change differently during energy deficiency at different stages of lactation in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 97(3), 1535-1542.
- Smith, T.R. & McNamara, J.P. (1990). Regulation of bovine adipose tissue metabolism during lactation. 6. Cellularity and hormone-sensitive lipase activity as affected by genetic merit and energy intake. *Journal of Dairy Science*, 73(3), 772-783.
- Smith, Z.D. & Meissner, A. (2013). DNA methylation: roles in mammalian development. *Nature Reviews Genetics*, 14(3), 204-220.
- Sohal, R.S. & Weindruch, R. (1996). Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science*, 273(5271), 59-63.
- Sorensen, M.T., Nørgaard, J.V., Theil, P.K., Vestergaard, M. & Sejrsen, K. (2006). Cell turnover and activity in mammary tissue during lactation and the dry period in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 89(12), 4632-4639.
- Spiegelman, B.M. & Flier, J.S. (2001). Obesity and the regulation of energy balance. *Cell*, 104(4), 531–543.
- Stier, A., Bize, P., Schull, Q., Zoll, J., Singh, F., Geny, B., Gros, F., Royer, C., Massemin, S. & Criscuolo, F. (2013). Avian erythrocytes have functional mitochondria, opening novel perspectives for birds as animal models in the study of ageing. *Frontiers in Zoology*, 10(1), 33.

- Takai, D. & Jones, P.A. (2002). Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(6), 3740-3745.
- Taylor, R.C., Cullen, S.P. & Martin, S.J. (2008). Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(3), 231-241.
- Tilesi, F., Domenico, E.G.D., Pariset, L., Bosco, L., Willems, D., Valentini, A. & Ascenzioni, F. (2010). Telomere Length Diversity in Cattle Breeds. *Diversity*, 2(9), 1118-1129.
- Trotti, R., Carratelli, M., Barbieri, M., Micieli, G., Bosone, D., Rondanelli, M. & Bo, P. (2001). Oxidative stress and a thrombophilic condition in alcoholics without severe liver disease. *Haematologica*, 86(1), 85-91.
- Tyrrell, H.F. & Reid, J.T. (1965). Prediction of the energy value of cow's milk. *Journal of Dairy Science*, 48(9), 1215-1223.
- Tzanetakou, I.P., Katsilambros, N.L., Benetos, A., Mikhailidis, D.P. & Perrea, D.N. (2012). "Is obesity linked to aging?": adipose tissue and the role of telomeres. *Ageing Research Reviews*, 11(2), 220-229.
- Usman, T., Yu, Y., Liu, C., Fan, Z. & Wang, Y. (2014). Comparison of methods for high quantity and quality genomic DNA extraction from raw cow milk. *Genetics and Molecular Research*, 13(2), 3319-3328.
- Valencak, T.G., Raith, J., Staniek, K., Gille, L. & Strasser, A. (2016). Lactation affects isolated mitochondria and its fatty acid composition but has no effect on tissue protein oxidation, lipid peroxidation or DNA-damage in laboratory mice. *Antioxidants*, 5(1), 2.
- Vazquez, A., Bond, E.E., Levine, A.J. & Bond, G.L. (2008). The genetics of the p53 pathway, apoptosis and cancer therapy. *Nature Reviews Drug Discovery*, 7(12), 979-987.
- Verhagen, A.M., Ekert, P.G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L.M., Reid, G.E., Moritz, R.L., Simpson, R.J. & Vaux, D.L. (2000). Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell*, 102(1), 43-53.
- Vertino, P.M., Yen, R.W., Gao, J. & Baylin, S.B. (1996). De novo methylation of CpG island sequences in human fibroblasts overexpressing DNA (cytosine-5)-methyltransferase. *Molecular and Cellular Biology*, 16(8), 4555-4565.
- Vijayakumar, M., Park, J.H., Ki, K.S., Lim, D.H., Kim, S.B., Park, S.M., Jeong, H.Y., Park, B.Y. & Kim, T.I. (2017). The effect of lactation number, stage, length, and milking frequency on milk yield in Korean Holstein dairy cows using automatic milking system. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 30(8), 1093-1098.

- von Zglinicki, T., Serra, V., Lorenz, M., Saretzki, G., Lenzen-Grossimlighaus, R., Gessner, R., Risch, A. & Steinhagen-Thiessen, E. (2000). Short telomeres in patients with vascular dementia: an indicator of low antioxidative capacity and a possible risk factor? *Laboratory Investigation*, 80(11), 1739–1747.
- Wallace, D.C. (2005). A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annual Review of Genetics*, 39(1), 359–407.
- Wallace, D.C. & Chalkia, D. (2013). Mitochondrial DNA genetics and the heteroplasmy conundrum in evolution and disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(11), a021220.
- Weaver, I.C., Cervoni, N., Champagne, F.A., D'Alessio, A.C., Sharma, S., Seckl, J.R., Dymov, S., Szyf, M. & Meaney, M.J. (2004). Epigenetic programming by maternal behavior. *Nature Neuroscience*, 7(8), 847-854.
- Weber, C., Schäff, C.T., Kautzsch, U., Börner, S., Erdmann, S., Bruckmaier, R.M., Röntgen, M., Kuhla, B. & Hammon, H.M. (2017). Variable liver fat concentration as a proxy for body fat mobilization postpartum has minor effects on insulin-induced changes in hepatic gene expression related to energy metabolism in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 100(2), 1507-1520.
- Wildman, E.E., Jones, G.M., Wagner, P.E., Boman, R.L., Troutt, H.F. & Lesch, T.N. (1982). A dairy cow body condition scoring system and its relationship to select production characteristics. *Journal of Dairy Science*, 65(1), 495-502.
- Willingham, M.C. (1999). Cytochemical methods for the detection of apoptosis. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 47(9), 1101-1109.
- Witko-Sarsat, V., Nguyen Khoa, T., Jungers, P., Drüeke, T. & Descamps-Latscha, B. (1998). Advanced oxidation protein products: oxidative stress markers and mediators of inflammation in uremia. *Advances in Nephrology from the Necker Hospital*, 28(1), 321-341.
- Wong-Riley, M.T. (1989). Cytochrome oxidase: an endogenous metabolic marker for neuronal activity. *Trends in Neurosciences*, 12(3), 94-101.
- Wu, H. & Zhang, Y. (2014). Reversing DNA methylation: mechanisms, genomics, and biological functions. *Cell*, 156(1-2), 45-68.
- Yu, Y.H. & Zhu, H. (2004). Chronological changes in metabolism and functions of cultured adipocytes: a hypothesis for cell aging in mature adipocytes. *American Journal of Physiology- Endocrinology and Metabolism*, 286(1), E402–E410.
- Zakian, V.A. (1989). Structure and function of telomeres. *Annual Review of Genetics*, 23(1), 579-604.

- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L. & Friedman, J.M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 372(6505), 425–432.
- Ziller, M.J., Müller, F., Liao, J., Zhang, Y., Gu, H., Bock, C., Boyle, P., Epstein, C.B., Bernstein, B.E, Lengauer, T., Gnirke, A. & Meissner, A. (2011). Genomic distribution and inter-sample variation of non-CpG methylation across human cell types. *PLoS Genetics*, 7(12), e1002389.
- Zin'kovskaia, G.G., Berdyshev, G.D. & Vaniushin, B.F. (1978). *Biokhimiia*, 43(10), 1883-1892.
- Zou, H., Li, Y., Liu, X. & Wang, X. (1999). An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *Journal of Biological Chemistry*, 274(17), 11549-11556.

## **9 Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, den 24.01.2020

Tina Bleikamp











