

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

**Mikroarrayuntersuchung**  
**zur Beeinflussung der Genexpression in der Rinderleber**  
**nach postpartaler Propylenglycolsupplementierung**

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

vorgelegt von  
**KERSTIN REISBERG**  
Tierärztin  
aus Magdeburg

Berlin 2012  
Journal-Nr.: 3583

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Leo Brunnberg  
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Jörg Aschenbach  
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek  
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Wolfgang Heuwieser

*Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):*

Cattle, dairy cows, propylene glycol, ketosis, metabolism, postpartum period,  
gene expression, DNA microarrays, cholesterol

Tag der Promotion: 11.02.2013

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

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

ISBN: 978-3-86387-284-7

**Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2012**

Dissertation, Freie Universität Berlin

**D 188**

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

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

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

This document is protected by copyright law.

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

Coverbild vorne © focus finder - Fotolia.com

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2013

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – [www.menschundbuch.de](http://www.menschundbuch.de)

**„Der Weg ist das Ziel“**

*Konfuzius*

**Meinem Vater gewidmet (\*1949 - †2005)**



**Inhaltsverzeichnis**

1	Einleitung.....	1
2	Literatur.....	2
2.1	Ketose.....	2
2.1.1	Definition der Ketose.....	2
2.1.2	Begriffsbestimmungen.....	2
2.1.3	Epidemiologie.....	3
2.1.4	Pathogenese der Ketose.....	4
2.1.5	Klinische Symptome der Ketose.....	5
2.1.6	Veränderungen der Blutwerte.....	6
2.1.7	Veränderungen der Genexpression während der Ketose.....	7
2.1.8	Risikofaktoren für Ketose.....	8
2.2	Propylenglycol.....	11
2.2.1	Allgemeine Eigenschaften.....	11
2.2.2	Allgemeine Verwendungszwecke.....	12
2.2.3	Toxizität.....	12
2.3	Verwendung von PG zur Ketosetherapie und Prophylaxe.....	13
2.4	Wirkmechanismus des Propylenglycols beim Rind.....	14
2.5	Potenzielle, durch PG-Fütterung beeinflusste Stoffwechselwege.....	15
2.5.1	Glucosestoffwechsel.....	15
2.5.2	Ketonkörperstoffwechsel.....	17
2.5.3	Fettstoffwechsel.....	18
2.5.4	Citratzyklus.....	19
2.5.5	Insulinabhängige Stoffwechselwege.....	19
2.5.6	Phosphoinositol-3-Kinase.....	20
2.5.7	Abbauwege für PG und Propanol.....	20

## ii Inhaltsverzeichnis

2.5.8	Bedeutung der Literatur für die eigene Fragestellung.....	21
3	Tiere, Material und Methoden.....	22
3.1	Versuchsdesign .....	22
3.2	Probennahme .....	24
3.2.1	Blutprobennahme .....	24
3.2.2	Leberbiopsie .....	25
3.2.3	Mikroarrayuntersuchung .....	26
3.2.4	Isolierung von Gesamt-RNA aus Lebergewebe .....	26
3.2.5	Qualitätskontrolle der RNA .....	27
3.2.6	Mikroarrayhybridisierung.....	28
3.2.7	Allgemeiner Aufbau des verwendeten Mikroarray .....	31
3.2.8	Analyse der Mikroarray-Daten.....	32
3.2.9	Qualitätskontrolle der Mikroarray-Daten .....	32
3.2.10	Statistische Auswertung der Mikroarray-Daten .....	32
3.2.11	Quantitative Real-time-PCR .....	36
3.2.12	Bestimmung von Propylenglycol, Ethanol und Propanol im Blut .....	38
	und Propylenglycol im Futter .....	38
3.2.13	Bestimmung von Sterolen im Serum .....	39
3.2.14	Bestimmung der Insulinkonzentration im Serum mittels INS-IRMA.....	39
3.2.15	IGF-1-Bestimmung.....	40
3.2.16	Bestimmung der antioxidativen Kapazität im Serum.....	40
3.2.17	Bestimmung der Blutkonzentrationen wichtiger.....	42
	Stoffwechselmetabolite und Enzyme.....	42
3.2.18	Statistische und grafische Auswertung von Konzentrationen .....	43
	bzw. Aktivitäten von Blutserum bzw. Futtermittelinhaltsstoffen.....	43
4	Ergebnisse .....	44

4.1	Analyse von Propylenglycol im Futter .....	44
4.2	Analyse von Propylenglycol, Propanol und Ethanol im Blut .....	44
4.3	Expressionsanalyse hepatischer Gene mittels Oligonukleotid-Mikroarrays.....	45
4.4	Expressionsanalyse stoffwechselrelevanter Gengruppen.....	47
4.5	Analyse differentiell exprimierter Einzelgene .....	48
4.6	Validierung der Mikroarray-Ergebnisse mittels quantitativer Real-time-PCR .....	50
4.7	Korrelation zwischen Mikroarray- und PCR-Ergebnissen.....	51
4.8	Korrelation zwischen Genexpression und Propylenglycol- sowie Propanol-Konzentration im Blutserum. ....	52
4.9	Stoffwechselwerte und Milchleistung.....	54
4.10	Konzentration von Sterolen im Blutserum und Futter .....	55
4.10.1	Cholesterin-Konzentration im Blut zum Biopsiezeitpunkt.....	55
4.10.2	Cholesterin und Cholesterin-Vorstufen im Zeitverlauf.....	56
4.10.3	Gehalt an Cholesterol und weiteren Sterolen in der Totalen Mischration.....	59
4.11	Phytosterole im Blutserum .....	60
5	Diskussion.....	63
5.1	Allgemeine metabolische Wirkungen des Propylenglycol .....	63
5.2	Propylenglycol und Propanol und weitere Metaboliten als mögliche Auslöser der PG-Wirkung in der Leber .....	66
5.3	Genexpressionsänderung stoffwechselrelevanter Gengruppen .....	67
5.4	Bestätigung der Mikroarrayergebnisse mittels qRT-PCR .....	69
5.5	Biologische Signifikanz der transkriptionellen Regulation der Cholesterinsynthese	70
5.5.1	Zeitlicher Verlauf der Cholesterinkonzentration im Serum.....	70
5.5.2	Herkunft des Cholesterins im Serum .....	71
5.6	Einfluss der Phytosterole im Futter auf die Cholesterin-synthese der Kuh .....	72
5.7	Die biologische Bedeutung einer forcierten Cholesterin-synthese für die Hochleistungskuh .....	74

iv Inhaltsverzeichnis

6	Zusammenfassung.....	77
7	Summary .....	79
8	Literaturverzeichnis.....	81
9	Anhang.....	94

**Verwendete Abkürzungen**

ABTS	2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin)-6-sulfonsäure
ADF	Acid detergent fibre, Säure-Detergenz-Faser
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	Area under the curve, Fläche unter einer Kurve
B2MG	Beta-2-Mikroglobulin
BCS	Body condition score
BHBA	$\beta$ -Hydroxybuttersäure
BSA	bovines Serumalbumin
cDNA	komplementäre DNA
CON	Kontrollgruppe
cRNA	komplementäre RNA
$c_t$	cycle threshold, Schwellenwert
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EIA	Enzym-Immunoassay
FADH <sub>2</sub>	Flavin-Adenin-Dinukleotid, reduzierte Form
FC	Fold change, Expressionsänderung
FDR	False discovery rate
FS	Fettsäuren
GGT	Gamma-Glutamyltransferase
GLDH	Glutamatdehydrogenase
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
HMGCR	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase
HPLC	High-performance liquid chromatography, Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IGF-1	Insulin-like growth factor-1
IgG	Immunglobulin G
logFC	logarithmierter Fold Change
MM	Mismatch probe
mRNA	Messenger RNA, Boten-RNA
MW	Mittelwert
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid, reduzierte Form
NDF	Neutral detergent fibre, Neutral-Detergenz-Faser
NEB	Negative Energiebilanz
NEFA	Non-esterified fatty acids, Nicht veresterte freie Fettsäuren

## vi Abkürzungen

NEL	Netto-Energie Laktation
NUSE	Normalised unscaled standard error
p	Signifikanzwert
PBS	Phosphate buffered saline, Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PG	Propylenglycol
PGD	Versuchsgruppe (TMR +300 g PG + 500 ml PG oral an Tag 10 pp.)
PGF	Versuchsgruppe (TMR + 300 g PG)
PI3	Phosphatidylinositol-3-Phosphat
Pi3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PM	Perfect match probe
pp.	post partum
qRT-PCR	quantitative Echtzeit-(real time) Polymerasekettenreaktion
RLE	relative logarithmische Expression
RNA	Ribonukleinsäure
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SQLE	Squalen-Monooxygenase, Squalen-Epoxidase
SREBP	Sterol response element-binding protein
TAA	totale antioxidative Aktivität
TEAC	Trolox equivalent antioxidative capacity
TM	Trockenmasse
TMR	Totale Mischration
TS	Trockensubstanz
vs.	versus, gegen

# 1 Einleitung

Die Ketose stellt in tiergesundheitlicher und damit auch wirtschaftlicher Hinsicht neben der Gebärdparese und der Pansenazidose eine bedeutende Stoffwechselerkrankung der Milchkuh dar. In einer Untersuchung von HEUWIESER et al. (2010) bestätigten durchschnittlich 26% der befragten deutschen Milchviehhalter das Auftreten von Ketosen im eigenen Bestand. Die Ketose wurde bereits im 19. Jahrhundert in Lehrbüchern der Tierheilkunde beschrieben. Allerdings wusste man zu dieser Zeit noch nicht welche Ursache die Erkrankung hat. SJOLLEMA und VAN DER ZANDE (1923) untersuchten das Blut erkrankter Tiere und fanden einen erniedrigten Glucosespiegel sowie eine hohe Konzentration an Ketonkörpern im Blut auffällig. Daraus resultierte auch die Bezeichnung der Erkrankung als Acetonämie bzw. Ketose (MCINTOSH 1944).

Nachdem ein Glucosemangel als Ursache der Erkrankung vermutet wurde, versuchten unzählige Forscher eine wirksame Therapie zu entwickeln. In den vierziger Jahren wurden vor allem mit Glucoseinfusionen Erfolge erzielt, 1954 gelang jedoch der Beweis, dass sich Propylenglycol auch zur Ketosetherapie eignet (JOHNSON 1954). Seit dieser Zeit untersuchten viele Arbeitsgruppen den Wirkmechanismus des Propylenglycols, welches seit den fünfziger Jahren bis heute als Ketosetherapeutikum Anwendung findet (MIETTINEN 1993, HÜNNINGER und STAUFENBIEL 1999). Alle Untersuchungen zum Metabolismus von PG in der Leber erfolgten bisher durch Blutanalysen mit Nachweis einer Veränderung der Konzentration an bekannten Stoffwechselwerten im Blut (Glucose, Triglyzeride, Ketonkörper). Das Vorhandensein potenzieller Endprodukte des Propylenglycol-Stoffwechsels im Blut ist jedoch kein eindeutiger Nachweis für eine spezifische Regulation des Leberstoffwechsels. Erste Hinweise darauf, dass Propylenglycol zusätzlich zur nutritiven Wirkung auch eine gewisse regulatorische Wirkung in der Leber erzielt, ergaben zwei Studien aus den siebziger Jahren. In diesen Studien beeinflusste die hochdosierte Gabe von Propylenglycol mikrosomale Enzyme in der Rattenleber (DEAN und STOCK 1974, YAMAMOTO und ADACHI 1978).

Um die möglichen Effekte von Propylenglycol in der Leber umfassend nachzuweisen wurden die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit nicht auf einzelne stoffwechselrelevante Gene beschränkt, sondern mit einem Affymetrix GeneChip<sup>R</sup> mit welchem circa 24.000 Gene gleichzeitig auf Expressionsunterschiede untersucht werden können, erfasst. Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob es neben der nutritiven Wirkung des Stoffes Propylenglycol möglicherweise parallel eine direkte Wirkung auf die mRNA-Expression stoffwechselrelevanter Gene in der Leber gibt.

## 2 Literatur

### 2.1 Ketose

#### 2.1.1 Definition der Ketose

Als Ketose bezeichnet man eine krankhafte Anhäufung von Ketonkörpern (Aceton und Acetacetat), sowie dem eng mit den Ketonkörpern assoziierten und im weiteren Zusammenhang ebenfalls als Ketonkörper bezeichneten  $\beta$ -Hydroxybutyrat (BHBA) im Blut (BAIRD 1982). Parallel zur Konzentrationserhöhung im Blut kommt es zur vermehrten Ausscheidung von Ketonkörpern über die Milch, die Ausatemluft und insbesondere über den Harn (SCHULTZ 1971, IWERSEN et al. 2009).

#### 2.1.2 Begriffsbestimmungen

##### **Subklinische Ketose**

Die subklinische Ketose des Rindes ist charakterisiert durch erhöhte Konzentrationen von Ketonkörpern im Blut ohne das Auftreten klinischer Symptome (DUFFIELD 2000, ANDERSSON 1988). Dabei liegen die Ketonkörperkonzentrationen im Blut  $> 1200 \mu\text{mol/l}$  (NIELEN et al. 1994, GEISHAUSER et al. 1998) bzw.  $>1400 \mu\text{mol/l}$  (DUFFIELD et al. 2009, IWERSEN et al. 2009). Im Herdenmaßstab weisen schon Konzentrationen oberhalb von  $700 \mu\text{mol/l}$  auf das Vorkommen von subklinischen Ketosen hin (FÜRLL 2000, FÜRLL 2005). Aus der subklinischen Form kann sich eine klinisch manifeste Ketose entwickeln.

##### **Klinische Ketose**

Die klinische Ketose ist durch erhöhte Ketonkörperkonzentrationen gekennzeichnet. Zusätzlich treten neben den erhöhten Ketonkörperkonzentrationen im Blut auch die in Kap. 2.1.5 näher beschriebenen klinischen Symptome der Ketose auf (FOX 1971, BAIRD 1982, FOSTER 1988).

## **Primäre und sekundäre Ketose**

SCHULTZ (1968) unterscheidet zwischen primärer und sekundärer Ketose, wobei in der ersten Form nur Symptome der Ketose und keine anderen Krankheitssymptome vorliegen. Im Gegensatz dazu wird die sekundäre Ketose ausschließlich durch andere Faktoren oder Erkrankungen ausgelöst, deren Symptome nicht selten im Vordergrund stehen, so dass die sie begleitende Stoffwechsellentgleisung erst nach näherer Untersuchung auffällt.

### **2.1.3 Epidemiologie**

#### **Zeitraum**

Die Ketose ist eine typische Erkrankung von Milchkühen und tritt vorzugsweise im Zeitraum zwischen Tag 4 pp. und Tag 40 pp. auf (IWERSEN et al. 2009). Die ersten drei Wochen nach der Kalbung sind die kritischste Periode für das Auftreten der Erkrankung wobei eine klinisch apparente primäre Ketose praktisch immer zwischen dem zehnten Tag pp. und der achten Woche pp. auftritt (SCHULTZ 1968). Angaben über das zeitliche Auftreten variieren aber in Abhängigkeit davon, mit welcher Methode untersucht wurde. Die meisten Untersucher gaben den Zeitraum ab der ersten bzw. zweiten Woche pp. bis zur sechsten bis achten Woche pp. an (DOHOO und MARTIN 1984, ANDERSSON 1988). Auch FRANCOIS et al. (1997) beobachteten bei 10% bis 30% der Kühe schon in der ersten Woche nach der Geburt eine subklinische Ketose. Die meisten Untersuchungen erfassten jedoch in der Regel klinische Ketosen, welche laut SCHULTZ (1968) naturgemäß etwas später beobachtet werden als subklinische Ketosen.

#### **Häufigkeit**

Bei der Angabe der Häufigkeit muss zwischen der relativ häufig vorkommenden subklinischen Ketose und der selteneren klinischen Ketose unterschieden werden. Kommt die klinische Ketose mit einer geschätzten Inzidenz von 0,5% bis 15% (BAIRD 1982, WHITAKER et al. 2004) bzw. 5% bis 10% (KLEE 1999; MOORE 1997) vor, so liegt die Inzidenz der subklinischen Ketose je nach zugrunde gelegtem Grenzwert zwischen 8,9% bis hin zu 48% (FOX 1971, ANDERSSON 1988, HEUWIESER et al. 2010). DUFFIELD (1998) ermittelte sogar Inzidenzen für subklinische Ketose zwischen 43% und 59% in kanadischen Herden. Insgesamt ist zu beachten dass die Ketose-Inzidenz von Herde zu Herde stark schwankt (DOHOO und MARTIN 1984). In zwei Herden in Michigan wiesen 49% aller Tiere innerhalb der ersten dreißig Tage nach der Geburt mindestens einmal erhöhte Ketonkörperspiegel im Blut auf, die einer subklinischen Ketose entsprachen (EMERY et al. 1964). In gut geführten Herden kann die Inzidenz dagegen deutlich niedriger sein als der Durchschnitt. Ein Beispiel dafür liefern IWERSEN et al. (2009) die für zwei deutsche

## 4 Literatur

Rinderherden mit Milchleistungen von jeweils >10 000 kg/ Laktation lediglich eine Inzidenz von 5,1% subklinische Ketosen nachwiesen. Eine Untersuchung aus Norwegen zeigt stellvertretend für die Situation in Europa einen deutlichen Wandel der Inzidenz für die klinische Ketose in den letzten 40 Jahren an. Lag sie noch in den späten siebziger Jahren des letzten Jahrhunderts bei etwa 14%, so wurde ab Beginn der achtziger Jahre und Zunahme der Milchleistung ein starker Anstieg der Inzidenz verzeichnet der 1985 bei fast 24% gipfelte. Von 1985 an sank die Inzidenz durch verbesserte Fütterungsbedingungen der Hochleistungskühe und Einsatz von Propylenglycol, bis sie sich seit 2003 auf etwa 6% eingependelt hat (OSTERAS et al. 2007).

### 2.1.4 Pathogenese der Ketose

Die Ketose resultiert fast immer aus einer negativen Energiebilanz der Milchkuh. Die einzige Ausnahme stellt die durch eine ketogene Ration (z.B. stark buttersäurehaltige Silage) hervorgerufene alimentäre Ketonämie dar, die aber kaum klinisch manifest in Erscheinung tritt (Kraft und Dürr 2005).

Am häufigsten resultiert die Ketose aus einem unausgeglichene Verhältnis zwischen Futter- und somit Energieaufnahme und der vom Körper und der Milchdrüse tatsächlich benötigten Energie (sog. „negative Energiebilanz“). Die Bestandteile der Rindernahrung werden im Vormagen des Rindes durch Mikroorganismen zu kurzkettigen Fettsäuren (Acetat, Propionat, Butyrat) abgebaut (BERGMAN 1990, ASCHENBACH et al. 2011). Diese dienen dem Rind zum einen als glucoplastische Substanz (Propionat), zum anderen als lipoplastische Substrate (Acetat, Butyrat) (ASCHENBACH et al. 2010). Außerhalb von Zeiten hohen Energiebedarfes dienen Acetat und Butyrat der Energiegewinnung und werden über den Zwischenschritt Acetyl-CoA im Citratzyklus zu ATP, NADH und FADH<sub>2</sub> abgebaut. NADH und FADH<sub>2</sub> werden schließlich in der Atmungskette zusammen mit O<sub>2</sub> ebenfalls zur ATP-Gewinnung umgesetzt (LÖFFLER und PETRIDES 2006). Die glucoplastische Verbindung Propionat wird beim Rind neben Lactat, Glycerol und glucoplastischen Aminosäuren über den Schritt der Oxalacetatbildung zur Gluconeogenese verwendet (ASCHENBACH et al. 2010).

Mit Einsetzen der Laktation ändert sich der Stoffwechsel der Milchkuh rapide. Die bisher zur Energiegewinnung genutzten lipoplastischen Substrate Acetat und Butyrat werden in größerem Umfang von der laktierenden Milchdrüse zur Milchfettsynthese benötigt. Während die Energiegewinnung aus diesen Substraten unzureichend wird, werden aufgrund des progressiven Energiemangels Körperreserven, vorrangig in Form von freien Fettsäuren (NEFA), aus den Fettdepots mobilisiert (ASL et al. 2011). Eine Kompensation der negativen Energiebilanz durch Steigerung der Futteraufnahme ist oft nicht in ausreichendem Maße möglich (BAIRD 1982). Die Fettmobilisation resultiert schließlich in erhöhten NEFA-Konzentrationen im Blut (ITOH et al. 1998, ASL et al. 2011), die in der Leber zumeist zu

Acetyl-CoA oxidiert werden. Ein gewisser Teil wird jedoch direkt in der Leberzelle als Triglyceride gespeichert und ist an der Pathogenese der häufig postpartum im Zusammenhang mit Ketose beobachteten Fettleber der Milchkuh beteiligt (BOBE et al. 2004, GRUMMER 2008). Während viel Acetyl-CoA durch Oxidation der mobilisierten Fettsäuren anfällt, wird gleichzeitig der größte Teil der neusynthetisierten Glucose und damit auch der glukoplastischen Substrate (Propionat, Lactat, Glycerin und glukoplastische Aminosäuren) für die Lactoseproduktion verbraucht (ASCHENBACH et al. 2010). Dabei wird allein rund 20% der Blutglucose zur Lactosesynthese von der laktierenden Milchdrüse beansprucht (GUINARD-FLAMENT et al. 2007). Als eine mögliche Konsequenz daraus gerät das Verhältnis Acetyl-CoA zu Oxalacetat, das normalerweise nahe 1 liegt deutlich aus dem Gleichgewicht. BAIRD (1968) postulierte, dass Acetyl-CoA möglicherweise durch den Mangel an Oxalacetat im Citratzyclus nur sehr schwer zur Energiegewinnung herangezogen werden kann. Das angehäuften Acetyl-CoA ginge somit den Alternativweg in die Ketonkörperproduktion und führt dadurch zu erhöhten Blutkonzentrationen an Acetacetat,  $\beta$ -Hydroxybutyrat (BHBA) und Aceton, was schließlich in den Zustand Ketose mündet (VAN KNEGSEL et al. 2007).

### **2.1.5 Klinische Symptome der Ketose**

Die erste Beschreibung von Symptomen der Ketose wurde laut einem Lehrbuch der Tiermedizin bereits 1849 gemacht, wobei hier vor allem die Symptome der nervösen Form im Vordergrund standen (UDALL 1943, zitiert nach SHAW 1956 S. 402). Ein weiteres Lehrbuch berichtet von diversen Fall-Beispielen vor 1874. Auch hier werden vorrangig die typischen Symptome der nervösen Form der Ketose beschrieben (FLEMING 1879, zitiert nach SHAW 1956 S. 402).

Die klinische Ketose setzt abrupt ein und fällt dem aufmerksamen Tierhalter zuerst durch ein Nachlassen des Appetites auf. Hinzu kommt ein Abfall der Milchleistung sowie häufig auch apathisches Verhalten der Kuh (BAIRD 1982). Bei gründlicher Untersuchung kann eine Hypomobilität des Pansens sowie häufig auch fester Kot bzw. eine Verstopfung festgestellt werden (SCHULTZ 1968, FOX 1971, FÜRLL 2000). Seltener können an Stelle der Apathie auch zunehmende Erregung, Excitationen, bis hin zu Blindheit und Krampfanfällen beobachtet werden (FOX 1971, FOSTER 1988). Die Körpertemperatur bleibt während der Ketose im physiologischen Bereich, kann jedoch bei schweren Fällen auch unter den physiologischen Wert abfallen. Geübte Untersucher erkennen das Vorliegen einer Ketose am typisch fruchtig nach Aceton riechenden Atem der Kuh (FOX 1971). Acetoacetat und BHBA sind Säuren. Ist die Ketonkörperkonzentration im Blut stark erhöht, kann daraus eine metabolische Azidose resultieren (BERGMAN 1971).

### **2.1.6 Veränderungen der Blutwerte**

Durch die Stoffwechsellage während der Ketose kommt es zu typischen Veränderungen der Blutwerte.

#### **Typischerweise veränderte Blutwerte**

Immer zu finden ist die Konzentrationserhöhung der Ketonkörper im Blut. Da Ketonkörper (speziell BHBA) auch aus ketogenen Futtermitteln stammen können und insbesondere beim erwachsenen Rind bis zu einem gewissen Grad stets physiologisch im Blut vorkommen, muss ein Grenzwert zur Diagnose der Ketose festgelegt werden. Hierzu wird in der Regel der  $\beta$ -Hydroxybutyrat-(BHBA) Gehalt in Milch, Harn oder Blut bestimmt. Die Grenzwerte zur Feststellung einer subklinischen Ketose sind allerdings nicht einheitlich und variieren je nach Untersucher und Studie zwischen 630  $\mu\text{mol/l}$  im Herdenmaßstab gemessen (FÜRLL 2005), 1000  $\mu\text{mol/l}$  (KELLY 1977, WHITAKER et al. 1983), und 1400  $\mu\text{mol/l}$  im Blut (DUFFIELD et al. 2009). NIELEN et al. (1994) legten basierend auf vorausgegangenem Daten den Grenzwert auf 1200  $\mu\text{mol/l}$  fest. Dieser Wert findet sich auch bei GEISHAUSER et al. (1998) und DIRKSEN (2006). Ein Grenzwert für die klinische Ketose ist nur schwer festzulegen da es große tierindividuelle Unterschiede gibt, ab welcher Ketonkörper-Konzentration klinische Symptome nachweisbar sind (DUFFIELD et al. 2009). Die klinische Ketose definiert sich vielmehr durch das Auftreten klinischer Erscheinungen. Nicht nur der Grenzwert ist aussagekräftig zur Feststellung einer Ketose sondern auch das Verhältnis der einzelnen Ketonkörper zueinander. Während im physiologischen Zustand vor allem BHBA, welches bereits innerhalb des Pansenepithels aus der kurzkettigen FS Butyrat synthetisiert wird, im Blut vorkommt, steigt bei einer Ketose vor allem der Anteil des in der Leber synthetisierten Acetoacetates, sowie des Decarboxylierungsproduktes Aceton schneller an (HORBER et al. 1980).

Eine weitere, häufige Veränderung bei ketotischen Tieren ist die Erhöhung von NEFA im Blut. Durch den relativen Energiemangel postpartum kommt es zum Freisetzen von Energieträgern in Form von freien Fettsäuren aus den Fettdepots des Körpers welche via Blutweg zur Leber transportiert werden und im Blut in höherer Konzentration nachgewiesen werden können (RADLOFF und SCHULTZ 1967, ITOH et al. 1998).

#### **Seltener veränderte Blutwerte**

Zu den seltener veränderten Blutwerten gehört unter anderem die Glucose-Konzentration im Blut. Da dem Wiederkäuer aufgrund der anatomischen und funktionellen Besonderheiten seines Vormagen-Systems nur sehr wenig Glucose direkt durch Resorption aus dem Darm zur Verfügung steht, ist der Wiederkäuer bestens daran adaptiert Glucose aus Vorläufer-Substanzen selbst zu synthetisieren (DANFAER et al. 1995, ASCHENBACH et al. 2010).

Wie in Kap 2.1.4 näher beschrieben führt der erhöhte Glucosebedarf sowie die nicht adäquate Futteraufnahme postpartum bei einigen, aber nicht allen Tieren trotzdem zu erniedrigten Glucosekonzentrationen (ITOH et al. 1998). Möglicherweise zeigt sich hier die immense Bedeutung der Glukoneogenese zur Aufrechterhaltung der Glucosehomöostase sowie zur Aufrechterhaltung einer hohen Milchleistung postpartum, so dass selbst eine stark negative Energiebilanz postpartum nur sporadisch zu nachweisbar erniedrigten Glucosekonzentrationen führt. Vermutlich führt erst eine längere Krankheitsdauer mit Inanition zu einem nachweisbaren Absinken der Glucose-Konzentration (BAIRD et al. 1972). Ein erniedrigter Glucosespiegel ist ein Hinweis auf Ketose, wobei betont werden muss, dass eine Glucose-Konzentration im Normalbereich das Vorliegen einer Ketose nicht ausschließt (BAIRD 1982). Durch die Beeinflussung des Glucosestoffwechsels kommt es in Folge dessen zum Teil auch zu einer Beeinflussung der Insulin-Konzentration (BAIRD 1982). Bei nachweislich niedrigen Glucosekonzentrationen können auch niedrige Insulinkonzentrationen gemessen werden (BAIRD 1982) wobei bedacht werden muss, dass die Konzentration der kurzkettigen Fettsäuren aus dem Pansen beim Rind den Hauptreiz der Insulinsekretion darstellt (HORINO et al. 1968, HARMON 1992).

Desweiteren werden selten bei schweren Ketosen, die mit hochgradiger Leberverfettung einhergehen, Veränderungen bei den Leberenzymen im Plasma beobachtet. Zu den Leberenzymen zählen insbesondere GOT, GPT, GGT und GLDH. Die Konzentration dieser Enzyme steigt bei einer Leberschädigung an, wobei die Erhöhung nicht spezifisch für die Ketose ist, sondern eher unspezifisch eine Leberschädigung anzeigt (KRAFT und Dürr 2005, DIRKSEN et al. 2006).

### **2.1.7 Veränderungen der Genexpression während der Ketose**

In einer Untersuchung von LOOR et al. (2007) wurde zum ersten Mal die Genexpression im Lebergewebe von Kühen bei fütterungsinduzierter Ketose bestimmt. Dabei fanden sie 17 Netzwerke von Genen mit veränderten Expressionswerten. Bei Ketose wurde vor allem eine Hochregulierung von Genen der Fettsäure-Oxidation und des Fettsäure-Transports nachgewiesen. Andere Gene im Lipidstoffwechsel waren dagegen deutlich herabreguliert. Hierunter fanden sich vorzugsweise Gene welche durch das Transcriptionsfaktor „sterol response element binding protein 2“ (SREBP2) reguliert werden. Auch das Gen für SREBP2 war deutlich herabreguliert. Zu diesen durch SREBP2 herabregulierten Genen gehören unter anderem auch die Schlüsselgene der Cholesterin-Synthese. Im Allgemeinen war auffällig, dass der größte Teil der differentiell exprimierten Gene aus dem Lipidstoffwechsel stammte, wohingegen aus dem Glucosestoffwechsel, der bei der Ketose ebenfalls stark beansprucht wird, lediglich zwei Gene differentiell reguliert waren.

## 8 Literatur

Neben der Untersuchung von LOOR et al. (2007) existiert nur eine weitere Genexpressionsuntersuchung, in der jedoch keine ketotischen Rinder untersucht wurden, sondern die Tiere in Gruppen in Abhängigkeit ihrer BHBA-Konzentration zum Zeitpunkt 4 Wochen postpartum eingeteilt wurden (VAN DORLAND et al. 2009). Kühe mit einer BHBA-Konzentration von  $>750 \mu\text{mol/l}$  wurden dabei der Gruppe mit erhöhten BHBA-Konzentrationen zugeordnet. In dieser Untersuchung konnten in der Leber jedoch keine größeren Expressionsänderungen von Genen zwischen den beiden untersuchten Gruppen nachgewiesen werden. Eine mögliche Ursache könnte in dem relativ niedrig gewählten Grenzwert für BHBA zur Gruppeneinteilung liegen, der sich relativ weit entfernt von den Grenzwerten für eine subklinische Ketose befindet (siehe Kap. 2.1.2). Die Genexpressionsänderungen, die in dieser Studie untersucht wurden, sind damit ggf. nur sehr bedingt repräsentativ für Veränderungen der Genexpression bei Ketose. Aus diesem Grund verwundert es nicht, dass die Ergebnisse kaum mit den von LOOR et al. (2007) erzielten Ergebnissen übereinstimmen.

### 2.1.8 Risikofaktoren für Ketose

#### Hohe Milchleistung

An primärer Ketose erkranken nahezu ausschließlich laktierende Hochleistungsrinder (EMERY und WILLIAMS 1964, RADLOFF und SCHULTZ 1967) und diese Erkrankung wurde bisher de facto nur bei weiblichen Rindern beschrieben wurde. Kühe mit niedriger Milchleistung verbrauchen weniger Energie zur Milchproduktion und kommen im Normalfall nicht in eine derart negative Energiebilanz. An sekundärer Ketose können im Gegensatz dazu prinzipiell Tiere aller Rassen, Leistungen sowie beider Geschlechter erkranken.

HELLERICH (2008) konnte für Herden mit einer Milchleistung von durchschnittlich über 8500 kg pro Jahr eine signifikant höhere Inzidenz für Ketose beobachten als bei Herden mit einer durchschnittlichen jährlichen Milchleistung von unter 6500 kg. HARDENG und EDGE (2001) fanden in einer norwegischen Studie ebenfalls einen hoch signifikanten Zusammenhang zwischen aktueller Milchleistung und der Ketosehäufigkeit. FLEISCHER et al. (2001) wies in einer Studie mit 10 Herden und insgesamt 1074 Holstein-Friesian-Kühen einen signifikanten Zusammenhang zwischen Milchleistung in der vorrausgegangenen Laktation und dem Ketoserisiko in der aktuellen Laktation nach. Dieser Zusammenhang wurde bereits von SIMIANER et al. (1991) sowie GRÖHN et al. (1989) beschrieben. Im Gegensatz dazu konnten GRÖHN et al. (1995) keinen signifikanten Zusammenhang zwischen vorrausgegangener Milchleistung und einem erhöhten Ketoserisiko finden.

## **Management und Fütterung**

In gut geführten Herden tritt eine Ketose verhältnismäßig selten auf. Dazu gehört das Schaffen einer stressarmen Umgebung und gut belüfteter Ställe. Silage und andere Futtermittel müssen in ausreichender Menge und guter Qualität verfüttert werden. Abrupte Änderungen der Rationszusammensetzung sollten unterlassen werden (HELLERICH 2008, SPIEKERS et al. 2009). DANN et al. (2005) konnten ebenfalls zeigen, dass durch restriktive Fütterung ante partum (mit 80% der berechneten NEL) eine Senkung des Ketose-Risikos erreicht werden kann.

In ökologisch geführten Herden wird von einer geringeren Inzidenz der Ketose berichtet. In einer Studie von HARDENG und EDGE (2001) an 31 ökologisch geführten und 93 konventionell geführten Herden in Norwegen wiesen die konventionell geführten Herden eine höhere Erkrankungshäufigkeit auf. HARDENG und EDGE (2001) sehen die Ursache hierfür in der niedrigeren durchschnittlichen Milchleistung der ökologisch geführten Herden sowie dem entsprechend geringerem Bedarf an Kraftfutter zur Energiedeckung. Auch die Wahl der Futtermittel scheint einen Einfluss auf das Ketoserisiko zu haben. Besonders eine Fütterung mit höheren Rohfaseranteilen wie z.B. Heufütterung war mit einem geringeren Auftreten an Ketosen verbunden (NOCEK et al. 1983). Möglicherweise ist auch die von HARDENG und EDGE (2001) beobachtete niedrigere Ketoseinzidenz in den Sommermonaten durch die vermehrte Weidehaltung und somit größere Rohfaseraufnahme bedingt. HELLERICH (2008) konnte ebenfalls eine signifikant niedrigere Ketoseinzidenz für Herden mit Weidegrasfütterung bzw. Weidegang im Sommer beobachten.

## **Rasse und Alter**

Es scheint bei der Ketose ein rassespezifisches Erkrankungsrisiko zu geben. In einer Studie an 131 Tieren mit erhöhten Ketonkörper-Konzentrationen im Blut waren zwar Kühe aller Rassen betroffen, allerdings zeigte sich innerhalb dieser Studie, dass die Rassen Holstein-Frisian und Guernsey die höchste, und Ayrshire die niedrigste Inzidenz aufwiesen (FINCHER 1936). Eine Untersuchung schwedischer Herden zeigte für die Rasse „Swedish-Frisian“ ein höheres Ketoserisiko im Vergleich zu „Swedish Red and White cows“ (ANDERSSON und EMANUELSON 1985). Ein höheres Ketoserisiko für Kühe der Rasse Finnische Schwarz-Weiße im Vergleich zu Kühen der Rasse Finnisch Ayrshire fanden SCHNIER et al. (2004) in neueren Untersuchungen. Weitere Hinweise auf eine höhere Inzidenz der Ketose bei Holstein-Kühen finden sich in den Untersuchungen von ERB und MARTIN (1978). Im Gegensatz zu diesen Untersuchungen fand MACKAY (1943) bei den Rassen Shorthorns, Friesians und Ayrshires die gleiche Erkrankungshäufigkeit. Neben den rassebedingten Unterschieden in der Prävalenz konnte beobachtet werden, dass Ketose am häufigsten bei Kühen zwischen dem fünften und achten Lebensjahr auftritt. Sie ist jedoch nicht auf diese

## 10 Literatur

Alterspanne begrenzt. Es können auch Erstkalbinnen an Ketose erkranken, wenn auch wesentlich seltener (FOX 1971). Insgesamt haben multipare Kühe ein höheres Risiko an Ketose zu erkranken als primipare Kühe (ANDERSSON und EMANUELSON 1985, GILLUND et al. 2001, HARDENG und EDGE 2001, FLEISCHER et al. 2001). Inwieweit sich die Alters- und Rassedispositionen evtl. auch in alters- bzw. rasseabhängigen Unterschieden in der Milchleistung begründen, wurde bisher nicht systematisch untersucht.

### **Leberverfettung**

Die Leberverfettung wird oft im Zusammenhang mit der Erkrankung Ketose untersucht. Es gibt unterschiedliche Betrachtungsweisen bezüglich der Frage, ob die Leberverfettung oder die Ketose den primären Insult darstellt. Zum einen stellt die Leberverfettung einen Risikofaktor für das Auftreten einer Ketose dar, indem die Stoffwechsellistung der Leber insbesondere bei Triglyceridkonzentrationen im Lebergewebe  $> 10\%$  nachweislich eingeschränkt ist (BOBE et al. 2004). Andererseits führt die Ketose zu einer mangelnden Verstoffwechsellung der in der Leber angeschwemmten NEFA und somit zu einer erhöhten Fettakkumulation in der Leber (BOBE et al. 2004, GRUMMER 2008). Das erhöhte Risiko einer Ketose in Abhängigkeit von der Leberverfettung bestätigten mehrere Untersuchungen (GRÖHN et al. 1987, VEENHUIZEN et al. 1991). So fanden GRÖHN et al. (1987) in Finnland, dass bei Kühen mit Leberverfettung die Ketoseinzidenz ca. 30% beträgt, während sie bei Kühen ohne Leberverfettung lediglich bei 10% liegt.

### **Body Condition Score**

Hohe körpereigene Fettreserven stellen einen bedeutenden Risikofaktor für eine erhöhte postpartale Lipomobilisation und damit auch für die Ketose dar. Eine häufig benutzte Methode zum Einschätzen der Fettreserven bei Rindern ist der Body condition score (BCS). Hierbei handelt es sich um eine Fünf-Punkte-Skala von eins bis fünf, wobei eins für abgemagert und fünf für hochgradig adipös steht (EDMONSON et al. 1989). Der empfohlene Wert für Kühe vor der Kalbung liegt zwischen 2,5 und 3,5 Punkten. Höhere Werte gehen mit einem größeren Risiko für peripartalen Erkrankungen einschließlich Ketose einher (FRONK et al. 1980, MARKUSFELD et al. 1997, DUFFIELD et al. 1998). In einer großen Studie an 732 Kühen der Rasse Norwegisches Rind konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen hohem BCS und Ketose nachgewiesen werden (GILLUND et al. 2001).

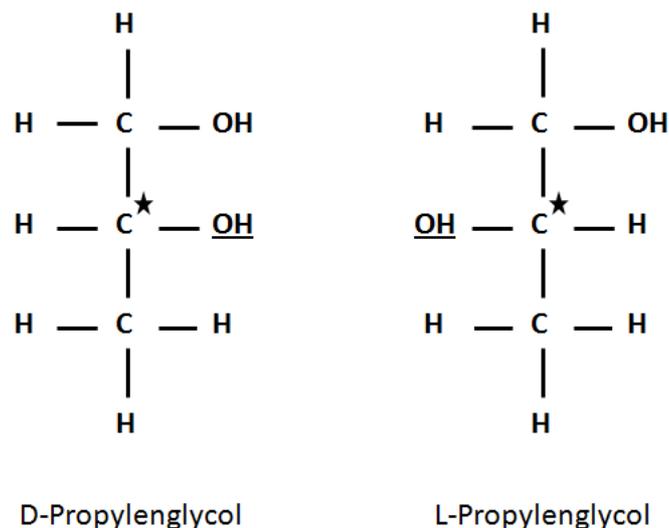
Das Risiko an Ketose zu erkranken, war bei einer Kuh mit einem BCS > 3,5 etwa 2,5-fach erhöht gegenüber einer Kuh mit einem BCS < 3,25. Anderen Untersuchern war es jedoch nicht gelungen einen Zusammenhang zwischen BCS und Ketose nachzuweisen (WALTNER et al. 1993, RUEGG und MILTON 1995, HEUER et al. 1999), was jedoch möglicherweise durch einen sehr geringen Anteil an Kühen mit einem BCS > 4 an der Gesamtpopulation in diesen Studien bedingt war.

## 2.2 Propylenglycol

### 2.2.1 Allgemeine Eigenschaften

Propylenglycol (PG) ist der Trivialname für 1,2-Propandiol. Weitere Synonyme sind 1,2-Propylenglycol, Monopropylenglycol und 1,2-Dihydroxypropan. Die Summenformel lautet  $C_3H_8O_2$ . Propylenglycol ist eine chirale Verbindung, genauer ein Diastereomer. Das Stereozentrum welches in der Abbildung 1 mit einem \* gekennzeichnet ist, befindet sich am zweiten C-Atom. Propylenglycol kommt in zwei Isoformen, dem D- und dem L-Propylenglycol vor (POWERS et al. 1994). In der Rinderfütterung wird immer ein Racemat aus beiden Isomeren eingesetzt.

Propylenglycol ist klar, farblos und bei Raumtemperatur flüssig. Die Dichte beträgt  $1,04 \text{ g/cm}^3$ . Es ist mit Wasser und Ethanol mischbar. Die Schmelztemperatur liegt bei  $-60^\circ\text{C}$ . (SEIDENFELD und HANZLIK 1932, LESSMANN et al. 2005)



**Abbildung 1.** Strukturformeln der Isoformen des Propylenglycol. Der Stern (\*) kennzeichnet das Stereozentrum.

### **2.2.2 Allgemeine Verwendungszwecke**

Neben Ethylenglycol wurde Propylenglycol 1859 durch WURTZ (1859) zum ersten Mal beschrieben. Die Erfolgsgeschichte des PG begann in den dreißiger Jahren des letzten Jahrhunderts. Man suchte nach Alternativen, da die toxischen Nebenwirkungen des bisher vorrangig als Lösungsvermittler in Arzneimitteln eingesetzten Ethylenglycols nicht mehr tolerierbar waren (SEIDENFELD und HANZLIK 1932). RUDDICK (1972) bestätigte Propylenglycol eine niedrige akute und chronische Toxizität (siehe auch Kap. 2.2.3); daraufhin wurde Propylenglycol vielfältig als Lösungsvermittler eingesetzt, vor allem in Arzneimitteln (KELNER, 1985). Allerdings existieren auch Studien welche die fehlende biologische Wirksamkeit des PG in Frage stellen. So wurde in einem Versuch an Ratten eine Beeinflussung der mikrosomalen Enzyme der Leber durch PG-Fütterung deutlich nachgewiesen (DEAN und STOCK 1974, YAMAMOTO und ADACHI 1978). Dies tat der Popularität des Propylenglycoles jedoch keinen Abbruch, so dass PG bis heute in einer Vielzahl von Anwendungen eingesetzt wird. Die aktuellen Einsatzgebiete von PG umfassen vorrangig den Einsatz als Futteradditiv zur Ketosebehandlung und Prophylaxe beim Rind (siehe Kap.2.3), sowie den Einsatz als Lösungsmittel, vor allem für intravenös zu verabreichende Substanzen wie Anästhetika (ERHARDT et al. 2004). Zusätzlich zur Löslichkeitsvermittlung verbessert PG auch die Resorption der enthaltenen Wirkstoffe, so dass es oft in Cremes und Salben enthalten ist (LESSMANN et al. 2005). Im Lebensmittelsektor ist Propylenglycol als Trägerstoff und Feuchthaltemittel (in der EU unter der Nummer E1520) zugelassen. Die fungistatische sowie teilweise bakteriostatische Wirkung macht zudem zusätzliche Konservierungsmittel weitgehend unnötig (SELENKA 1963, BÄURLE et al. 1985). Aufgrund seiner niedrigen Schmelztemperatur (-60 °C) findet es großflächig Einsatz als Frostschutzmittel und hat zum größten Teil das giftigere Ethylenglycol abgelöst (BROOKS und WALLACE 2002).

### **2.2.3 Toxizität**

Die erste Untersuchung zur Toxizität von Propylenglycol fand bereits 1932 mit der Intention statt, einen Ersatz für das toxische Ethylenglycol als Lösungsmittel in Syphilismedikamenten zu finden (SEIDENFELD und HANZLIK 1932). Seitdem wurde die Toxizität von PG in diversen Studien vorrangig an Labornagern untersucht. Trotz des regen Einsatzes von PG in der Rinderfütterung wurden nur wenige Toxizitätsstudien beim Rind durchgeführt. Die toxische Dosis lag für das Rind bei 2,6 g/kg Körpergewicht. Das entspricht 1,3 kg pro 500 kg Kuh (PINTCHUK P.A. et al. 1993) Eine Studie zur Untersuchung von toxischen Wirkungen des verabreichten PGs bzw. bisher unbekannter Metabolite konnte eine pulmonale Vasokonstriktion als wahrscheinliche Ursache der unerwünschten Wirkungen wie Schläfrigkeit und Hyperventilation nachweisen (BERTRAM et al. 2009). Weitere beobachtete

Nebenwirkungen einer PG-Applikation waren Ataxie, gesteigerter Speichelfluss und Teilnahmslosigkeit (NIELSEN und INGVARTSEN 2004). In den Toxizitätsstudien an Nagetieren wies PG höchstens ein Drittel der Toxizität von Ethylenglycol auf und verdrängte dieses daraufhin weitestgehend (DAVIS und JENNER 1959). Die für die Ratte ermittelte halbletale Dosis entspräche auf das Rind hochgerechnet einer Menge von 3,5 l/ 500kg Kuh. Auch bei Pferd, Hund, Katze sowie beim Menschen wurden toxische Wirkungen durch PG beobachtet (DORMAN und HASCHEK 1991, MOON 1994, MCCLANAHAN et al. 1998), wobei die toxischen Wirkungen beim Menschen in der Regel nach langandauernder Infusionstherapie mit PG-haltigen Medikamenten auftraten (HUFF 1961, TRANQUADA 1964, BROOKS und WALLACE 2002, JORENS et al. 2004, BOUCHARD et al. 2005, ZAR et al. 2007).

### **2.3 Verwendung von PG zur Ketosetherapie und Prophylaxe**

Der erste Einsatz von Propylenglycol am Rind erfolgte 1954 durch JOHNSON (1954). Nachdem in den dreißiger Jahren des letzten Jahrhunderts an Ratten die günstigen toxikologischen Eigenschaften des Propylenglycols sowie eine Beeinflussung des Glycogengehaltes in der Leber beobachtet wurden (HANZLIK et al. 1939), konnte JOHNSON (1954) nach oraler Verabreichung von Propylenglycol erhöhte Glucosekonzentrationen und eine positive Beeinflussung des Krankheitsverlaufes bei der bovinen Ketose beobachten. Zu diesem Zeitpunkt wurden noch verschiedene Ansätze der Ketosetherapie verfolgt, wobei schwerpunktmäßig vor allem glukoplastische Verbindungen zum Einsatz kamen, wie z.B. Glycerin oder Propionat. Nachdem neben JOHNSON (1954) auch MAPLESDEN (1954) die positiven Wirkungen von Propylenglycol bei der Ketosetherapie nachwies, gelangte Propylenglycol in den Fokus weiterer Untersuchungen. In den folgenden Jahren belegten EMERY et al. (1964) die Eignung von Propylenglycol zur Behandlung der bovinen Ketose. Die Wirksamkeit von Propylenglycol zur Therapie und auch zur Prävention der Ketose wurde in den folgenden Jahrzehnten in weiteren Studien bestätigt (BAIRD 1982, STUDER et al. 1993, GRUMMER et al. 1994). Dabei erzielt PG sowohl Wirkungen an Tieren in der Spätlaktation bzw. bei nichtlaktierenden Tieren die experimentell in Ketose versetzt wurden (GRUMMER et al. 1994) wie auch unmittelbar postpartum bei Tieren mit stark negativer Energiebilanz (CASTANEDA-GUTIERREZ et al. 2009, HOEDEMAKER et al. 2004, NIELSEN und INGVARTSEN 2004). Einzelne Studien konnten jedoch keine signifikanten Wirkungen beobachten (COZZI et al. 1996, CHRISTENSEN et al. 1997). Einzelheiten zur Wirkung von Propylenglycol werden in den folgenden Kapiteln besprochen.

## 2.4 Wirkmechanismus des Propylenglycols beim Rind

Die erste im Zusammenhang mit Propylenglycolfütterung beim Rind beobachtete Wirkung war 1954 neben niedrigeren Ketonkörper-Konzentrationen eine Erhöhung der Glucosekonzentration im Blut der behandelten Tiere (JOHNSON 1954). Damit begann die Popularität des Propylenglycols als glucoplastische Substanz in der Behandlung und Prophylaxe der bovinen Ketose. Genauere Untersuchungen zur Wirkweise von Propylenglycol erfolgten 1964 durch EMERY et al. (1964). Diese Autoren vermuteten die glucoplastische Wirkung des Propylenglycols vorrangig in der Erhöhung des prozentualen Anteiles von Propionat im Vormagen. Propionat ist das wichtigste Substrat für die Glukoneogenese beim Rind (DANFAER et al. 1995, ASCHENBACH et al. 2010). Eine Erhöhung des prozentualen Anteiles von Propionat an den kurzkettigen Fettsäuren im Pansen konnte nach PG-Fütterung auch von anderen Untersuchern beobachtet werden (CZERKAWSKI und BRECKENRIDGE 1972, CLAPPERTON und CZERKAWSKI 1972, COZZI et al. 1996, CHUNG et al. 2009). FISHER et al. (1973) kamen zu dem Ergebnis, dass die Erhöhung des Anteiles an Propionat eher durch eine Verminderung des Anteiles an Butyrat im Vormagen bedingt wird. Butyrat kann in der Pansenwand zu  $\beta$ -Hydroxybutyrat umgewandelt werden, bei welchem es sich um einen Ketonkörper handelt. Diese verringerte  $\beta$ -Hydroxybutyrat-Bildung ist eine der möglichen Erklärungen des antiketotischen Effektes von Propylenglycol (FISHER et al. 1973). Eine davon unabhängige Wirkweise des PG postuliert jedoch KRISTENSEN et al. (2002) nachdem er nachweisen konnte, dass die Hauptwirkung des PG unabhängig von einer Steigerung der Propionatkonzentration erfolgt.

Oral verabreichtes Propylenglycol wird im Pansen durch die Mikroorganismen nicht nur zu Propionat umgewandelt sondern auch zu Propanol (KRISTENSEN und RAUN 2007). Das auf diesem Weg entstehende Propanol wird zum größten Teil resorbiert und in der Leber abgebaut. Nicht bloß der Metabolit Propanol sondern auch Propylenglycol selbst kann aus dem Pansen unverändert resorbiert werden (EMERY et al. 1967, KRISTENSEN et al. 2002). Das ins Blut resorbierte Propylenglycol kann theoretisch in der Leber zu Lactat verstoffwechselt werden (GUPTA und ROBINSON 1960, HUFF 1961), welches wiederum zur Glukoneogenese genutzt werden kann (EMERY et al. 1967, RUDDICK 1972). Aus der häufigen Beobachtung von Laktazidosen beim Menschen nach Propylenglycol-Überdosierungen lässt sich schlussfolgern, dass dieser Weg tatsächlich beschritten wird (JORENS et al. 2004, ZAR et al. 2007). Durch den Nachweis der Resorption von Propylenglycol sowie seines Metaboliten Propanol ins Blut muss neben der rein nutritiven Wirkung des Propylenglycols als glukoplastische Substanz auch die Möglichkeit einer regulatorischen Beeinflussung einzelner Stoffwechselwege in Betracht gezogen werden. Letztere Vermutung wird gestützt durch die Beobachtung, dass Propylenglycol in

Vergleichsuntersuchungen anderen glucoplastisch wirkenden Substanzen wie z.B. Glycerol in seiner antiketotischen Wirkung überlegen war (SAUER et al. 1973, FISHER et al. 1973).

Bis heute folgten viele Studien zur Wirksamkeit von Propylenglycol. Die Schlussfolgerungen dieser Untersuchungen erfolgten ausnahmslos durch Auswertung von Blutparametern nach der Fütterung. Bei der Auswertung dieser Studien fällt auf, dass zum Teil auch widersprüchliche Ergebnisse erzielt wurden. Neben Studien in denen eine Steigerung der Glucosekonzentration im Blut durch Propylenglycol nachgewiesen werden konnte (GRUMMER et al. 1994, MIYOSHI et al. 2001) konnten andere Untersuchungen dies nicht bestätigen (COZZI et al. 1996, HIDALGO et al. 2004, MOALLEM et al. 2007a). Auch die in vielen Untersuchungen nachgewiesene Senkung der Ketonkörperkonzentration im Blut durch Propylenglycol scheint abhängig von der aktuellen Stoffwechselsituation zu sein (GRUMMER et al. 1994, NIELSEN und INGVARSEN 2004). Neben diesen am häufigsten im Zusammenhang mit PG-Fütterung beeinflussten Blutmetaboliten (Glucose, Ketonkörper) existiert noch eine Vielzahl an sporadisch untersuchten und beeinflussten Serumwerten. Im Kapitel 2.5 erfolgt eine ausführliche Aufstellung zu den in der vorliegenden Studie näher betrachteten und potenziell durch Propylenglycol beeinflussten Stoffwechselwegen.

## **2.5 Potenzielle, durch PG-Fütterung beeinflusste Stoffwechselwege**

### **2.5.1 Glucosestoffwechsel**

Die Beeinflussung des Glucosestoffwechsels durch Propylenglycol ist die erste postulierte Wirkung von Propylenglycol am Rind (JOHNSON 1954, MAPLESDEN 1954). Seit dieser ersten Studie konnten wiederholt höhere Glucosekonzentrationen im Blut nach Propylenglycolgabe beobachtet werden. Allerdings ist die Erhöhung der Glucosekonzentration kein konstanter Effekt der Propylenglycol-Fütterung. Es scheint vom Zeitpunkt der Fütterung (präpartum vs. postpartum) sowie von der Verabreichungsmethode und der Menge des eingesetzten PG abzuhängen, ob eine Erhöhung der Glucosekonzentration erreicht wird. Am häufigsten ist eine Erhöhung der Glucosekonzentration im Blut nachweisbar bei Fütterung von PG unmittelbar postpartum (MIYOSHI et al. 2001, PICKETT et al. 2003). Beim Vergleich verschiedener Verabreichungsarten erreichte die Verabreichungsmethode als oraler Drench in früheren Studien am häufigsten den gewünschten Effekt der Glucosekonzentrationserhöhung (STUDER et al. 1993, GRUMMER et al. 1994, MIYOSHI et al. 2001, PICKETT et al. 2003, JUCHEM et al. 2004). Bei der Menge des einzusetzenden PG ist keine eindeutige Aussage zu treffen. Obwohl eingesetzte Mengen um die 500 g PG je Kuh und Tag häufiger zu höheren Glucosekonzentrationen führten als geringere Mengen (STUDER et al. 1993,

MIYOSHI et al. 2001, PICKETT et al. 2003), existieren auch Studien, in denen bereits rund 300 g PG pro Tier und Tag zu einer deutlichen Konzentrationserhöhung der Blutglucose führten, welche sich auch nach Steigerung der PG-Dosis nicht sonderlich steigern ließ (GRUMMER et al. 1994, JUCHEM et al. 2004). Im Gegensatz dazu konnte in weiteren Studien nach Fütterung von 200 g bzw. 400 g PG noch keinen Effekt auf die Glucosekonzentration nachgewiesen werden (COZZI et al. 1996, CHUNG et al. 2009).

Es kommen verschiedene mögliche Mechanismen in Frage, über die PG die Glucosekonzentration erhöht. Ein möglicher Mechanismus ist die bessere Bereitstellung von glukoplastischen Substraten. Dazu zählt die Erhöhung des prozentualen Anteiles an Propionat im Vormagen (COZZI et al. 1996, KRISTENSEN und RAUN 2007, TRABUE et al. 2007), was zu einer besseren Bereitstellung dieses glukoplastischen Substrates und somit zur gesteigerten Glukoneogenese führt (DANFAER et al. 1995, ASCHENBACH et al. 2010). Weiterhin entsteht durch den Abbau des unverändert aus dem Vormagen resorbierten Propylenglycols Lactat, welches ebenfalls in die Glukoneogenese eingehen und zur Erhöhung der Blutglucose führen kann (DANFAER et al. 1995, ASCHENBACH et al. 2010). Eine regulatorische Wirkung des PG auf die Expression von Genen für Enzyme der Glukoneogenese kann ebenfalls nicht ausgeschlossen werden. Bisher existieren nur wenige Untersuchungen zur Expressionsänderung von Genen in der Leber während des peripartalen Zeitraums bzw. einer Ketose. Im Zeitraum postpartum kommt es nachweislich durch den gesteigerten Glucosebedarf zu einer Expressionserhöhung der Gene für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase sowie der Pyruvatkinase (GREENFIELD et al. 2000, GRABER et al. 2010). In einer Untersuchung durch LOOR et al. (2007) konnte bei ketosekranken Tieren eine gesteigerte Genexpression des Fruktose-1,6-Bisphosphatase-Gens sowie im Gegensatz dazu eine stark verminderte Expression des Gens der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase festgestellt werden. Da es durch die Ketose also nachweislich zu Expressionsänderungen von Genen der Glukoneogenese kommt, ist eine Beeinflussung dieser Erkrankung durch eine PG-bedingte Expressionsänderung nicht ausgeschlossen. Eine Steigerung der Expression von Genen der Glukoneogenese könnte zu einer Verbesserung der Glucoseversorgung der Milchkuh beitragen und eine Erklärung für die von diversen Untersuchern beobachtete Erhöhung der Blutglucose-Konzentration liefern. Die bisher einzige Genexpressionsuntersuchung im Zusammenhang mit der Fütterung von PG untersuchte lediglich die Genexpression der Pyruvatkinase sowie der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase und konnte keine Beeinflussung dieser Enzyme der Glukoneogenese nachweisen (CASTAÑEDA-GUTIÉRREZ et al. 2009). Das schließt eine regulatorische Wirkung von PG auf diese Enzyme der Glukoneogenese jedoch nicht grundsätzlich aus, denn es konnte in dieser Studie auch keine Erhöhung der Glucosekonzentration nachgewiesen werden. Eine mögliche Erklärung könnte das

Studiendesign liefern, da sich die Wirkung von PG im antepartalen Zeitraum von der postpartalen Wirkung unterscheidet. Zu möglichen Expressionsänderungen weiterer Enzyme des Glucosestoffwechsels, z.B. des Propionatstoffwechsels, durch PG existieren bisher keine Untersuchungen. Eine Beeinflussung der Enzyme des Propionatstoffwechsels durch PG kann allerdings ebenfalls nicht ausgeschlossen werden.

### **2.5.2 Ketonkörperstoffwechsel**

Die Senkung der Konzentration an Ketonkörpern im Blut nach Propylenglycolfütterung ist eine häufig beobachtete Reaktion bei Hochleistungskühen und auch das Ziel des prophylaktischen und therapeutischen Einsatzes. An der Absenkung der Konzentration der Ketonkörper im Blut wird der Erfolg der Ketotherapie mit Propylenglycol gemessen (EMERY et al. 1964). Die Absenkung der Ketonkörperkonzentration kann theoretisch auf verschiedenen Mechanismen beruhen. Als Hauptmechanismus wird die allgemeine Verbesserung der Energiebilanz postpartum durch verbesserte Bereitstellung von glucoplastischen Substraten (z.B. Propionat) angesehen (siehe Kap. 2.5.1). Durch die positivere Energiebilanz steht ausreichend Oxalacetat zur Verfügung, um in der Leber anfallendes Acetyl-CoA aus der  $\beta$ -Oxidation der Energiegewinnung anstatt der Ketonkörpersynthese zuzuführen (siehe Kap. 2.1.4). Die senkende Wirkung auf die Ketonkörper-Konzentration wurde sowohl im präpartalen wie auch im postpartalen Zeitraum beobachtet (SAUER et al. 1973, STUDER et al. 1993, GRUMMER et al. 1994, HOEDEMAKER et al. 2004). Dabei handelt es sich um eine sinnvolle Regulation des Körpers, da lediglich bei pathologisch erhöhten Ketonkörper-Konzentrationen (somit bei Vorliegen einer Ketose) eine Absenkung der Ketonkörper-Konzentration im Blut durch PG erwünscht ist. In physiologischen Konzentrationen dienen Ketonkörper als wichtiges energielieferndes Substrat im Stoffwechsel des Rindes (HEITMANN et al. 1987, ENJALBERT et al. 2001). Neben der verminderten Ketonkörpersynthese durch eine bessere Energieversorgung kann möglicherweise auch eine durch PG bedingte Genexpressionsänderung ketonkörpersynthetisierender Enzyme für die verminderten Ketonkörperkonzentrationen verantwortlich sein. Eine Studie zur Expressionsänderung von bedeutenden Genen des Leberstoffwechsels im peripartalen Zeitraum konnte allerdings trotz deutlich erhöhter Ketonkörperkonzentrationen postpartum keine Beeinflussung der mRNA-Konzentration für die  $\beta$ -Hydroxybutyrat-Dehydrogenase nachweisen (GRABER et al. 2010). Dieses Enzym katalysiert die Umwandlung von Acetoacetat zum Ketonkörper  $\beta$ -Hydroxybutyrat (KOUNDAKJIAN und SNOSWELL 1970). Eine weitere Untersuchung an Kühen mit induzierter Ketose konnte im Gegensatz dazu jedoch eine Expressionsteigerung des an der Ketonkörpersynthese beteiligten Enzymes  $\beta$ -Hydroxybutyrat-Dehydrogenase nachweisen (LOOR et al. 2007). Da die Expression dieses Enzymes in der Ketose gesteigert

ist, könnte ein möglicher Angriffspunkt einer regulatorischen PG-Wirkung eine Senkung der Genexpression dieses Enzymes sein. Ein weiterer Ansatzpunkt der PG-Wirkung könnte neben der verminderten Ketonkörper-Synthese eine schnellere Verstoffwechslung der gebildeten Ketonkörper durch die Kuh sein. Dies könnte ebenfalls durch die Erhöhung der Genexpression und/oder Aktivität ketonkörperabbauender Enzyme, ausgelöst durch eine mögliche regulatorische Wirkung von PG erfolgen. Da die Nutzung der Ketonkörper als energielieferndes Substrat jedoch zum größten Teil außerhalb der Leber erfolgt (HEITMANN et al. 1987), kann dieser Mechanismus anhand der publizierten Studien nicht umfassend beurteilt werden. Ob der Effekt von PG auf die Ketonkörperkonzentration tatsächlich lediglich auf einer Verbesserung der Energiebilanz postpartum beruht oder ob PG zusätzlich einen regulatorischen Effekt auf Genebene bewirkt, wurde bisher noch nicht näher untersucht.

### **2.5.3 Fettstoffwechsel**

Der Fettstoffwechsel des Rindes unterliegt im peripartalen Zeitraum einer besonderen Belastung. Durch die negative Energiebilanz kommt es schon physiologisch zu einer Mobilisierung von freien Fettsäuren (NEFA) aus den Fettspeichern des Körpers (EMERY et al. 1992, VERNON 2005). Diese freien Fettsäuren dienen zum einen der Milchfettsynthese im Euter und somit der Aufrechterhaltung der Milchproduktion (VERNON 2005). Zum anderen führt die Fettmobilisierung zu einer Anschwemmung von freien Fettsäuren in der Leber des Rindes. Die Leber hat drei Möglichkeiten der Verwertung von freien Fettsäuren. Im nichtlaktierenden Zustand überwiegt der Abbau via Citratzyclus zur Energiegewinnung. In der Laktation kommt es jedoch aufgrund der Verknappung von Oxalacetat in der Regel zur Ketonkörperbildung aus dem in der  $\beta$ -Oxidation übermäßig anfallenden Acetyl-CoA sowie alternativ zur Speicherung als Triglyceride im Lebergewebe bzw. zur gesteigerten Ausschleusung als Lipoproteine (BOBE et al. 2004, VERNON 2005). Sowohl die Konzentration von freien Fettsäuren und Triglyceriden im Blut, als auch der Leberfettgehalt wurden bereits mehrfach im Zusammenhang mit der Propylenglycolfütterung untersucht worden. Dabei zeigte sich wiederholt die Fähigkeit des Propylenglycols zur Senkung der Konzentration an freien Fettsäuren im Blut (STUDER et al. 1993, GRUMMER et al. 1994, CHRISTENSEN et al. 1997, MIYOSHI et al. 2001, BUTLER et al. 2006) sowie des Triglyceridgehaltes der Leber (STUDER et al. 1993, PICKETT et al. 2003, BUTLER et al. 2006). Ob PG neben dieser Substratwirkung eine regulatorische Wirkung auf die Genexpression von Enzymen des Fettstoffwechsels ausübt, ist bisher nicht näher untersucht. Eine Untersuchung von LOOR et al. (2007) zeigte im Verlauf der experimentell induzierten Ketose eine Expressionsänderung für mehrere Gene der  $\beta$ -Oxidation. Im Gegensatz zur nachgewiesenen Expressionsänderung während der Ketose konnte in einer anderen Studie zur Expressionsänderung des Genes der Carnitin-Palmityltransferase 1 als Bestandteil des Stoffwechselweges  $\beta$ -Oxidation jedoch keine Expressionsänderung nach

PG-Fütterung nachgewiesen werden (CASTAÑEDA-GUTIÉRREZ et al. 2009). Neben Expressionsänderungen von Genen der  $\beta$ -Oxidation konnten LOOR et al. (2007) auch eine verminderte Expression von Schlüsselgenen der Cholesterinsynthese sowie der Fettsäuresynthese bei experimentell induzierter Ketose feststellen. Da PG einer Ketose entgegenwirkt kann eine regulatorische Wirkung auf den Cholesterin- bzw. Fettstoffwechsel nicht ausgeschlossen werden. Einen Hinweis auf die Beeinflussung der Cholesterinsynthese durch PG kann vermutet werden nachdem FORMIGONI et al. (1996) nach Fütterung von PG an laktierenden Milchkühen signifikant höhere Cholesterinkonzentrationen im Blut nachweisen konnten.

#### **2.5.4 Citratzyklus**

Der Citratzyklus ist sowohl an katabolen wie auch an anabolen Stoffwechselwegen beteiligt. Zu einen erfolgt hier die schrittweise Generierung von NADH bzw. FADH<sub>2</sub> welche zur Energiegewinnung in der Atmungskette benötigt werden (LÖFFLER und PETRIDES 2006). Weiterhin werden Teilschritte dieses Stoffwechselzyklus während der Glukoneogenese besprochen. Dabei handelt es sich beim Rind um die Schritte vom Succinyl-CoA, was aus dem Abbau von Propionat entsteht, bis zum Oxalacetat, welches in die Glukoneogenese einmündet (Aschenbach et al. 2010). Aber auch aus der  $\beta$ -Oxidation anfallendes Acetyl-CoA wird über die Schritte vom Oxalacetat zum Citrat der weiteren Verwendung zur Fettsäure- sowie Cholesterin-Synthese zugeführt (BERGSTROM et al. 1982).

Aufgrund der zentralen Stellung im Stoffwechsel und insbesondere im Glucose- und Fettstoffwechsel stellt der Citratzyklus einen möglichen durch PG-Fütterung beeinflussbaren Regler dar. Hinweise auf die expressionelle Regulation des Citratzyklus im postpartalen Zeitraum liefert eine Untersuchung von GRABNER et al. (2010), in der eine gesteigerte mRNA-Expression für das Enzym Citratsynthase nachgewiesen wurde. Dieses Enzym ist besonders an der Umverteilung von Acetyl-CoA aus der gesteigerten  $\beta$ -Oxidation postpartum hin zur Glukoneogenese bzw. Fett- und/oder Cholesterinsynthese beteiligt. Der Citratzyklus kann als ein möglicher Angriffspunkt der Propylenglycolwirkung nicht ausgeschlossen werden.

#### **2.5.5 Insulinabhängige Stoffwechselwege**

Frühere Studien lieferten Hinweise dass die Fütterung von PG an Rinder im peripartalen Zeitraum Einfluss auf die Insulinkonzentration im Blut hat. Dabei konnten verschiedene Untersucher nach PG-Fütterung höhere Konzentrationen an Insulin im Blut nachweisen (GRUMMER et al. 1994, CHRISTENSEN et al. 1997, MIYOSHI et al. 2001).

Das Hormon Insulin wirkt im Körper auf eine Vielzahl von Stoffwechselprozessen regulierend ein (HAYIRLI 2006). Der Schlüsselreiz für die Insulinfreisetzung ist beim Rind

anders als beim Monogastrier weniger eine erhöhte Glucosekonzentration als vielmehr eine erhöhte Konzentrationen an kurzkettigen Fettsäuren, wie sie durch den mikrobiellen Kohlenhydratabbau im Pansen entstehen (HORINO et al. 1968). Die Insulinwirkung erfolgt über die Bindung an den Insulinrezeptor, wodurch eine Signal-Transduktionskaskade ausgelöst wird, über die schließlich die Genexpression verschiedenster stoffwechselrelevanter Gene reguliert wird. Bei Nichtwiederkäuern hemmt Insulin als anaboles Hormon nachweislich die Genexpression der Schlüsselgene der Glukoneogenese (O'BRIEN und GRANNER 1990, O'BRIEN et al. 2001) und beschleunigt hingegen die Expression von Transportproteinen zur Glucoseaufnahme in die Zelle (O'BRIEN et al. 2001). Im Gegensatz dazu konnten DONKIN und ARMENTANO (1995) sowie SMITH et al. (2008) beim ruminierenden Rind jedoch keinen hemmenden Effekt von Insulin auf die Glukoneogenese aus Propionat in der Leber nachweisen. Weiterhin hemmt Insulin die Lipolyse im Fettgewebe durch Herabregulierung wichtiger Schlüsselenzyme und hat ebenfalls einen Einfluss auf den Proteinstoffwechsel (VERNON 2005). Während bisher keine Untersuchungen zu Genexpressionsänderungen insulinabhängiger Gene nach Propylenglycolfütterung durchgeführt wurde, ist zumindest die Expression der Insulinrezeptoren in der Leber des Rindes während der Ketose nachweislich herunterreguliert (LIU et al. 2010).

### **2.5.6 Phosphoinositol-3-Kinase**

Die durch Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K) vermittelte Signalkaskade stellt eine der zentralen Signalkaskaden in der Expressionsregulierung dar (LÖFFLER und PETRIDES 2006, DESVERGNE et al. 2006). Über die Phosphoinositol-3-Kinase erfolgt die Bildung von Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat was wiederum die Phosphoinositid-abhängige Kinase-1 aktiviert und über die Aktivierung der Proteinkinase B die Genexpression von Enzymen des Glucosestoffwechsels, der Proliferation und Proteinsynthese reguliert. Die PI3K wird auch im Rahmen der Insulinwirkung aktiviert und hat Auswirkung auf den Glucosestoffwechsel (ANDERWALD et al. 2007). Weiterhin erfolgt über die PI3K auch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors „sterol response element-binding protein 1“ (SREBP1) welches wiederum ein wichtiger Transkriptionsfaktor im Glucose- und Fettstoffwechsel ist (DESVERGNE et al. 2006). Eine Beeinflussung der Expression dieses Transkriptionsfaktors durch PG hätte möglicherweise positive Wirkungen auf den Glucose und Fettstoffwechsel bei der Ketose.

### **2.5.7 Abbauwege für PG und Propanol**

Der Abbau von Propylenglycol erfolgt zum Teil bereits im Pansen sowie nach intakter Resorption des PG in der Leber des Rindes (vgl. Kap. 2.4). Die dabei im Pansen

entstehenden Metaboliten Propanol und Propionat werden resorbiert und ebenfalls in der Leber verstoffwechselt (KRISTENSEN und RAUN 2007). Dabei erfolgt der Abbau des Propanol adäquat dem Ethanol, vorwiegend über die Alkohol-Dehydrogenase. Das intakt resorbierte PG wird in der Leber durch die Aldehyd-Dehydrogenase zu Lactat verstoffwechselt, welches dann in die Glukoneogenese einmünden kann (GUPTA und ROBINSON 1960, HUFF 1961). Möglicherweise führt PG aber neben der Bereitstellung glukoplastischer Substrate wie Propionat und Lactat auch durch weitere regulatorische Wirkungen zu einer besseren Energieversorgung der Milchkuh postpartum.

### **2.5.8 Bedeutung der Literatur für die eigene Fragestellung**

Die Ketose des Rindes ist eine wirtschaftlich bedeutende Erkrankung insbesondere des Hochleistungsrindes (vgl. Kap. 2.1.8). Die wirksame Therapie bzw. idealerweise Prophylaxe der Ketose könnte Therapiekosten senken sowie Verluste reduzieren. Seit Jahren wird PG erfolgreich zu diesem Zweck eingesetzt (vgl. Kap. 2.3). Die bisher publizierten Untersuchungen zum Wirkmechanismus des PG zielten vor allem auf den Nachweis der glukoplastischen Wirkung von PG. Wenn PG jedoch alleinig durch die nachgewiesene Bereitstellung glukoplastischer Substrate wie Propionat antiketotisch wirkt, würde eine entsprechende Supplementierung von z.B. Propionat dieselben positiven Ergebnisse erzielen. Verschiedene Studien konnten jedoch Hinweise auf eine mögliche Überlegenheit von PG in der Ketosetherapie gegenüber Propionat und Glycerin nachweisen (SAUER et al. 1973, FISHER et al. 1973, HAMADA et al. 1982). Um die in der Einleitung formulierte Zielsetzung der Arbeit zu erreichen, müssen entsprechend des derzeitigen Wissensstandes die Stoffwechselwege Ketonkörpersynthese, Ketonkörperabbau, Gluconeogenese, Glycolyse, Pentosephosphat-Weg, Propionat-Abbau, PG-Stoffwechsel,  $\beta$ -Oxidation, Fettsäuresynthese, Cholesterinsynthese, PG- und Alkoholabbau, Citratcyclus, sowie die Insulinrezeptor-assoziierten Gene, die primären und sekundären Insulinzielgene sowie die Bestandteile des PI3K-Signaltransduktionsweges und die Zielgene der PI3-Kinase bei der hepatischen Transkriptomanalyse nach PG-Fütterung eine besondere Beachtung finden.

## 3 Tiere, Material und Methoden

### 3.1 Versuchsdesign

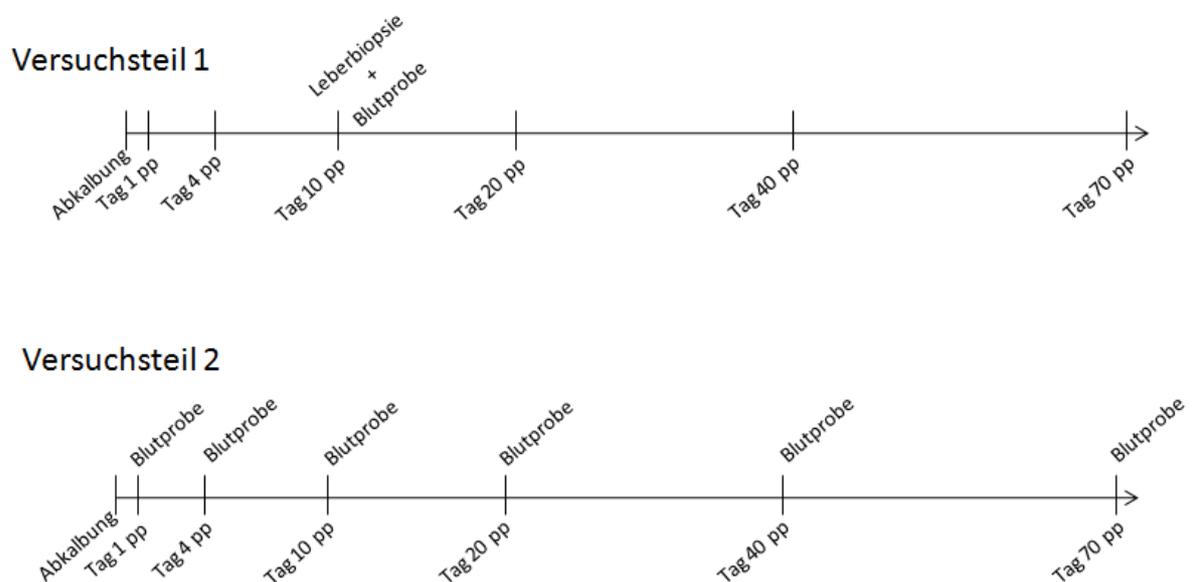
Die Untersuchungen wurden in einem Milchrinderbestand in Hohen Luckow, Mecklenburg-Vorpommern, an Kühen der Rasse Holstein-Friesian durchgeführt. Die Kühe wurden in einem Boxenlaufstall auf Spaltenböden gehalten. Sie bekamen eine totale Mischration (TMR) mit in Tabelle 1 aufgeführter Zusammensetzung. Die TMR wurde einmal täglich gefüttert und neunmal täglich neu aufgeschoben. Als Voraussetzung für die Aufnahme in den Versuch durften die Kühe nicht klinisch erkrankt sein. Sie mussten mindestens eine vorausgegangene Laktation aufweisen, in der sie mindestens 7500 kg Fett-korrigierte Milch (an 305 Tagen) gaben. Es durfte aktuell keine Mehrlingsträchtigkeit vorliegen. Der Body Condition Score sollte über 2,5 liegen, bei einer Skala von 1 bis 5, und alle vier Euterviertel mussten melkbar sein. Waren diese Kriterien erfüllt wurde die Kuh am Tag der Abkalbung (Tag 0) zufällig einer der folgenden drei Versuchsgruppen zugeordnet. Alle drei Versuchsgruppen erhielten Wasser und TMR ad libitum (s.o.) dazu zusätzlich: a) keine Zusätze (CON1, CON2), b) 300 ml Propylenglycol (Dr. Pieper, Wuthenow) pro Tier und Tag eingemischt in die TMR von Tag 0-40 postpartum (PGF1, PGF2) und c) 300 ml Propylenglycol pro Tier und Tag eingemischt in die TMR von Tag 0-40 postpartum und zusätzlich 512 g PG (500 ml PG in 10 Liter Wasser gelöst) als oralen Drench an Tag 10 postpartum (PGD). Der Drench der Tiere in der PGD-Gruppe erfolgte etwa 2 h vor der Leberpiopsie.

**Tabelle 1:** Zusammensetzung und Analyse der totalen Mischration

<b>Rohstoff</b>	<b>CON1/CON2 in kg Originalsubstanz (OS)</b>	<b>PGF1/PGF2/ PGD in kg OS</b>
Mais-Silage	27,5	27,5
Anwelksilage 2.Schnitt	6,0	6,0
Luzerne 1. Schnitt	3,0	3,0
Gerstenstroh	0,37	0,37
Biertreber	2,32	2,32
HP-Soja	0,930	0,930
Rapsexpeller 10% Fett	0,775	0,775
Deuka UDP (stabil. Protein)	1,79	1,79
Feuchtmais	2,09	2,09
Weizen	1,88	1,86
Bergastat T 300 (Palmöl)	0,34	0,34
Propylenglycol	/	0,300
SN 2260 TMR H.Luckow*	0,415	0,415
<b>Summe</b>	<b>47,38</b>	<b>47,69</b>
* Zusammensetzung in Anhang 1		
<b>Analyse der Inhaltsstoffe</b>	<b>CON1/CON2</b>	<b>PGF1/PGF2/PGD</b>
Trockensubstanz (TS) in %	41,6	41,2
Rohfaser (% TS)	15,7	16,0
Rohprotein (% TS)	16,1	16,3
Nutzbares Rohprotein (nXP, in g / kg TS)	160	162
Pansenbeständiges Protein (UDP, in % TS)	5,27	5,36
Rohfett (% TS)	5,5	5,6
Stärke und Zucker (% TS)	30,1	30,5
ADF (% TS)	18,9	19,1
NDF (% TS)	3,5	36,0
NEL / kg TS (MJ)	7,3	7,1
Kalzium (% TS)	0,74	0,76
Phosphor (% TS)	0,43	0,48
Natrium (% TS)	0,24	0,25
Magnesium (% TS)	0,25	0,25
Kalium (% TS)	1,19	1,22
Vitamin A (IE / kg TS)	9417	9576
Vitamin D (IE / kg TS)	1048	1064
Vitamin E (mg / kg TS)	2262	2262

## 3.2 Probennahme

Das Probennahmeschema ist in Abbildung 2 dargestellt. Im **Versuchsteil 1** erfolgte die Untersuchung der RNA-Expression im Lebergewebe sowie die Bestimmung von folgenden Blutwerten im Serum zum Zeitpunkt 10 Tage nach der Abkalbung: Glucose, Ketonkörper, BHBA, NEFA, Triglyceride, Insulin, IGF-1, Billirubin, GOT, GPT, GGT, GLDH, Fructosamine und TEAC in den 3 Versuchsgruppen CON1, PGF1 und PGD (jeweils n=10). Im **Versuchsteil 2** erfolgte an anderen Tieren derselben Herde die Bestimmung von Sterolen (einschließlich Cholesterin und seiner Vorstufen) im Serum, im Zeitverlauf von 1, 4, 10, 20, 40 und 70 Tagen pp. (Gruppen CON2 und PGF2, jeweils n=15).



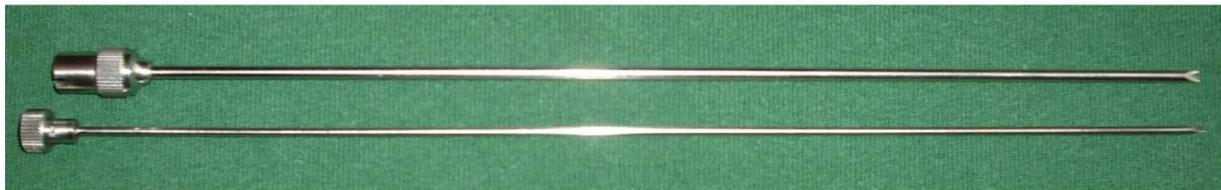
**Abbildung 2.** Zeitlicher Ablauf der Versuchsteile

### 3.2.1 Blutprobennahme

Im ersten Versuchsteil wurden von jeder Kuh am Tag 10 pp. jeweils 20 ml Blut abgenommen. Die Blutproben zur Serumgewinnung wurden unmittelbar vor der Leberbiopsie (siehe unten) aus der Schwanzvene (Vena caudalis mediana) mittels Vacutainer "Venosafe" (Fa. Terumo Europe, Leuven, Belgien) entnommen. Nach zehn Minuten bei Raumtemperatur wurden die Röhrchen für zehn Minuten bei 1000 g zentrifugiert (Centrifuge 5415R, Fa. Eppendorf, Hamburg). So gewonnenes Blutserum wurde in Kryoröhrchen abpipettiert und bei -20°C bis zur Untersuchung gelagert. Die Blutprobennahme im zweiten Versuchsteil lief identisch ab.

### 3.2.2 Leberbiopsie

Die Leberbiopsien wurden nur im ersten Versuchsteil am Tag 10 pp. durchgeführt. Es wurde darauf geachtet, dass zwischen dem oralen Drench in Gruppe PGD und der Leberbiopsie mindestens 2 und höchstens 3 Stunden vergingen. Die Kuh wurde direkt nach der Blutentnahme mit Xylacin (6 mg pro Kuh, Fa. Bayer, Leverkusen) sediert. Zwischen Sedierung und Probennahme sollten nicht mehr als 30 Minuten vergehen, um auszuschließen, dass Xylacin möglicherweise das Expressionsprofil beeinflussen könnte. Die Entnahmestelle befand sich an der rechten Körperseite, im 11. Intercostalraum, eine Handbreit unterhalb der Lendenwirbelfortsätze. In diesem Bereich wurde die Haut rasiert und anschließend mit einer Seifenlösung gewaschen und desinfiziert. Der desinfizierte Bereich wurde lokal betäubt durch Unterspritzen mit 10 ml Isocain (Fa. Selectavet, Weyarn-Holzolling) pro Kuh. Nach Wirkeintritt der Betäubung erfolgte eine Stichinzision mittels Einmalskalpell (Fa. B. Braun, Tuttlingen). Dann wurde die Biopsienadel mit Trokar („Berliner Modell“, Fa. Eickemeyer Medizintechnik, Tuttlingen, Abbildung 3) eingeführt.



**Abbildung 3.** Biopsienadel "Berliner Modell", Länge 25 cm, Innendurchmesser 2 mm

Zunächst wurde die Biopsienadel waagrecht durch die Haut vorgeschoben und dann weiter in Richtung des linken Ellenbogens geschoben bis am charakteristischen, „rauhem“ Gefühl erkannt wurde, dass sich die Spitze des Trokars im Lebergewebe befand. Nach Herausziehen des Mandrins wurde die Kanüle nun mehrmals vorgeschoben und mit aufgesetztem Finger wieder hinausgezogen (siehe Abbildung 4). Anschließend wurde jeweils ein 3 bis 4 cm langes Stück Lebergewebe direkt in ein mit 3 ml RNAlater (Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) gefülltes Probenfläschchen (Narrow mouth bottle-HDPE, Fa. Nalgene, Rochester, USA) gegeben.



**Abbildung 4.** Entnahme von Lebergewebe. Nach Füllen der Kanüle mit Lebergewebe verschließt der Daumen während des Herausziehens das Ende der Biopsienadel, damit das Lebergewebe durch den Unterdruck in der Kanüle gehalten wird.

Pro Kuh wurden zwei Probengefäße gefüllt. Die Probengefäße lagerten 24 Stunden im Kühlschrank ( $\sim 6^{\circ}\text{C}$ ) damit das RNAlater das Lebergewebe gut durchdringen konnte und wurden anschließend bei  $-20^{\circ}\text{C}$  bis zur RNA-Aufarbeitung eingefroren.

### **3.2.3 Mikroarrayuntersuchung**

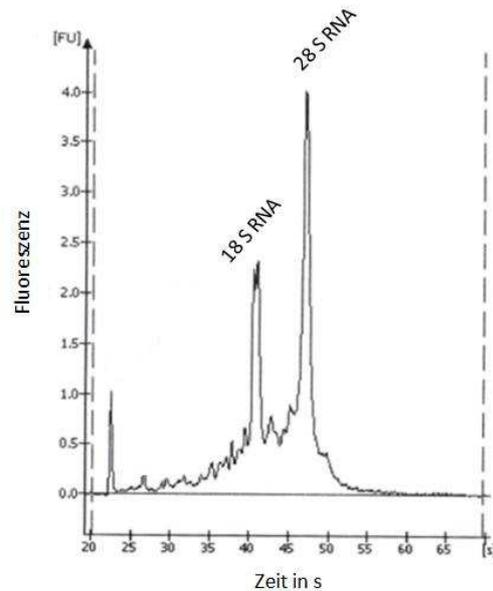
#### **3.2.4 Isolierung von Gesamt-RNA aus Lebergewebe**

Die RNA Isolierung wurde durchgeführt mittels TRIZOL<sup>®</sup>-Extraktion modifiziert nach CHOMCZYNSKI und SACCHI (1986). Dazu wurden 50 bis 100 mg Lebergewebe vorsichtig aus dem RNAlater entnommen. Das Gewebe wurde mit flüssigem Stickstoff in einem Porzellan Mörser (Fa. VWR, Darmstadt) pulverisiert. Das Pulver wurde mit wenig flüssigem Stickstoff in einen Glashomogenisator (Fa. Wheaton, bezogen über Fa. VWR, Darmstadt) umgeschüttet und unter Zugabe von 1 ml TRIZOL (Fa. Invitrogen, Karlsruhe) auf Eis gründlich homogenisiert. Das entstandene Homogenat wurde mit einer 1-ml-Spritze (Fa. Dispomed, Genhausen) mit aufgesetzter Kanüle (Neoplus 20G, Fa. BSN medical, Hamburg) vollständig aufgezogen und in ein 2-ml-Reaktionsgefäß (Fa. Eppendorf, Hamburg) gegeben. Nach Zentrifugation für 10 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  und  $6200\text{ g}$  wurde der Überstand in ein neues 2-ml-Reaktionsgefäß überführt. Zum Überstand wurden nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur 0,2 ml Chloroform (Fa. Merck, Darmstadt) zugegeben. Das Reaktionsgefäß wurde danach sofort verschlossen und 15 s kräftig von Hand geschüttelt. Nach erneuter 3-min Inkubation schloss sich eine 15-min Zentrifugation bei  $4^{\circ}\text{C}$  und  $6200\text{ g}$  an. Im Anschluss wurde die obere, klare, RNA-haltige Phase vorsichtig mit der Pipette abgezogen und in ein neues 2-ml-Reaktionsgefäß überführt. Zu der oberen Phase wurden 0,5 ml 2-Propanol (Carl

Roth, Karlsruhe) gegeben und gut gemischt. Bei Raumtemperatur stand die Mischung 10 min bevor sie 10 min bei 4 °C und 6200 *g* zentrifugiert wurde. Das am Boden befindliche, gelartige Pellet enthielt die RNA. Der Überstand wurde abpipettiert und verworfen, danach wurde das Pellet noch zweimal mit 70% Ethanol gewaschen, bei Raumtemperatur getrocknet und in 100 µl Reinstwasser (Fa. Millipore, Billerica, USA) gelöst. Anschließend erfolgte eine zusätzliche Reinigung mittels Qiagen-Säulen (RNeasy Mini Kit, Fa. Qiagen, Hilden), wobei streng der beiliegenden Anweisung des Herstellers zur RNA-Reinigung gefolgt wurde. Die RNA wurde im letzten Schritt in einem Volumen von 50 µl Reinstwasser gelöst.

### **3.2.5 Qualitätskontrolle der RNA**

Die erste Qualitätskontrolle der RNA erfolgte im eigenen Labor mittels Photometer (Biophotometer, Fa. Eppendorf, Hamburg). Zur Messung wurden Mikroküvetten (UVette, Fa. Eppendorf, Hamburg) verwendet. Der Leerwert wurde mit 100 µl Reinstwasser bestimmt. Für die Messung der RNA-Reinheit wurden 2µl RNA in 98 µl Reinstwasser eingemischt und deren Extinktion bei 260 nm und 280 nm gemessen. Das Verhältnis der Messwerte (260/280) sollte bei reiner RNA mehr als 1,8 betragen. Die zweite Qualitätskontrolle erfolgte im Labor des Interdisziplinären Zentrums für klinische Forschung (IZKF) mittels Agilent Bioanalyser 2100 (Fa. Agilent Technologies, Waldbronn). Hierbei wurde durch das Gerät ein Elektropherogramm erstellt. Dieses Verfahren erlaubt es, die Intaktheit der RNA durch eine saubere Trennung der 18 S- und 28 S-RNA zu bestimmen (Abbildung 5). Die RNA hat eine gute Qualität wenn die 28 S-Zacke größer ist als die 18 S-Zacke und beide deutlich voneinander abgrenzbar sind sowie keine zusätzlichen Zacken auf Verunreinigungen hindeuten. RNA welche diese Kriterien erfüllte wurde weiter verwendet.

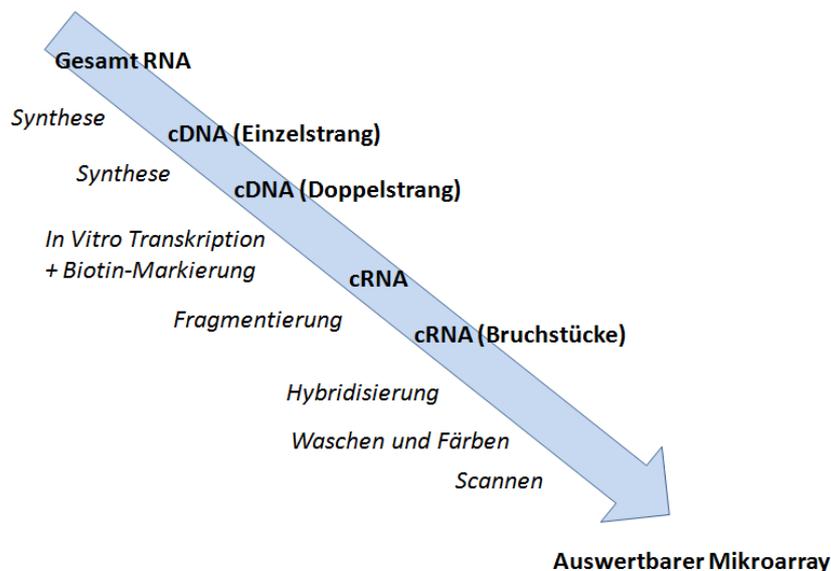


**Abbildung 5.**

Elektropherogramm einer RNA-Probe. Die 18 S sowie 28 S Zacken sind deutlich voneinander abgegrenzt, und die 28 S Zacke ist deutlich höher als die 18 S Zacke. Damit ist die RNA für die weitere Verwendung im Mikroarrayexperiment geeignet.

### 3.2.6 Mikroarrayhybridisierung

Die weiteren Schritte bis zur Hybridisierung auf dem Mikroarray erfolgten nach Anweisung des technischen Handbuchs (Expression Analysis Technical Manual für GeneChip®, Stand 2006, Fa. Affymetrix, Santa Clara, USA) und sind im Folgenden näher beschrieben. Die zeitliche Aufeinanderfolge der einzelnen Schritte ist in Abbildung 6 dargestellt.



**Abbildung 6.** Zeitliche Aufeinanderfolge der RNA-Prozessierung bis zum auswertbaren Mikroarray

#### Synthese der cDNA

Zuerst musste die im vorigen Schritt isolierte Gesamt-RNA (siehe 3.2.4) in cDNA umgewandelt werden. Das erfolgte mittels „Transkriptor First Strand cDNA-Synthesis“ Kit (Fa. Roche, Mannheim). Dabei wurden etwa 5 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Zuerst wurden 5 µl RNA mit 1 µl T7 Oligonukleotiden (Fa. Biomers, Ulm) und 5 µl Reinstwasser 10 min bei 70 °C inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 4 µl First strand buffer (5 x konzentriert), 2 µl Dithiothreitol (DTT), 1 µl dNTP und 2 µl Reverse Transcriptase. Dieser Reaktionsansatz wurde dann 60 min bei 42 °C inkubiert.

Nach Synthese des ersten cDNA Stranges wurde in einem zweiten Schritt der complementäre cDNA Strang synthetisiert sowie die Ausgangs-RNA abgebaut. Dazu wurden zum oben beschriebenen Reaktionsansatz folgende Bestandteile pipettiert: 30 µl Second strand buffer (5 x konzentriert), 3 µl dNTP, 1 µl *E. coli* Ligase, 4 µl *E. Coli* Polymerase I, 1 µl RNase H, 91 µl Reinstwasser. Dann wurde kurz zentrifugiert, um das Reaktionsgemisch auf dem Boden des Reaktionsgefäßes zu sammeln und anschließend für 120 min bei 16 °C inkubiert. Nach Zugabe von 4 µl T4 Polymerase (Fa. Invitrogen, Karlsruhe) und einer Inkubation von 5 min bei 16 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 µl EDTA gestoppt. Nach Herstellung der doppelsträngigen cDNA erfolgte eine erneute Aufreinigung der cDNA durch Phenol/Chloroform mit anschließender Fällung durch Ammoniumacetat und Ethanol (96%). Das nach der Zentrifugation erhaltene Pellet wurde in 20 µl destilliertem Wasser gelöst. Zur Kontrolle der erfolgten cDNA-Synthese wurde eine Elektrophorese unter Verwendung eines 1,5% Agarosegels durchgeführt. Als Größenmarker wurde die 100-Basenpaarleiter mitgeführt.

### ***In vitro* Transkription**

Nach erfolgter cDNA Synthese wurde die *in vitro* Transkription zur Herstellung von cRNA unter Nutzung des „GeneChip Expression 3'-Amplification Reagents for IVT Labeling“ (Fa. Affymetrix, Santa Clara, USA) nach Anleitung des Herstellers und dem Technical Manual für GeneChip® (Expression Analysis Technical Manual GeneChip®, Stand 2006, Fa. Affymetrix, Santa Clara, USA) durchgeführt. In diesem Schritt wurde die entstandene cRNA gleichzeitig Biotin-markiert. Die entstandene cRNA wurde mittels Qiagen-Säulen (RNA Mini Kit, Qiagen, Hilden) gereinigt wobei der beiliegenden Anleitung zur RNA-Reinigung gefolgt wurde. Danach wurde der RNA-Gehalt mittels UV-Spektroskopie bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt, da für den weiteren Verlauf mindestens 20 µg cRNA benötigt wurden. Anschließend folgte eine RNA-Fällung mit Ammoniumacetat um letzte Verunreinigungen zu entfernen.

### **Fragmentierung der cRNA**

Die cRNA wurde vor der weiteren Verwendung in kleinere RNA-Stücke zerlegt um besser an die Oligonukleotide auf dem Mikroarray hybridisieren zu können. Dazu wurden 8 µl Fragmentationspuffer (5 x Fragmentation Buffer, Fa. Affymetrix, Santa Clara, USA) zu 20 µg cRNA gegeben und die Reaktionslösung mit Reinstwasser auf 40 µl aufgefüllt. Die Reaktion war nach 35 min bei 94°C abgeschlossen.

### **Hybridisierung**

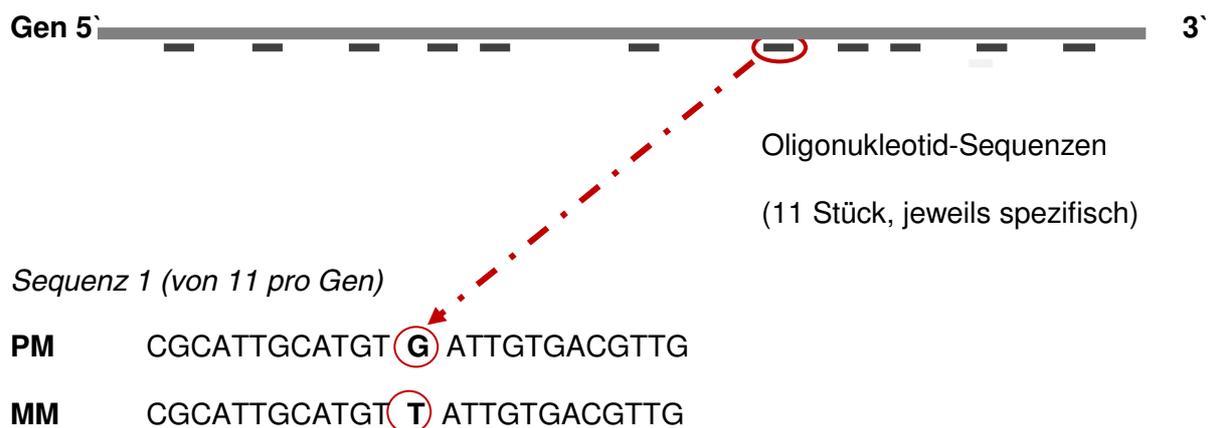
Nachdem die cRNA nun in Bruchstücken vorlag konnte sie zusammen mit den Hybridisierungsreagenzien auf den Mikroarray (GeneChip® Bovine Genome Array, Fa. Affymetrix, Santa Clara, USA) aufgetragen werden. Dazu wurden 40 µl der fragmentierten cRNA, 5 µl Oligonukleotide (B2, 3 nM), 15 µl Hybridisationskontrolle (20 x konzentriert), 3 µl Heringssperma (10 mg/ml), 3 µl BSA (acetyliert, 50 mg/ml), 150 µl Hybridisierungspuffer (2 x konzentriert), 30µl DMSO und 54 µl Reinstwasser in ein Reaktionsgefäß pipettiert und 5 min bei 99 °C und anschließend 5 min bei 45 °C inkubiert. Abschließend wurde das Gemisch kurz auf Eis gekühlt und abschließend zentrifugiert. Von diesem Hybridisierungscocktail wurden 130 µl auf den Mikroarray aufgebracht und verblieben dort für 16 Stunden. In den 16 Stunden befand sich der Mikroarray unter ständiger Rotation bei 45°C im Hybridisierungssofen (Hybridization Oven 640, Fa. Ventana, Illkirch, Frankreich). In dieser Zeit binden die komplementären RNA-Fragmente an die Oligonukleotide auf dem Mikroarray. Die zugefügte Hybridisationkontrolle muss in jedem Fall an den Mikroarray binden um sicherzustellen dass die Reaktion funktioniert hat. Diese Kontroll-RNA ist zum einen kreuzförmig in der Mitte sowie am Rand des Mikroarray angeordnet. Das entstehende Kreuz in der Mitte des Mikroarray dient bei der späteren Auswertung als Orientierung.

### **Waschen und Färben**

Nach der Hybridisation wurden die Mikroarrays zum Waschen und Färben in die Fluidics Station 400 (Fa. Affymetrix, Santa Clara, USA) eingespannt. Dort werden die Chips mit nichtstringenten (Wash A) und stringenten (Wash B) Waschlösungen gewaschen sowie mit Streptavidin-haltigen (Färbelösung I) und Antistreptavidin-haltigen (Färbelösung II) Färbelösungen angefärbt. Die für die Bovine Genome Arrays verwendete Abfolge der Wasch- und Färbeschritte sowie die Zusammensetzung der Puffer sind in Kapitel 6 des „Expression Analysis Technical Manual für GeneChip® Stand 2006“ ausführlich beschrieben. Nach allen erforderlichen Waschschrinen wurde die Farbreaktion mit dem „GeneChip Scanner 3000“ (Fa. Affymetrix, Santa Clara, USA) gemessen und als .cel-Datei ausgegeben.

### 3.2.7 Allgemeiner Aufbau des verwendeten Mikroarray

Bei den verwendeten Affymetrix Mikroarrays handelt es sich um Oligonukleotid-Mikroarrays, bei denen die DNA-Sequenzen durch Photolithographie und kombinatorische Chemie direkt auf die Glasoberfläche des Mikroarrays synthetisiert werden. In der vorliegenden Studie wurde ein Oligonukleotid-Mikroarray speziell für das Rinder-Genom eingesetzt (GeneChip® Bovine Genome Array, Fa. Affymetrix, Santa Clara, USA). Dieser Mikroarray enthält ~528.000 kurze Gensequenzen, sogenannte Oligonukleotide, zum Nachweis der mRNA von ~23.000 verschiedenen Genen. Für jedes Gen sind stellvertretend 11 verschiedene spezifische Gensequenzen an zufällig ausgewählten Positionen auf dem Mikroarray aufgetragen. Diese 11 Sequenzen bilden ein sogenanntes Probesets. Ein Probeset besteht aus 11 Sequenzpaaren (probe pairs). Jedes Sequenzpaar besteht jeweils aus einer perfekt passenden Gensequenz (perfect match, PM) für ein Gen, sowie einer nahezu identischen Gensequenz, welche sich lediglich in der mittleren Base von der PM-Sequenz unterscheidet (mismatch, MM). Dieses Prinzip wird in Abbildung 7 dargestellt.



**Abbildung 7.** Schematische Darstellung der Funktionsweise des verwendeten Affymetrix Mikroarrays. Jedes Gen wird durch 11 verschiedene spezifische kurze Gensequenzen repräsentiert. Dabei verteilen sich die Gensequenzen vom 5' bis zum 3' Ende über die Gensequenz. Jede der 11 spezifischen kurzen Gensequenzen ist einmal in korrekter Sequenz auf dem Mikroarray aufgetragen (PM = perfect match) und einmal in nicht ganz korrekter Sequenz (MM = mismatch). Die MM Sequenz unterscheidet sich jedoch nur in der zentralen Base an Position 13 von der PM Sequenz. In diesem Beispiel wurde die Base G im MM durch die Base T ersetzt.

Idealerweise bindet die transkribierte RNA die spezifisch für das gesuchte Gene ist, stärker an die spezifische Sequenz (PM) auf dem Mikroarray als an die MM-Sequenz. Die PM und MM Sequenzen werden von Affymetrix gewählt um die Hintergrundfluoreszenz zu ermitteln, da die Gensequenzen auf dem Mikroarray so eng nebeneinander aufgetragen werden, dass

nahezu keine freien Bereiche übrigbleiben an denen die Hintergrundfärbung bestimmt werden kann. Dabei geht man im Allgemeinen davon aus, dass die Intensität für die PM Sequenz aufgrund der stabileren Bindung höher ist als für die MM Sequenz. Genauer erläutert wird die Methode der Hintergrundkorrektur mittels PM-MM-Paaren von BINDER u. PREIBISCH (2005).

### **3.2.8 Analyse der Mikroarray-Daten**

Die primäre Datenanalyse erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. K. Krohn vom Interdisziplinären Zentrum für klinische Forschung (IZKF) in Leipzig. Die vom Scanner gelieferten Fluoreszenz-Rohdaten wurden mithilfe der GeneChip operating software 1.3 (Affymetrix, Santa Clara, USA) als .cel-Dateien gespeichert. Die weitere Bearbeitung sowie die Qualitätskontrolle und statistische Auswertung erfolgte in Zusammenarbeit mit den Herrn Dres. M. Rosolowski und D. Hasenclever vom Institut für Medizinische Informatik, Statistik und Epidemiologie (IMISE) in Leipzig. Dazu erfolgte die Normalisierung der Rohdaten mittels VSN-Methode (HUBER et al. 2002). Die Berechnung der Intensitätswerte erfolgte mithilfe eines robusten angepassten additiven Modells (IRIZARRY et al. 2003). Nach der Normalisierung wurden die einzelnen Mikroarrays einer Qualitätskontrolle unterzogen (Kap. 3.2.9).

### **3.2.9 Qualitätskontrolle der Mikroarray-Daten**

Durch die Qualitätskontrolle der einzelnen Mikroarrays wird sichergestellt, dass die verwendeten Arrays von vergleichbarer Qualität sind, so dass die erhaltenen Daten untereinander vergleichbar sind. Bestandteile der Qualitätskontrolle sind eine optische Inspektion zur Erkennung eventuell ungleichmäßiger Hybridisierung sowie die Darstellung der Intensitäten (vor und nach Normalisierung) als Boxplot-Diagramm. Weiterhin betrachtet werden die „relative logarithmische Expression“ (RLE) und der „normalisierte unskalierte Standardfehler“ (NUSE) (WILSON et al. 2008). Die Qualitätskontrolle erfolgte mithilfe des Programmes Bioconductor (GENTLEMAN et al. 2004). Weitere Erläuterungen zur Beurteilung dieser Parameter befinden sich in Kap. 4.3.

### **3.2.10 Statistische Auswertung der Mikroarray-Daten**

Nach erfolgreichem Bestehen der Qualitätskontrollen können die erhaltenen Daten der einzelnen Mikroarrays untereinander verglichen werden. Sämtliche folgende statistische Berechnungen wurden mit der statistischen Software R (R DEVELOPMENT CORE TEAM 2005) und der Software Bioconductor, beschrieben in Gentleman et al. (2004), durchgeführt. Zuerst wurden Gene für die kein Expressionssignal ermittelt werden konnte (bzw. deren Signal der PM Sequenz sich nicht vom Signal der MM Sequenz unterschied) als „absent“, also als nicht exprimiert, bezeichnet und von den weiteren Berechnungen ausgeschlossen.

Ebenfalls ausgeschlossen wurden 20% der Gene auf allen Mikroarrays welche die geringste Varianz zwischen den einzelnen Mikroarrays aufwiesen, da diese Gene auch zwischen den drei Versuchsgruppen mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit nicht differentiell exprimiert werden.

Die weitere statistische Auswertung erfolgte in 2 verschiedenen Untersuchungsschritten. Der erste Ansatz geht davon aus, dass durch die nahezu identischen Versuchsbedingungen zwischen den einzelnen Versuchsgruppen, die sich lediglich auf unterschiedliche Konzentrationen an Propylenglycol beschränkten, eine Aussage bezüglich der Beeinflussung einzelner Stoffwechselwege bzw. Signalkaskaden sicherer ist, wenn der gesamte Stoffwechselweg betrachtet wird. Dabei wurde davon ausgegangen, dass eine mögliche Regulation nicht auf ein einzelnes Gen beschränkt ist, sondern Propylenglycol zumindest die Expression mehrere Gene eines Stoffwechselweges bzw. einer Signalkaskade verändert. Für die Testung ausgewählter Stoffwechselwege wurde die statistische Methode nach EFRON und TIBSHIRANI (2007) angewendet. Hierfür wurden Stoffwechselwege gewählt, welche im Vorfeld als möglicherweise beeinflusst durch Propylenglycol diskutiert wurden (siehe Literatur 2.5). Im Vorfeld wurden alle auf dem Mikroarray vorhandenen Gensequenzen nach Genen folgender Stoffwechselwege durchsucht: Ketonkörpersynthese, Ketonkörperabbau, Gluconeogenese, Glycolyse, Pentosephosphat-Weg, Propionat-Abbau, PG-Stoffwechsel,  $\beta$ -Oxidation, Fettsäuresynthese, Cholesterinsynthese, PG- und Alkoholabbau, Citratcyclus, sowie die Insulinrezeptor-assoziierten Gene, die primären und sekundären Insulinzielgene sowie die Bestandteile des PI3K-Signaltransduktionsweges und die Zielgene der PI3-Kinase (siehe Tabelle 2). Eine ausführliche Liste der auf dem Mikroarray vorhandenen und in diese Auswertung einbezogenen Gene befindet sich im Anhang 2.

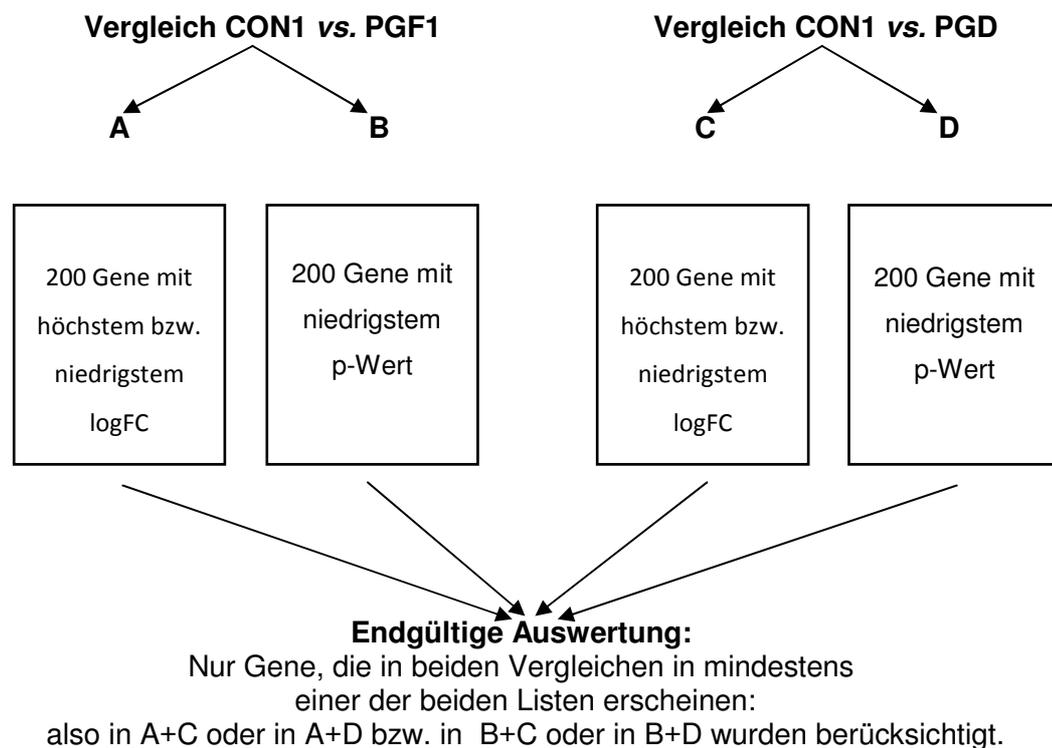
**Tabelle 2.** Liste der in die Auswertung einbezogenen Stoffwechselwege. Eine namentliche Aufzählung der in den Stoffwechselwegen enthaltenen Gene befindet sich in Anhang 2.

Stoffwechselweg	Anzahl Gene auf dem GeneChip®
Ketonkörpersynthese	3
Ketonkörperabbau	1
Gluconeogenese	26
Glycolyse	26
Pentosephosphat-Weg	5
Propionat-Abbau	4
PG-Stoffwechsel	22
β-Oxidation	18
Fettsäure-Synthese	3
Cholesterin-Synthese	19
PG und Alkohol-Abbau	4
Citratzyklus	26
Insulinrezeptor-assoziierte Gene	23
Primäre Insulin-Zielgene	7
Sekundäre Insulin-Zielgene	4
Bestandteile des PI3K-Signaltransduktionswegs	15
Zielgene der PI3-Kinase	17

Es ist anzumerken, dass Gene für einige Enzyme bzw. Signalmoleküle mehrfach (unter verschiedenen Affymetrix-Nummern) auf dem Mikroarray vorhanden sind. In diesen Fällen wurden alle Gene in die Auswertung einbezogen, die für das entsprechende Enzym bzw. Signalmolekül kodieren. Dieses Vorgehen erscheint gerechtfertigt, da nicht in der Leber transkribierte Isoformen des Enzyms bzw. des Signalmoleküls aufgrund des Auswertlogarithmus als „absent“ identifiziert wurden und auf diese Weise sowieso von der weiteren Auswertung ausgeschlossen seien sollten. Die Zuordnung der Gene zu den Stoffwechselwegen bzw. Signalkaskaden erfolgt mittels ExPASy Datenbank (Enzyme nomenclature database, Stand Oktober 2007) und der KEGG Pathway Datenbank (Stand Oktober 2007). Die Zielgene für Insulin, die Insulinsignalkaskade sowie den Insulinrezeptor wurden in Anlehnung der auf dem „GEArray Q Series Human Insulin Signaling Pathway Gene Array“ der Fa. SuperArray (Bethesda, MD, USA) als Zielgene geführten Gene ausgewählt.

Um festzustellen ob außer den aus der Literatur ableitbaren, potenziell durch PG beeinflussten Stoffwechsel- bzw. Signalwegen noch andere Gene durch PG reguliert

werden, wurden in einem zweiten Untersuchungsschritt alle auf dem Mikroarray vorhandenen, als „present“ erkannten Gene des Mikroarrays ohne vorherige Betrachtung der Funktion statistisch ausgewertet. Die Auswertung erfolgte dabei zum einen nach logarithmiertem Fold Change (logFC), also der logarithmierten Expressionsänderung eines Gens zwischen zwei Gruppen, und zum anderen nach dem p-Wert. Ein logFC von 0,3 entspricht z.B. einem FC von 2 und somit einer Verdopplung der Expressionswerte zwischen den untersuchten Gruppen. Ein logFC von -0,3 entspricht einem FC von -2 und somit einer zweifach niedrigeren Expression des untersuchten Gens zwischen den Versuchsgruppen. Bei dieser Auswertung wurden 4 Ergebnislisten generiert.



**Abbildung 8.** Schematische Darstellung der statistischen Auswertung aller Gene auf dem Mikroarray. Genauere Beschreibung des Auswerteverfahrens im Text.

Da mit verschiedenen Dosierungen von PG gearbeitet wurde, ist anzunehmen, dass Gene, die in beiden Versuchsgruppen differentiell exprimiert werden, mit einer größeren Wahrscheinlichkeit auch tatsächlich an der Wirkung von PG beteiligt sind. Aus diesem Grund wurden nur Gene weiter betrachtet die in beiden Gruppen in mindestens einer der Listen enthalten waren. Es wurde also beispielsweise ein Gen weiterbetrachtet, dass im Vergleich CON1 vs. PGF1 unter den 200 Genen mit dem größten logFC war (größter biologischer Unterschied innerhalb der verwendeten Tiere), und im Vergleich CON1 vs. PGD unter den 200 Genen mit dem niedrigsten p-Wert (höchste Wahrscheinlichkeit tatsächlich differentiell exprimiert zu sein). In der Literatur werden 1,5-fache (CHEN 2001) bis 4-fache

(NOTTERMAN 2001) Expressionsänderungen als untere Grenze für eine differentielle Expression angesehen. In der vorliegenden Studie wurden  $-0,2$  bzw.  $0,2$  logFC (entspricht umgerechnet 1,6-fach niedrigerer oder höherer FC-Wert) als differentielle Expression angenommen. Dieser relativ niedrige Wert wurde gewählt, um auch niedrige aber biologisch relevante Expressionsänderungen detektieren zu können. Darum wurden alle Gene von der weiteren Betrachtung ausgeschlossen, deren logarithmierter FC lediglich zwischen  $-0,2$  und  $+0,2$  lag, da dies auf eine nur geringe Änderung des Expressionsniveaus schließen lässt. Auch die Gene, deren p-Wert  $> 0,1$  lag, wurden ausgeschlossen.

Die verbleibenden Gene wurden einzeln auf ihre Funktion hin geprüft. Dabei wurden grundsätzlich als erstes die von Affymetrix angegebenen Annotationen der Gensequenzen benutzt und nach Funktionen (Stoffwechselwegen, Signalkaskaden etc.) geordnet. Bei einem Teil der Gene wurde durch Affymetrix lediglich die Annotation „transcribed sequence“ angegeben. Dabei handelt es sich um Gene mit noch nicht zugeordneter Funktion. Diese Gene mit der offiziellen Annotation „transcribed sequence“ wurden einzeln mithilfe der von Affymetrix angegebenen Genbank ID auf aktuellere Annotationen überprüft. Dies erfolgte unter Nutzung der im Internet frei zugänglichen NCBI „cross database search“ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/>). Zusätzlich wurde bei unbekannter Funktion die durch Affymetrix angegebene Gensequenz dieser Sonden mittels NCBI „Blast“ (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) nach Übereinstimmungen mit den aktuell publizierten Gensequenzen des Rindes untersucht, um identische Gensequenzen mit bekannter Funktion aufzuspüren. Einem Teil dieser „transcribed sequences“ konnte so doch eine Funktion zugeordnet werden. Nach erfolgter Annotation wurden auch diese Gene anhand ihrer Funktion geordnet.

### **3.2.11 Quantitative Real-time-PCR**

Der Vorteil bei Mikroarray-Experimenten besteht darin, eine sehr große Anzahl von Genen zur selben Zeit zu untersuchen. Im Gegensatz dazu lassen sich mit der Real-Time-PCR einige wenige Gene sehr präzise untersuchen. Als Methode zur spezifischen Detektion der Amplifikate wurden Fluoreszenz-markierte Taqman<sup>®</sup>-Sonden eingesetzt.

Für die vorliegende Studie wurde die quantitative Real-time-PCR (qRT-PCR) gewählt, um ausgewählte, im Mikroarray-Experiment als differenziell exprimiert erkannte Gene zu validieren. Die mRNA Transkriptionsmuster zwischen verschiedenen Proben mussten zuerst anhand einer internen Kontrolle standardisiert werden, um die erhaltenen Werte miteinander vergleichen zu können (RADONIC et al. 2004). Bei der internen Kontrolle handelt es sich um ein nicht reguliert exprimiertes Gen (im Folgenden als „Referenzgen“ bezeichnet). Als Referenzgen kann ein Gen dienen, das unabhängig von Alter, Laktation und Stoffwechselsituation stets konstant exprimiert wird (CICINNATI et al. 2008). Im Vorfeld des Versuches wurden die auf dem Mikroarray vorhandenen potentiellen Referenzgene

betrachtet. Von den drei in anderen Studien häufiger eingesetzten Referenzgenen Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, Beta-Aktin und Beta-2-Mikroglobulin (B2MG) wies B2MG in der Mikroarrayuntersuchung die geringste Standardabweichung in den Expressionswerten auf (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurde B2MG als Referenzgen eingesetzt. Die Ergebnisse der Real-time-PCR werden als  $C_t$ -Werte angegeben. Der  $C_t$ -Wert ist der erste Zyklus der quantitativen Real-time-PCR, dessen Fluoreszenzsignal sich signifikant vom Hintergrundsignal unterscheidet. Dabei verhält sich der  $C_t$ -Wert umgekehrt proportional zum Logarithmus der Ausgangsmenge an Nukleinsäure (WALKER 2002). Je kleiner der  $C_t$ -Wert ist, desto größer ist die Anzahl der Kopien der Zielsequenz vor dem Reaktionslauf. Wird das Ergebnis der Real-time-PCR für das Zielgen gegen das Ergebnis für das Referenzgen korrigiert ( $\Delta Ct$ ) erhält man eine Aussage über den Ausgangsgehalt an RNA in der Probe die weitestgehend unabhängig von der Menge der eingesetzten Gesamt-RNA ist und dadurch einen direkten Vergleich der Proben ermöglicht.

Vor Durchführung der qRT-PCR erfolgte eine *in vitro* Transkription der isolierten RNA mittels Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Fa. Roche, Mannheim) unter Verwendung der enthaltenen Random Hexamer Oligonukleotide nach Herstellerangaben im Thermocycler (PTC 200, Biozym Scientific, Hess. Oldendorf). Folgendes Programm kam zum Einsatz: 25°C für 10 min, 42°C für 60 min, 99°C für 5 min, 4°C für 5 min. Die weiteren Schritte erfolgten in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Rösler vom Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig. Die quantitative Real-time PCR wurde als Duplex-PCR optimiert, so dass in einem PCR-Lauf jeweils eines der beiden Zielgene, Hydroxymethylglutaryl-CoA Reduktase (HMGCR) oder Squalenmonooxygenase (SQLE), zusammen mit dem Referenzgen B2MG zeitgleich untersucht werden konnten. Verwendet wurde dazu der Absolute<sup>®</sup> QPCR Mix (Abgene GmbH, Hamburg, Germany) sowie die in Tabelle 3 genannten Primer und Sonden (synthetisiert durch Biomers.net, Ulm) in einer Konzentration von 600 nmol (Primer) und 800 nmol (Sonden). Jeder Reaktionsansatz umfasste 25  $\mu$ l.

**Tabelle 3.** Sequenzen der eingesetzten Primer und Sonden

Bezeichnung	Sequenz
<b>B2MG f</b>	5´ AGC GTC CTC CAA AGA TTC AAG T 3´
<b>B2MG r</b>	5´ GGA TGG AAC CCA TAC ACA TAG CA 3´
<b>B2MG Sonde</b>	5´ Cy5 - CAC CAG AAG ATG GAA AGC CAA ATT ACC TGA A - BBQ-650 3´
<b>HMGCR f</b>	5´ TTG CAC GTC TAC AGA AAC TGC AT 3´
<b>HMGCR r</b>	5´ GAC CTG GAC TGA AAA CGG ATG T 3´
<b>HMGCR Sonde</b>	5´ Cy5 - AGG TTG CGT CCG GCC ACA CTC A - BBQ-650 3´
<b>SQLE f</b>	5´ AAA GGT GAC GGT AAT TGA GAG AGA TT 3´
<b>SQLE r</b>	5´ CCA CCT GGC TGC AGA AAT TC 3´
<b>SQLE Sonde</b>	5´ FAM - CCA AGG ATC CGG TCA GGC TCT T - BHQ-1 3´

Die qRT-PCR wurde in einem MX 3000P Real-Time PCR-System (Stratagene, West Ceddar Creek, USA) nach folgendem Programm durchgeführt: Initiale Denaturierung bei 95°C für 15 min, anschließend 95°C für 30 s und 59°C für 60 s. Diese Schritte wurden 45 mal wiederholt. Die Duplex-PCR (jeweils ein Zielgen zusammen mit dem Referenzgen) wurde für jede Probe als Triplikat durchgeführt. Zusätzlich wurden „non template controls“, also Reaktionsansätze ohne Ausgangs-cDNA, mitgeführt um Verunreinigungen von Reagenzien auszuschließen. Die Effizienz der verwendeten qRT-PCR wurde anhand einer Standardkurve (Messung einer Verdünnungsreihe von cDNA) ausgewertet und lag im Bereich zwischen 95%-105% (Daten nicht dargestellt). Die Spezifität der Amplifikate konnte mithilfe von Gel-Elektrophorese-Untersuchungen bestätigt werden. Die Bildung von Primerdimeren wurde mit einer Sybr-Green-Untersuchung ausgeschlossen. Die Ergebnisse der PCR wurden mittels comparativer  $C_t$ -Methode zur relativen Quantifizierung (Software MxPro-Mx3000, Stratagene) ermittelt. Dabei diente eine Probe einer Kuh aus der CON1-Gruppe als interner Kalibrator. Die Expression wurde schließlich im Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle angegeben. Die Berechnung erfolgte nach der Formel: normalisierte Expression =  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (PFAFFL 2001).

### 3.2.12 Bestimmung von Propylenglycol, Ethanol und Propanol im Blut und Propylenglycol im Futter

Zur Kontrolle der korrekten Einmischung von PG in das Futter wurde der Gehalt an PG in der TMR bestimmt. Weiterhin wurde im Blut der Versuchstiere am Tag 10 pp. die PG-Konzentration bestimmt um eine Aussage zur systemisch verfügbaren PG-Konzentration

treffen zu können. Diese Untersuchung wurde als Dienstleistung im Department of Animal Health, Welfare and Nutrition Research Centre Foulum durch Professor N. B. Kristensen nach der Methode von NEEDHAM et al. (1982) durchgeführt. Die PG-Bestimmung erfolgte mittels HPLC. Weiterhin erfolgten im selben Labor die Bestimmung des potenziellen PG-Metaboliten Propanol sowie die Bestimmung von Ethanol im Serum der Versuchstiere. Diese Untersuchungen erfolgten mittels Headspace Gaschromatographie-Massenspektrometrie (KRISTENSEN et al. 2007).

### **3.2.13 Bestimmung von Sterolen im Serum**

Die Bestimmung von Cholesterin sowie seinen Vorstufen Lanosterol und Desmosterol und zusätzlich die Bestimmung der Phytosterol-Konzentrationen (Brassicasterol, Campesterol, Stigmasterol, Sitosterol) im Blutserum der Kühe erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für Laboratoriumsmedizin der Universität Leipzig. Zur Anwendung kam dabei ein dort entwickeltes Verfahren welches auf Flüssigchromatographie sowie Tandem-Massenspektrometrie basiert. Die Methode ist beschrieben durch LEMBCKE et al. (2005) und hat den Vorteil, dass die o.g. sieben Sterole in einem Arbeitsschritt bestimmt werden können. Zusätzlich zur Cholesterinbestimmung im Serum erfolgte die Bestimmung der Cholesterin- sowie Lanosterol- und Desmosterol-Konzentrationen in der TMR mit demselben Verfahren. Allerdings musste vor der Bestimmung der Sterole die Extraktion der Sterole aus der TMR erfolgen. Dazu wurden 100 mg TS der fein pulverisierten Futterproben in einem Reaktionsgefäß abgewogen und nach Zugabe von 1 ml Isopropanol über Nacht im Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Probe bei 13000 U/min zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß abpipettiert. Anschließend erfolgte eine erneute Zugabe von 1 ml Isopropanol zum Überstand und nach 5 s vortexen wurde erneut bei 13000 U/min zentrifugiert. Der nach diesem Schritt erhaltene Überstand wurde in Autosampler-Vials pipettiert und analog zur Methode der Sterolbestimmung aus Blutproben im selben Gerät und Verfahren analysiert. Die Quantifizierung erfolgte über mitgeführte Analytenstandards analog zur Sterolbestimmung aus Blutproben.

### **3.2.14 Bestimmung der Insulinkonzentration im Serum mittels INS-IRMA**

Die Insulinbestimmung erfolgte in den Räumen des Veterinär-Physiologisch-Chemischen Institutes der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig. Es wurde ein kommerzielles Radioimmunoassay-Testkitsystems (Ins-IRMA, Fa. Biosource, Nivelles, Belgien) verwendet. Abweichend vom Protokoll des Herstellers wurde nicht der mitgelieferte humane Standard verwendet, sondern ein boviner Standard erstellt. Dafür wurden 5,73 mg bovines Insulin in 1 ml Probenpuffer aufgelöst um eine 1 mM Insulinlösung zu erhalten.

## 40 Tiere, Material und Methoden

Diese Stammlösung wurde mit Probenpuffer auf 100 nM eingestellt. Alle weiteren Verdünnungen wurden mit dem, im Kit mitgelieferten, insulinfreien, humanen Serum durchgeführt. Die Standardreihe umfasste folgende Konzentrationen: 4 pM, 12 pM, 37 pM, 111 pM, 333 pM und 1 nM. Zur Durchführung des Tests wurden nach Herstellerangaben 50 µl Standard bzw. Serum in die mitgelieferten, mit Insulinantikörpern beschichteten Teströhrchen pipettiert. Direkt im Anschluss wurden 50 µl des <sup>125</sup>J-markierten Tracers zu der Probe in die Röhrchen sowie in zwei weitere Röhrchen ohne Serum (letztere zur Gesamtaktivitätsbestimmung) pipettiert. Nach zweistündiger Inkubation wurden die Röhrchen dreimal manuell mit der mitgelieferten Waschlösung gewaschen (mit Ausnahme der Gesamtaktivitätsröhrchen). Anschließend wurde die Radioaktivität gemessen. Dazu wurden die Röhrchen 60 s im Gammacounter (Wallace Wizard 1470, Fa. Applied Biosystems, Forster City, USA) ausgewertet. Der Insulingehalt wurde anschließend mithilfe einer Eichkurve durch die Software „Multicalc“ (Wallace Wizard 1470, Fa. Applied Biosystems, Forster City, USA) des Gammacounters berechnet.

### **3.2.15 IGF-1-Bestimmung**

Die Bestimmung des IGF-I im Blutplasma wurde im Veterinär-Physiologisch-Chemischen Institut (Veterinärmedizinische Fakultät Leipzig) mit einem laboreigenen Enzymimmunoassay (EIA) unter Verwendung von biotinyliertem IGF-I durchgeführt. Die Probenvorbereitung erfolgte in Anlehnung der von BLUM und BREIER (1994) bzw. KRATZSCH (1996) beschriebenen Methode. Für den EIA wurden Mikrotiterplatten (Fa. Nunc) verwendet, die mit Anti-Kaninchen-IgG vom Schaf (Zentralinstitut für Ernährungs- und Lebensmittelforschung, Weihenstephan, TU München) beschichtet waren. Die Platte wurde zu Beginn mit Waschlösung (Tween 80, Fa. Serva) gewaschen. Zur Herstellung der Eichreihe diente unmarkiertes humanes IGF-1 (Fa. IBT, Reutlingen). Zu 50 µl verdünntem Probenextrakt bzw. Eichlösung wurden 100 µl 1:400000 verdünnte IGF-1-Antikörperlösung (hormonspezifisches Antiserum, B. H. Breier, Neuseeland) zugesetzt und 4 h bei 4 °C vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 50 µl biotinyliertem IGF-1 (Fa. IBT, Reutlingen) in einer Verdünnung von 1:20000. Nach der Inkubation über Nacht bei 4 °C wurde die Platte mit Tween-Lösung gewaschen. Es erfolgte dann die Zugabe von 200 µl Streptavidin-POD (Fa. SIGMA) und eine einstündige Inkubation bei 4 °C im Kühlschrank. Nach erneutem Waschen der Platte wurden 150 µl Substratlösung (mit Tetramethylbenzidin als Chromogen, Fa. SIGMA) zugesetzt, 45 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend die Farbreaktion durch Zugabe von 50 µl 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gestoppt. Die fotometrische Messung erfolgte im Multilabel-Counter Victor 1420 (Fa. PerkinElmer LAS GmbH, Santa Clara, USA) bei 450 nm, zur Datenauswertung diente die Software "Workout" (Fa. PerkinElmer LAS GmbH, Santa Clara, USA).

### **3.2.16 Bestimmung der antioxidativen Kapazität im Serum**

Die Bestimmung der sogenannten TEAC (Trolox Equivalent Antioxidative Capacity) bietet eine Möglichkeit, einen Überblick über die Funktion des antioxidativen Systems des Körpers zu erlangen, da mit dieser Methode sowohl die wasserlöslichen, als auch die wasserunlöslichen Komponenten des Antioxidativen Systems erfasst werden (VAN DEN BERG et al. 1999). Das Prinzip der Messung beruht darauf, dass durch Antioxidantien im Serum dunkelgrünes ABTS<sup>+</sup> in helles ABTS umgewandelt wird, was mit einer Abnahme der Extinktion einhergeht. Je niedriger die Extinktion, umso höher ist die antioxidative Kapazität. Zur Eichung wird das Antioxidans Trolox eingesetzt, welches als Eichreihe in verschiedenen Konzentrationen gemessen wird. Die Versuchsdurchführung erfolgte in den Räumen des Labores der Medizinischen Tierklinik der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig. Vor Versuchsbeginn wurden die PBS-Pufferlösung (pH 7,4; 5 mM) und die ABTS-Lösung frisch hergestellt (Tabelle 4).

**Tabelle 4.** Rezepte der verwendeten PBS-Pufferlösung und ABTS-Stammlösung

PBS-Puffer-Lösung 5mM, pH 7,4		ABTS-Stammlösung	
Menge	Reagenz	Menge	Reagenz
1,79 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12H <sub>2</sub> O	137,2 mg	2,2`-Azino-bis(3-Ethylbenz-thiazolin-6-sulphonsäure-diammonium Salz (Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim)
0,655 g	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O		
1000 ml	Dest. Wasser		
→pH einstellen auf 7,4		50 ml	PBS-Puffer (pH 7,4; 5 mM)
9 g	NaCl		

Aus der ABTS-Stammlösung musste die ABTS-Gebrauchslösung hergestellt werden. Dazu wurde die hellgrüne ABTS-Stammlösung mittels eines No.5 Filterpapiers (VWR, Darmstadt) über MnO<sub>2</sub> laufen gelassen. Durch den Kontakt zum MnO<sub>2</sub> entstehen ABTS<sup>+</sup> Kationen, was an der dunkelgrünen Farbe der filtrierten Lösung gut zu erkennen ist. Überschüssiges MnO<sub>2</sub> entfernt man mittels eines 0,2 mm Spritzen-Filters (VWR, Darmstadt). Im Anschluss verdünnt man diese ABTS<sup>+</sup>-Lösung mit PBS-Puffer bis bei einer Wellenlänge von 734 nm eine Extinktion von 0,700 ± 0,020 erreicht ist. Als Nullwert-Abgleich dient PBS-Puffer. Diese Stammlösung ist wenige Tage im dunklen Kühlschrank haltbar, muss aber vor jedem Einsatz neu auf die richtige Extinktion eingestellt werden. Die Trolox-Stammlösung (2,5 mM) wurde frisch hergestellt. Dazu wurde 625,7 mg Trolox (Fa. Merck, Darmstadt) in 1 l dest. Wasser gelöst, anschließend in Aliquots eingefroren und täglich frisch aufgetaut zur Herstellung der Eichreihe. Zur Bestimmung der TEAC wurde eine Eichreihe folgender Konzentrationen aus der 2,5 mM Trolox-Stammlösung durch Verdünnen mit PBS-Puffer hergestellt: 1,5 mM, 1,0 mM, 0,75 mM, 0,5 mM, 0,25 mM und 0 mM. Letztere Konzentration entspricht reinem PBS-Puffer. Vor Beginn der Messung am Spektralphotometer (DU 640B, Beckman Coulter,

Krefeld) wurde der Nullwert bei 734 nm mittels PBS-Puffer abgeglichen. Danach erfolgte zuerst die Messung der Eichreihe mittels Doppelbestimmung. Dazu wurden 10 µl des jeweiligen Standards und 990 µl der ABTS<sup>+</sup>-Lösung in eine Mikroküvette pipettiert, kurz gründlich gemischt und in das Gerät eingestellt. Nach exakt 60 Sekunden wurde die Extinktion abgelesen. Auch die Serumproben wurden nach diesem Schema in Doppelbestimmung gemessen. Aus den erhaltenen Extinktionswerten der Standardkonzentrationen wurde am Computer (Programm Excel 2003, Microsoft Cooperation, Redmont, USA) eine lineare Kalibrierkurve erstellt und darüber der Achsenabschnitt und Anstieg abgelesen. Mit dieser Kalibrierkurve wurde sowohl der TAA-Wert (totale antioxidative Aktivität) als auch der TEAC-Wert rechnerisch entsprechend den unten aufgeführten Formeln ermittelt.

$$TAA = \frac{\text{Extinktion (Nullwert)} - \text{Extinktion (Standard)}}{\text{Extinktion (Nullwert)}}$$

$$TEAC = \frac{TAA + \text{Achsenabschnitt}}{\text{Anstieg}}$$

### **3.2.17 Bestimmung der Blutkonzentrationen wichtiger Stoffwechselmetabolite und Enzyme**

Aus dem Blutserum erfolgte durch ein akkreditiertes Labor (Synlab.vet, Berlin) die Bestimmung folgender Parameter: GOT, GPT, GGT, GLDH, Ketonkörper, Triglyceride, BHBA, NEFA, Glucose und Fructosamine. Die Untersuchungen erfolgten mittels Analyseautomaten (Konelab, Thermo scientific, Dreieich) unter Verwendung von Reagenzienkits der Firmen Fa. DPC Biermann, Bad Nauheim (für Glucose, Billirubin, Triglyceride, GOT, GPT, GGT, GLDH), Fa. Wako, Neuss (für Ketonkörper, BHBA und NEFA) sowie von Fa. Roche Diagnostics, Mannheim (Fructosamine).

### 3.2.18 Statistische und grafische Auswertung von Konzentrationen bzw. Aktivitäten von Blutserum bzw. Futtermittelinhaltsstoffen

Zur Statistischen Auswertung wurde das Statistikprogramm SigmaStat® Version 3.5 (Systat Software, Richmond, USA) benutzt. Bei normalverteilten Messwerte und mehr als 2 Versuchsgruppen wurde die Analysis of Variance (ANOVA) durchgeführt, bei lediglich 2 zu untersuchenden Gruppen der t-Test. Bei nicht normalverteilten Messwerten wurde bei mehr als 2 Versuchsgruppen der ANOVA on Ranks, und bei lediglich 2 Versuchsgruppen der Mann-Whitney-Rangsummentest durchgeführt. Für Korrelationen wurden lineare Korrelationskoeffizienten nach Pearson berechnet. Die Berechnung der Fläche unter der Kurve (area under the curve, AUC) als Maß für die Gesamtkonzentration von Cholesterin, Lanosterol und Desmosterol wurde nach der linearen Trapezregel ermittelt.

$$AUC_{0-t_n} = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^{n-1} (t_{i+1} - t_i) (C_i + C_{i+1})$$

Die Berechnung erfolgte mit Hilfe des Programmes SigmaPlot 10.0 (Fa. Jandel Scientific, Software, San Rafael, USA). Abweichungen von diesen Vorgehensweisen wurden ggf. direkt bei der betroffenen Untersuchung beschrieben (siehe 3.2.10). Die verwendeten grafischen Darstellungen wurden mit dem Grafikprogramm SigmaPlot® 10.0 (Fa. Jandel Scientific, Software, San Rafael, USA) erstellt. Normalverteilte Werte sind als Balkendiagramme (Mittelwerte + SEM), nicht-normalverteilte Werte als Boxplot (Median, 25% bis 75% Perzentil als Box, 5% bis 95% Perzentil als Whisker) dargestellt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Analyse von Propylenglycol im Futter

Um sicherzustellen, dass PG ordnungsgemäß in die totale Mischration (TMR) eingemischt, und im vorgelegten Futter auch biologisch stabil war, wurden im Versuchszeitraum einmal pro Woche Proben der TMR vom Futtertisch genommen. Die Proben jeder Gruppe wurden gepoolt und auf ihren PG-Gehalt untersucht. Die Analyse der untersuchten Futterproben ergab für die Ration der Gruppen PGF1 und PGD 16,2 g Propylenglycol pro kg Trockenmasse. Die Ration der Kontrollgruppe wies eine Konzentration von 0,6 g PG pro kg Trockenmasse auf.

### 4.2 Analyse von Propylenglycol, Propanol und Ethanol im Blut

Die PG-Konzentration im Blut der Tiere wurde bestimmt, um festzustellen, ob das verabreichte Propylenglycol tatsächlich aus dem Gastrointestinal-Trakt ins Blut resorbiert wurde. Die Serumkonzentrationen an PG unterschied sich signifikant zwischen den einzelnen Gruppen ( $p < 0,05$ , siehe Tabelle 5). Dabei wiesen die beiden PG-gefütterten Gruppen PGF1 und PGD signifikant höhere PG-Konzentrationen auf als die Kontrollgruppe. Die höchsten PG-Konzentrationen fanden sich im Serum der Tiere der Gruppe PGD. Die Konzentration an Propanol, einem Metaboliten des PG war in der PGD-Gruppe signifikant höher als in der PGF und CON1 Gruppe ( $p < 0,05$ , siehe Tabelle 5).

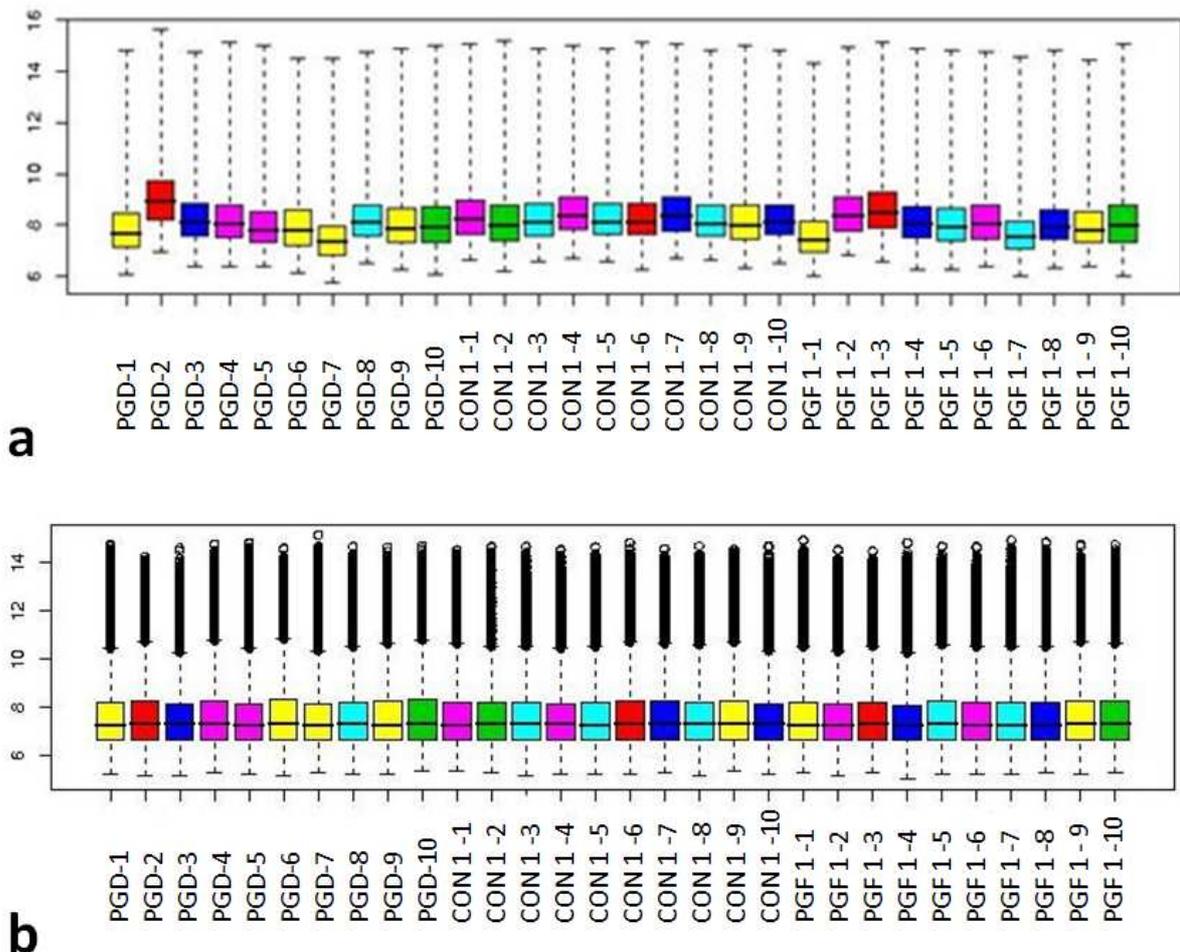
**Tabelle 5.** Propylenglycol und Propanol-Konzentrationen im Serum. Aufgrund fehlender Normalverteilung wurden die Werte als Median inklusive 25% - 75% Perzentil angegeben. Verschiedene Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ),  $n = 10$

	CON1		PGF1		PGD	
	Median	25% - 75%	Median	25% - 75%	Median	25% - 75%
<b>Propylenglycol in <math>\mu\text{mol/l}</math></b>	17,3 <sup>a</sup>	15,5–19,5	35,2 <sup>b</sup>	26,4-59,9	1307 <sup>c</sup>	76,1-2282
<b>Propanol in <math>\mu\text{mol/l}</math></b>	50 <sup>a</sup>	44-53	46 <sup>a</sup>	41-50	135 <sup>b</sup>	54-1290

Kein Unterschied konnte für die Konzentration an Ethanol zwischen den Gruppen nachgewiesen werden. Der Mittelwert der Ethanolkonzentration aller Gruppen lag bei  $834 \pm 33 \mu\text{mol/l}$  ( $n = 30$ ), was umgerechnet etwa 0,038‰ entspricht.

### 4.3 Expressionsanalyse hepatischer Gene mittels Oligonukleotid-Mikroarrays

Vor Beginn der Datenauswertung wurden die Mikroarrays einer statistischen Qualitätskontrolle unterzogen. Der erste Schritt dieser Qualitätskontrolle geht davon aus, dass vergleichbar gut prozessierte Mikroarrays sich in der Verteilung der Expressionswerte über alle Gene nur geringfügig unterscheiden

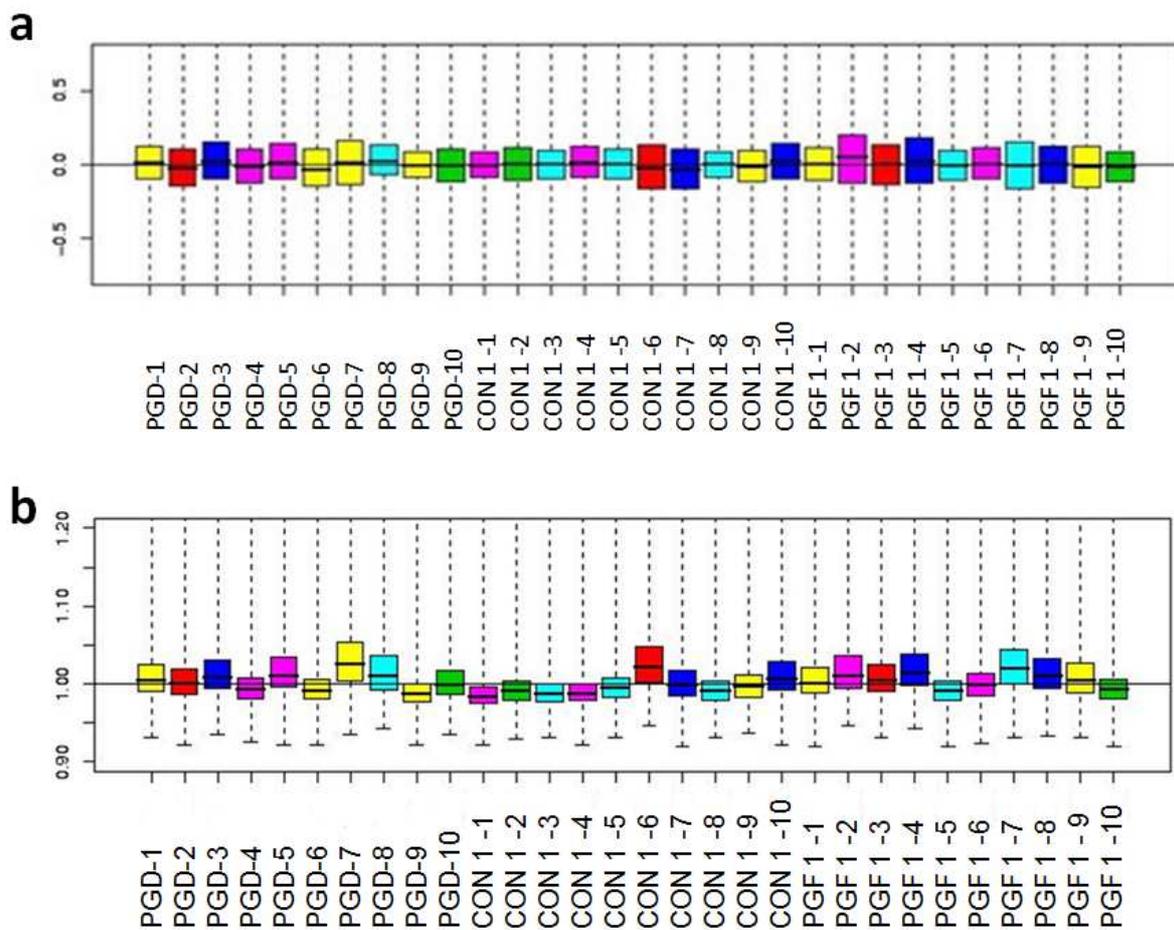


**Abbildung 9 a-b.** Darstellung der Expressions-Rohdaten (a) und der normalisierten Expressionsdaten (b) als Boxplot. Auf der X-Achse steht jede Buchstaben-Zahlen-Kombination für den Mikroarray eines Tieres. Die Y-Achse gibt die Streuung aller logarithmierten Expressionswerte an. Die Begrenzung der Box gibt den Bereich an in dem sich 50% der gemessenen Expressionswerte befinden. Der schwarze Strich innerhalb der Box ist der Median, die Whisker erstrecken sich vom 5% bis zum 95% Perzentil. Ausreißer sind als (sich überlagernde) Punkte oberhalb des 95% Perzentils dargestellt. Gleiche Farben kennzeichnen Mikroarrays die an ein und demselben Tag prozessiert wurden.

Die Abbildung 9 zeigt, dass die statistische Verteilung der Expressionsdaten bereits für die Rohdaten der einzelnen Mikroarrays größtenteils im selben Bereich lag, was für eine sehr gute Reproduzierbarkeit bei der Array-Verarbeitung spricht. Die an verschiedenen Tagen

verarbeiteten Arrays hatten alle vergleichbare Medianwerte und vergleichbare Streuungen der Rohdaten. Nach der varianzstabilisierten Normalisierung nach HUBER et al. (2002) verkleinerte sich der Unterschied in den durchschnittlichen Expressionswerten auf vernachlässigbare Werte. Die Medianwerte lagen nach der Normalisierung sehr eng beieinander.

Damit waren die Mikroarraydaten für alle GeneChips von guter und vergleichbarer Qualität und konnten zur Untersuchung auf Expressionsunterschiede herangezogen werden.



**Abbildung 10 a-b.** Boxplot-Diagramm zur Darstellung der relativen logarithmischen Expression (a) sowie des normalisierten Standardfehlers (b). Auf der X-Achse steht jede Buchstaben-Zahlen-Kombination für den Mikroarray eines Tieres. Die Y-Achse gibt in (a) den logarithmierten durchschnittlichen Expressionswert für alle Gene an. In (b) gibt die y-Achse den normalisierten Standardfehler wieder. Die Begrenzung der Box gibt den Bereich an in dem sich jeweils 50% aller gemessenen Expressionswerte befinden. Der schwarze Strich innerhalb der Box kennzeichnet den Median. Zur besseren Übersicht ist nicht der gesamte Streubereich der Daten (Whisker) dargestellt.

In einem weiteren Schritt wurde die Qualität der Mikroarrays unter Zuhilfenahme eines speziell an die Affymetrix-Plattform angepassten Probe-Levels-Modells analysiert. Dieses Modell erlaubt sowohl den Vergleich der Expressionswerte zwischen einzelnen Arrays als auch eine Analyse der relativen Schätzgenauigkeit (Residuals) bei der Ermittlung der Expressionswerte. Der RLE-Wert (Relative logarithmische Expression) ist in Abbildungen 10 a dargestellt. Dabei wurde der Expressionswert jedes Gens auf dem Mikroarray mit dem Medianwert dieses Gens über alle Mikroarrays verglichen. Da angenommen wird, dass der größte Teil der Gene nicht differentiell exprimiert ist, sollte der Median im Idealfall den Wert Null annehmen. Ein Mikroarray mit einem Median oberhalb von Null, liegt in seinen Expressionswerten für alle Gene leicht über dem Durchschnitt, während ein Mikroarray mit einem Median unterhalb von Null insgesamt eher zu geringe Expressionswerte aufweist. Deutliche Abweichungen von Null könnten auf eine gleichsinnige Herauf- oder Herabregulation vieler bzw. großer Gengruppen hindeuten, sind aber in der Mehrzahl der Fälle Ausdruck von Hybridisierungseffekten im Sinne einer „Über- bzw. Unterbelichtung“ des entsprechenden Arrays, d.h. ein Qualitätsmangel. Wie Abbildung 10 a zeigt schwankte die RLE in der vorliegenden Studie nur sehr gering um den Wert Null.

Die Analyse der Schätzgenauigkeit der einzelnen Expressionswerte erfolgte mittels NUSE („normalised unscaled standard error“, Abbildung 10 b). Hierbei wird berücksichtigt, dass jeder einzelne Expressionswert mittels 11 verschiedener Probe pairs ermittelt wird (siehe Kap. 3.3.4), die wiederum in mehreren Kopien an verschiedenen Stellen des Arrays aufgebracht sind. Je geringer die Streuung der Einzelwerte um den letztendlich ausgegebenen Expressionswert ist, umso besser sind die Qualität der verwendeten RNA und die Qualität der Arrayverarbeitung einzuschätzen. Beim NUSE Verfahren wird zunächst der SE jedes einzelnen Gens bestimmt und über alle Arrays auf 1 normalisiert. Die Verteilung dieser durch Normalisierung vergleichbar gemachten SE wird dann für alle Gene jedes einzelnen Arrays in einem Boxplot dargestellt (Abbildung 10 b). Liegt der Medianwert eines Arrays in diesem Boxplot deutlich über 1 weist dies auf eine generell starke Streuung der Einzelwerte bei der Bestimmung der Expressionswerte hin, und somit auf eine schlechte Qualität dieses Arrays. Wie in Abbildung 10 b dargestellt, lagen die Medianwerte der NUSE in den eigenen Untersuchungen sehr nahe bei 1, was die Qualität und Zuverlässigkeit der ausgegebenen Experimente unterstreicht. Insgesamt erfüllten alle 30 Mikroarrays die geforderten Qualitätskriterien.

#### **4.4 Expressionsanalyse stoffwechselrelevanter Gengruppen**

Anhand von Literaturdaten (vgl. Kap. 2.5) wurden folgende Stoffwechselwege als möglicherweise durch PG beeinflusst herausgearbeitet: Glucosestoffwechsel, Ketonkörperstoffwechsel, Fettstoffwechsel, Citratzyclus, Insulin und insulinassoziierte

Stoffwechselwege, Phosphoinositol-3-Kinase und Abbauwege für PG und Propanol. Die Zuordnung der auf dem Affymetrix-Mikroarray befindlichen und in die gruppenweise Auswertung einbezogenen Gene in die Stoffwechselwege ist in Anlage 2 ausführlich aufgelistet. Mit dem in Kap. 3.2.10 beschriebenen statistischen Verfahren wurde im Folgenden getestet, ob einzelne Stoffwechselwege unter Berücksichtigung aller beteiligten Gene als differentiell exprimiert angesehen werden können. Als Kriterium einer signifikanten differentiellen Expression eines Stoffwechselweges wurde eine False-Discovery-Rate (FDR) von  $< 0,1$  sowie ein p-Wert von  $< 0,05$  festgelegt. Unter diesen Bedingungen war im vorliegenden Versuch nur der Stoffwechselweg der Cholesterinsynthese signifikant differentiell reguliert. Gene dieses Stoffwechselweges waren summarisch bei Tieren der PGD Gruppe signifikant höher exprimiert als bei Tieren der Kontrollgruppe. Die FDR betrug 0,057 bei einem p-Wert von 0,0034. Bei den Tieren der PGF1 Gruppe zeigte sich eine Tendenz zur höheren Expression von Genen der Cholesterinsynthese mit einer FDR von 0,16 und einem p-Wert von 0,0095. Die Gengruppe der Cholesterinsynthese war auf dem verwendeten Affymetrix-GeneChip durch 19 Einzelgene repräsentiert (siehe Anhang 2). Vier dieser 19 Gene waren auf allen Mikroarrays unterhalb der Detektionsgrenze (sog. „Absent Call“) bzw. unter den 20% der Gene die aufgrund zu geringer Expressionsunterschiede im Vorfeld ausgeschlossen wurden (siehe Kap. 3.3.7) und wurden somit statistisch nicht berücksichtigt. Alle weiteren getesteten Gruppen von Genen mit möglicher Relevanz für den PG-Stoffwechsel (Liste in Tabelle 2) zeigten keine Tendenz einer gruppenweisen Expressionsänderung und wiesen alle eine FDR  $> 0,3$  (Gluconeogenese) bzw.  $> 0,4$  auf (sonstige Stoffwechselwege, Einzeldaten nicht gezeigt).

### **4.5 Analyse differentiell exprimierter Einzelgene**

Im Ergebnis einer globalen Analyse der Expression aller Gene des Mikroarrays (siehe Kap. 3.2.10) erfüllten insgesamt 74 Einzelgene in beiden Versuchsgruppen die Kriterien für eine differentielle Expression, d.h. sie waren in beiden Versuchsgruppen gegenüber der Kontrollgruppe differentiell reguliert, wobei jeweils mindestens ein p-Wert von 0,1 und ein logarithmierter Fold Change von  $>0,2$  bzw.  $<-0,2$  vorlag. Diese 74 Genen sind im Anhang 3 aufgelistet. Keines der 74 differentiell exprimierten Gene weist Signifikanzwerte von  $p < 0,05$  auf. Bei einem p-Wert von  $< 0,05$  welcher oft als Kriterium für Signifikanz angenommen wird, nimmt man in Kauf, dass 5% der Gene falsch positiv als differentiell exprimiert ermittelt werden. Bei einer Gesamtzahl von etwa 23.000 getesteten Genen entspräche das 1150 Genen. Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass alle 74 Gene lediglich zufällig als differentiell exprimiert erkannt wurden. Bei der Zuordnung der 74 differentiell exprimierten Gene zu Gruppen (Liste im Anhang 3) fiel jedoch auf, dass insgesamt wenig Gene enthalten waren, die für Enzyme der Hauptnährstoff-Stoffwechselwege kodieren. Innerhalb dieser

stoffwechselrelevanten Gene waren Gene der Cholesterin-Synthese aber überdurchschnittlich häufig repräsentiert (siehe Tabelle 6). Die Gene des Cholesterinsynthese-Stoffwechselweges waren darüber hinaus alle gleichsinnig durch PG heraufreguliert. Die überdurchschnittliche Häufung der Gene der Cholesterinsynthese unterstützt somit das Ergebnis der Expressionsanalyse der Gengruppen (Kap. 4.4).

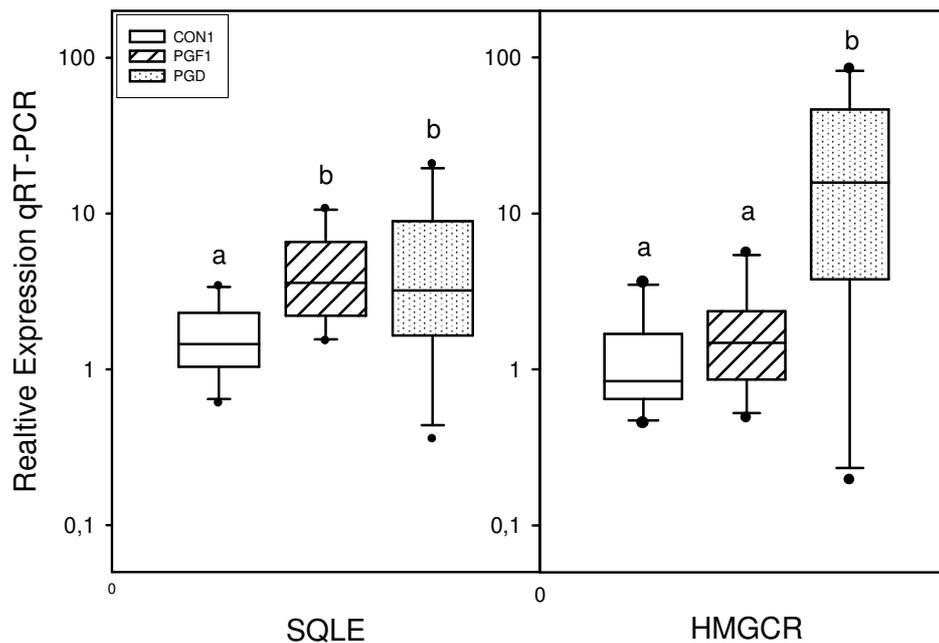
**Tabelle 6.** Durch PG beeinflusste Gene kodierend für Enzyme der Cholesterin-Synthese.

Affymetrix-Annotation	Genbank Ident.-Nr.	Abkürzung	Bezeichnung	Trend	logFC <sup>1</sup> PGF1	logFC <sup>1</sup> PGD
Bt.22763.2.S1_a_at	CK976192	HMGCS1	β-Hydroxy-Methylglutaryl-Coenzyme A-Synthase 1	↑ durch PG	0,77	0,61
Bt.11465.1.S1_at	AU276294	HMGCR	β-Hydroxy-Methylglutaryl-Coenzyme A-Reduktase	↑ durch PG	0,67	0,52
Bt.3764.1.S1_at	CK958906	MGC139111	Similar to Isopentenyl-Diphosphate-Isomerase	↑ durch PG	0,55	0,37
Bt.23182.1.S1_at	NM_177497.2	FDPS	Farnesyl-Diphosphate-Synthase	↑ durch PG	0,50	0,42
Bt.9767.1.S1_a_at	CK949309	SQLE	Squalene-Monooxygenase	↑ durch PG	0,84	0,48
Bt.621.1.S1_at	CK961820	CYP51	Lanosterol-14-Demethylase P450	↑ durch PG	0,69	0,45
Bt.5449.1.S1_at	BF776610	DHCR7	7-Dehydro-Cholesterol-Reduktase	↑ durch PG	0,67	0,43

<sup>1</sup> logFC = logarithmierter Fold Change

## 4.6 Validierung der Mikroarray-Ergebnisse mittels quantitativer Real-time-PCR

Die Mikroarray-Technologie ist eine Methode, bei der in einem Schritt sehr viele Gene parallel untersucht werden können. Die verwendete Affymetrix-Plattform weist dabei eine sehr gute Sensitivität, Spezifität und Reproduzierbarkeit auf. Angesichts der hohen Anzahl an Gensonden auf einem Array ist es jedoch prinzipiell möglich, dass im Einzelfall ein falsches Gen durch eine bestimmte Gensonde detektiert wird, z.B. durch unspezifische Hybridisierung oder falsche bzw. veraltete Annotation dieses Genes. Wie in Kap 3.2.10 dargestellt, wurden die Gene der ausgewählten Stoffwechselwege sowie die 74 in beiden Versuchsgruppen differentiell exprimierten Gene auf ihre Annotation hin geprüft, so dass zumindest diesbezüglich die Fehlerwahrscheinlichkeit als relativ gering betrachtet werden kann. Um weitere Fehler auszuschließen kann man stichprobenartig die Expression interessierender Einzelgene mit einem unabhängigen, Einzelgen-spezifischen Verfahren nochmals überprüfen. Für derartige Validierungen wird standardmäßig die quantitative Real-time PCR (qRT-PCR) verwendet. In der vorliegenden Studie wurden zwei Schlüsselgene der Cholesterinbiosynthese, die Squalen-Monooxygenase (SQLE) und die  $\beta$ -Hydroxy-Methylglutaryl-CoenzymA-Reduktase (HMGCR), welche zuvor im Mikroarray als differentiell exprimiert erkannt worden waren (siehe Tabelle 6), vergleichend mittels qRT-PCR auf Expressionsunterschiede untersucht. Der Vergleich mit der Kontrollgruppe zeigte, dass hepatische mRNA für HMGCR in der PGF1-Gruppe tendenziell ( $p = 0,14$ ) und in der PGD-Gruppe signifikant ( $p < 0,01$ ) mehr vorhanden war (siehe Abbildung 11). Messenger-RNA für SQLE war sowohl in der PGF1-Gruppe als auch in der PGD-Gruppe signifikant ( $p < 0,05$ ) höher exprimiert als in der Kontrollgruppe (CON1). Diese Ergebnisse bestätigen somit die nachgewiesenen Expressionsänderungen der Mikroarray-Untersuchung (Kapitel 4.4 und 4.5).



**Abbildung 11.** Boxplotdarstellung der relativen Expression ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) für SQLE und HMGCR im Ergebnis der qRT-PCR. Die relative Genexpression wurde mittels  $\beta 2$ -Mikroglobulin-Expression normalisiert und auf ein Tier der Kontrollgruppe kalibriert. Die Begrenzung der Box gibt den Bereich an, in dem sich jeweils 50% der gemessenen Expressionswerte befinden. Der schwarze Strich innerhalb der Box kennzeichnet den Median, die Whisker kennzeichnen den Bereich in dem sich 10% bzw. 90% der Expressionsdaten befinden. Tag 10 pp, n=10, unterschiedliche Buchstaben innerhalb eines Graphen kennzeichnen signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ).

#### 4.7 Korrelation zwischen Mikroarray- und PCR-Ergebnissen

Mittels Korrelationsanalyse nach Pearson wurden die Expressionswerte aller 30 Tiere aus der qRT-PCR mit den normalisierten Genexpressionswerten aus der Mikroarray-Untersuchung korreliert. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Tabelle 7 dargestellt. Die mit unterschiedlichen Methoden (Mikroarray und PCR) ermittelten Expressionswerte für SQLE sowie HMGCR korrelierten jeweils signifikant miteinander ( $p < 0,01$ ), was auf eine übereinstimmende Ergebnisproduktion beider Methoden hindeutet. Zusätzlich trat eine Korrelation der Expressionswerte der beiden untersuchten Gene der Cholesterin-Synthese auf ( $p < 0,05$ ), was ein Hinweis für eine koordinierte Regulation beider Gene durch einen gemeinschaftlichen Signalweg sein könnte.

**Tabelle 7.** Übersicht über die Korrelation der Expression zwischen Mikroarray und qRT-PCR-Ergebnissen.

	<b>SQLE qRT-PCR</b>	<b>HMGCR qRT-PCR</b>	<b>HMGCR Mikroarray</b>	<b>B2MG Mikroarray</b>
<b>SQLE Mikroarray</b>	0,47 ( $< 0,01$ )	0,42 (0,02)	0,89 (0,02)	-0,03 (0,86)
<b>HMGCR Mikroarray</b>	0,59 ( $< 0,01$ )	0,54 ( $< 0,01$ )		-0,11 (0,53)
<b>SQLE qRT-PCR</b>		0,68 ( $< 0,01$ )		-0,27 (0,14)
<b>HMGCR qRT-PCR</b>				-0,03 (0,83)

Der obere Wert in der Tabelle gibt den Korrelationskoeffizienten an, der Wert in Klammern ist der p-Wert,  $n = 30$ .

Eindeutig nicht korreliert waren die Expressionswerte der ausgewählten Gene mit dem Referenzgen B2MG. Weder die mittels PCR, noch die mittels Mikroarray ermittelten Expressionswerte standen in Beziehung zur Expression des Referenzgens. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass die oben dargestellten Korrelationen lediglich auf gemeinsamen Bearbeitungseffekten beruhen. Potenzielle Bearbeitungseffekte würden sich auch auf die Expressionswerte von B2MG auswirken, was in dieser Untersuchung nicht beobachtet werden konnte.

#### **4.8 Korrelation zwischen Genexpression und Propylenglycol- sowie Propanol-Konzentration im Blutserum.**

In der Mikroarrayuntersuchung war der Stoffwechselweg Cholesterin-Synthese als Gengruppe signifikant differentiell exprimiert. Die zwei Schlüsselenzyme der Cholesterin-Synthese (SQLE und HMGCR) welche zur Validierung der Mikroarrayergebnisse mittels qRT-PCR herangezogen worden waren, wurden ausgewählt, um eine mögliche Dosis-Abhängigkeit bei der Hochregulierung der Cholesterin-Synthese zu untersuchen. Dazu wurde die PG- und die Propanol-Konzentration im Serum mit den normalisierten Expressionswerten für die ausgewählten Gene korreliert (siehe Tabelle 8).

**Tabelle 8.** Übersicht über die Korrelation zwischen Serum-Konzentrationen an PG und Propanol und den ermittelten Expressionswerte für SQLE, HMGCR und B2MG.

	<b>Propanol Serum</b>	<b>SQLE Mikroarray</b>	<b>HMGCR Mikroarray</b>	<b>SQLE qRT-PCR</b>	<b>HMGCR qRT-PCR</b>	<b>B2MG Mikroarray</b>
<b>PG Serum</b>	0,89 ( $< 0,01$ )	0,33 (0,07)	0,42 (0,02)	0,21 (0,25)	0,65 ( $< 0,01$ )	0,06 (0,73)
<b>Propanol Serum</b>	-	0,37 (0,04)	0,45 (0,01)	0,25 (0,16)	0,76 ( $< 0,01$ )	0,14 (0,45)

Der obere Wert in der Tabelle gibt den Korrelationskoeffizienten an, der Wert in Klammern ist der p-Wert,  $n = 30$ .

Die Höhe des PG-Serumspiegels korrelierte signifikant ( $p < 0,05$ ) sowohl mit den mittels qRT-PCR-Methode als auch mit den mittels Mikroarray-Methode ermittelten Expressionswerten für HMGCR. Eine tendenzielle Korrelation bestand zwischen Höhe der PG-Spiegels und den mit beiden Methoden ermittelten Expressionswerten für SQLE. Die Konzentration an Propanol im Serum korrelierte in vergleichbarer Weise mit den in beiden Methoden ermittelten Expressionswerten für HMGCR und SQLE. Letzteres ist nicht verwunderlich, da die Konzentrationen beider Stoffe (PG und Propanol) selbst eine signifikante Korrelation ( $p < 0,01$ ) aufwiesen. Die Konzentrationen von PG und Propanol korrelierten nicht mit den Expressionswerten des Referenzgens B2MG.

## 4.9 Stoffwechselwerte und Milchleistung

In den Blutproben vom Zeitpunkt der Leberbiopsie (Tag 10 pp.) wurden auch allgemeine Stoffwechselmetaboliten sowie Leberenzyme bestimmt. Die Stoffwechselmetaboliten, die eine Normalverteilung aufwiesen sind in Tabelle 9 aufgelistet, Stoffwechselmetaboliten ohne Normalverteilung sind in Tabelle 10 dargestellt. Insgesamt unterschieden sich die Gruppen in keinem der hier untersuchten Werte signifikant.

**Tabelle 9.** Normalverteilte Laborwerte mit Angabe von Mittelwert und SEM (d 10 pp., n = 10)

Parameter	Einheit	CON1		PGF1		PGD	
		Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM
<b>Triglyzeride</b>	mmol/l	0,099	0,012	0,128	0,013	0,138	0,008
<b>NEFA</b>	mmol/l	0,809	0,144	0,824	0,150	0,670	0,102
<b>Glucose</b>	mmol/l	3,11	0,17	2,67	0,17	3,09	0,10
<b>GGT</b>	µkat/l	0,472	0,032	0,523	0,030	0,559	0,067
<b>GOT</b>	µkat/l	1,96	0,14	2,16	0,299	2,20	0,401
<b>Fruktosamine</b>	µmol/l	227	13	241	19	288	20
<b>IGF-1</b>	ng/ml	118	19	122	21	119	26
<b>Billirubin</b>	µmol/l	8,66	1,25	9,00	1,68	7,02	1,02

Lediglich die Konzentrationen an Triglyzeriden ( $p = 0,06$ ) und Fruktosaminen ( $p = 0,06$ ) waren im Serum in der Kontrollgruppe tendenziell niedriger als in den beiden PG-gefütterten Gruppen.

**Tabelle 10.** Nicht normalverteilte Laborwerte mit Angabe von Median und 25% bzw. 75% Perzentil (d 10 pp., n = 10)

Parameter	Einheit	CON1		PGF1		PGD	
		Median	25%-75%	Median	25%-75%	Median	25%-75%
<b>Ketonkörper</b>	µmol/l	688	461-898	866	672-2064	564	407-970
<b>BHBA</b>	µmol/l	668	548-886	801	539-1883	563	400-897
<b>GLDH</b>	nkat/l	440	240-750	560	185-662	515	240-1330
<b>GPT</b>	µkat/l	0,41	0,40-0,45	0,50	0,44-0,52	0,49	0,41-0,63
<b>Insulin</b>	pmol/l	48,8	37,5-70,4	32,5	22,9-49,4	36,8	30,6-86,3
<b>TEAC</b>	µmol/l	344	330-362	347	343-365	360	332-369

Die Milchleistung der Versuchstiere unterschied sich nicht zwischen den Versuchsgruppen und lag auf einem hohen Niveau mit durchschnittlichen Tagesleistungen von 37 bis 40 Litern (Tabelle 11). Die Milchleistung zum Biopsiezeitpunkt errechnet sich als Mittelwert aus der

Milchleistung am Tag der Biopsie sowie dem vorangegangenen und dem auf den Biopsietag folgenden Tag. Die 100-Tageleistung konnte nur von jeweils neun Tieren jeder Gruppe erhoben werden da je 1 Tier aus jeder Gruppe zu einem späteren Zeitpunkt aus Krankheitsgründen den Untersuchungsbetrieb verließ. Die 200-Tageleistung wurde aus den Milchleistungen von neun Tieren (CON1), acht Tieren (PGF1) und sieben Tieren (PGD) errechnet. In den Gruppen PGF1 und PGD wurden zusätzlich zu dem jeweils aus Krankheitsgründen ausgeschiedenen Versuchstier jeweils 1 bzw. 2 weitere Versuchstiere vor Erreichen des 200 Tagezeitraumes trockengestellt. Auch bezüglich der 100- bzw. 200 Tageleistung gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen (Tabelle 11).

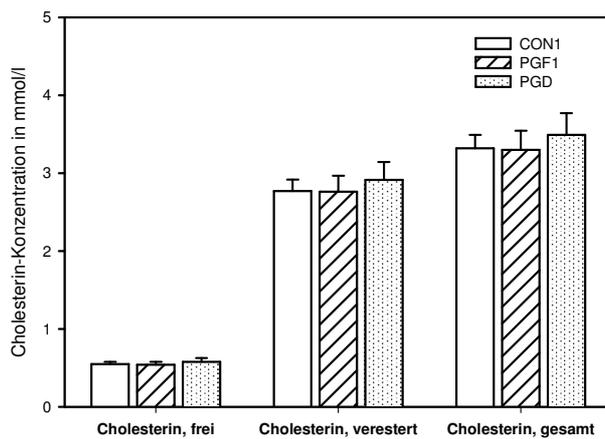
**Tabelle 11.** Milchleistungsdaten der Versuchstiere zum Biopsiezeitpunkt (jeweils n = 10) sowie die 100- (jeweils n = 9) und 200-Tageleistung (CON1: n = 9; PGF1: n = 8; PGFD: n = 7) Angaben als MW + SEM.

	<b>CON1</b>	<b>PGF1</b>	<b>PGD</b>
<b>Milchleistung zum Biopsiezeitpunkt</b> in l	39,8 ± 1,2	39,4 ± 3,0	37,2 ± 1,6
<b>100 Tageleistung</b> in l	4337 ± 197	4529 ± 182	4482 ± 219
<b>200 Tageleistung</b> in l	7897 ± 395	8187 ± 477	8090 ± 371

## 4.10 Konzentration von Sterolen im Blutserum und Futter

### 4.10.1 Cholesterin-Konzentration im Blut zum Biopsiezeitpunkt

Um zu untersuchen, ob die vermehrte mRNA-Expression von Cholesterin-synthetisierenden Enzymen auch im Blut messbare biologische Effekte erzielte, wurde die Cholesterin-Konzentration im Blutserum untersucht. Die am Tag der Leberbiopsie gewonnenen Blutproben (Tag 10 pp.) zeigten jedoch wie in Abbildung 12 dargestellt keine signifikanten Unterschiede in den Konzentrationen an freiem, verestertem und Gesamtcholesterin zwischen den Gruppen.



**Abbildung 12.** Fehlerbalkendiagramm der Cholesterinkonzentration im Serum am Tag der Biopsie (d 10 pp., n = 10)

#### 4.10.2 Cholesterin und Cholesterin-Vorstufen im Zeitverlauf

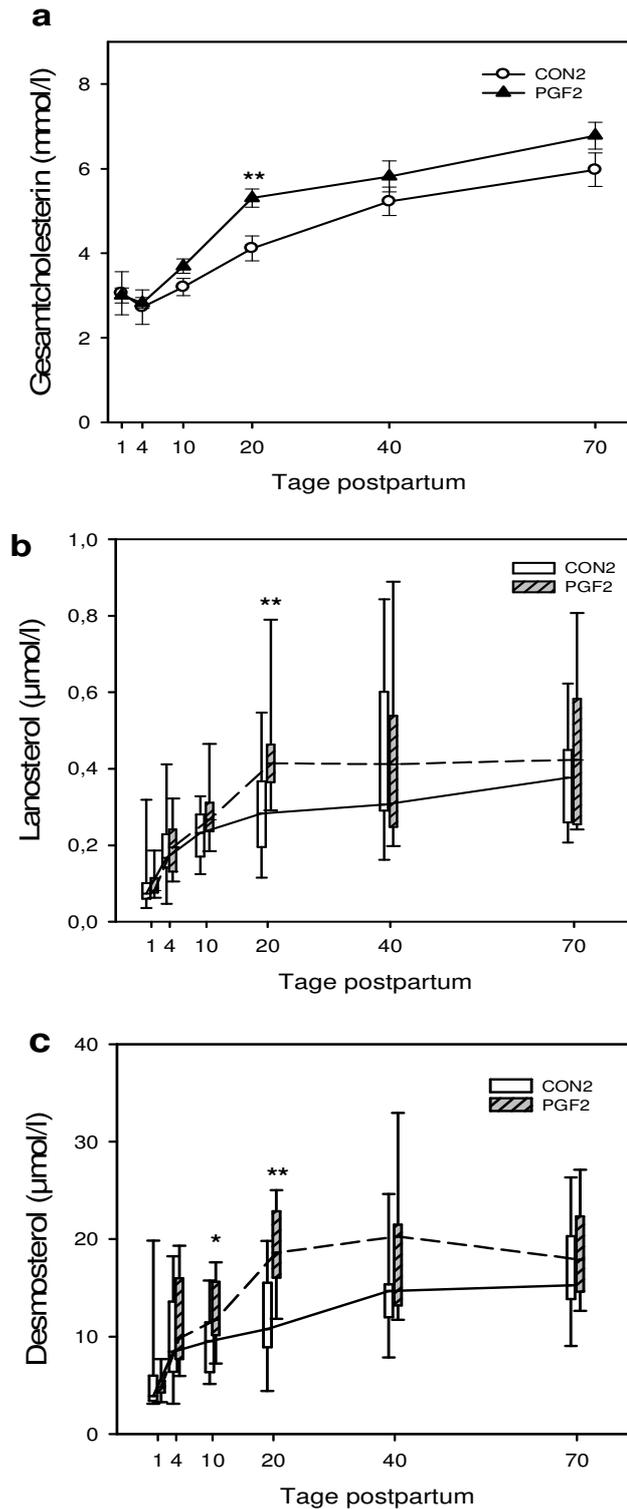
Im ersten Versuchsteil standen Brutproben für die Bestimmung der Cholesterin-Konzentration nur vom Tag der Biopsie zur Verfügung. Da biologische Effekte nach Änderung der Genexpression häufig erst verzögert nachweisbar sind, wurde in einem zweiten Versuchsteil eine weitere Stichprobe aus derselben Herde verwendet (siehe Kapitel 3.2) und im Zeitverlauf über 70 Tage nach der Abkalbung untersucht. Innerhalb dieser Periode wurde PG an den Tagen 1 - 40 dem Futter der PGF2-Gruppe zugemischt. Gedrenchte Tiere standen innerhalb dieser Stichprobe nicht zur Verfügung.

Die Cholesterin-Konzentration war zum Zeitpunkt der Abkalbung bis 4 Tage nach der Abkalbung in beiden Gruppen am niedrigsten. Im Zeitverlauf von der Geburt bis 70 Tage pp. konnte ein signifikanter Anstieg ( $p < 0,01$ ) der Cholesterin-Konzentrationen sowohl in der CON2-Gruppe als auch in der PGF2-Gruppe beobachtet werden (Abbildung 13 a). Trotzdem die Cholesterin-Konzentrationen in beiden Gruppen anstiegen, war der Anstieg in der PGF2-Gruppe stärker als in der CON2-Gruppe. Ab Tag 20 pp. war die Cholesterin-Konzentration in der PGF2-Gruppe signifikant höher als in der CON2-Gruppe ( $4,1 \pm 0,3$  mmol/l in der PGF2-Gruppe vs.  $5,3 \pm 0,2$  mmol/l in der CON2-Gruppe,  $p < 0,01$ ). Der Trend zu höheren Cholesterin-Konzentrationen in der PGF2-Gruppe blieb über den gesamten Untersuchungszeitraum (70 Tage pp.) bestehen. Die Untersuchung der Serumkonzentrationen an Lanosterol und Desmosterol zeigten einen ähnlichen Verlauf wie die Cholesterin-Serumkonzentrationen (siehe Abbildung 13 b und c). Auch die Serumkonzentrationen von Lanosterol und Desmosterol stiegen vom Zeitpunkt der Abkalbung bis zum Ende des Untersuchungszeitraumes stetig und signifikant ( $p < 0,01$ ) an. Für beide Vorstufen konnten genau wie beim Cholesterin am Tag 20 pp. signifikant ( $p < 0,01$ ) höhere Konzentrationen in der PGF2-Gruppe im Vergleich zur CON2-Gruppe gemessen werden. Für Desmosterol waren

bereits ab dem Tag 10 pp. bis zum Tag 40 pp. signifikant ( $p < 0,05$ ) höhere Konzentrationen in der PGF2-Gruppe nachweisbar. Die Gesamtkonzentration von Cholesterin, Lanosterol sowie Desmosterol im Serum (Area under the curve, AUC) waren über die gesamten 40 Tage der PG-Supplementierung pp. signifikant höher im Serum der Tiere in der PGF2-Gruppe im Vergleich zu den Tieren der CON2-Gruppe ( $p < 0,05$ ).

**Tabelle 12** Area under the curve (AUC) für Cholesterin, Lanosterol und Desmosterol im Serum von Tag 1 bis 40 pp. Verschiedene Buchstaben innerhalb einer Reihe kennzeichnen signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ;  $n = 15$ ).

	CON2		PGF2	
	Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM
Cholesterin in mmol/l x d	1581 <sup>a</sup>	97	1868 <sup>b</sup>	78
Desmosterol in $\mu\text{mol/l} \times \text{d}$	451 <sup>a</sup>	41	638 <sup>b</sup>	41
	Median	25 % -75%	Median	25%-75%
Lanosterol in $\mu\text{mol/l} \times \text{d}$	9,9 <sup>a</sup>	8,6-13,9	14,2 <sup>b</sup>	12,4-15,1



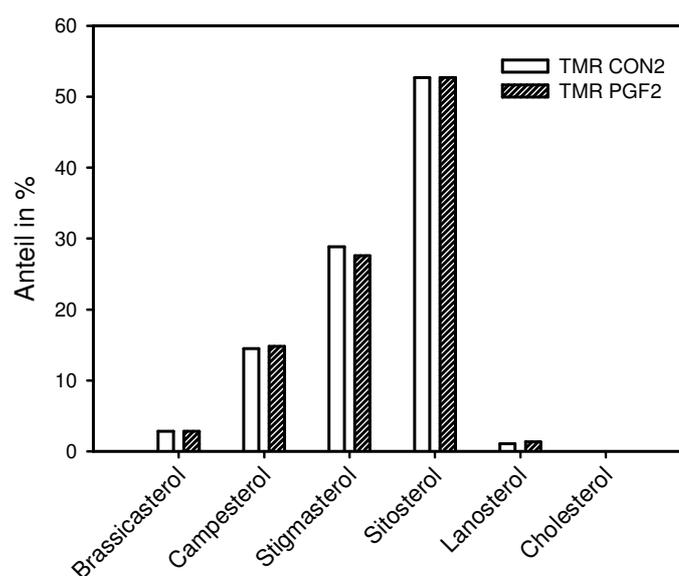
**Abbildung 13 a-c.** Konzentration von Cholesterin (a), Lanosterol (b) und Desmosterol (c) im Blutserum im Zeitraum von der Abkalbung bis 70 Tage postpartum. Cholesterol-Konzentration dargestellt als MW  $\pm$  SEM; Lanosterol- und Desmosterol-Konzentrationen dargestellt als Boxplot (Median mit 25% - 75% Perzentil, Whiskers vom 10% - 90% Perzentil). Die Konzentrationen sind dargestellt für den Zeitraum von der Abkalbung (Tag 0) bis 70 Tage pp. Die mit einem \* ( $p > 0,05$ ) oder \*\* ( $p > 0,01$ ) gekennzeichneten Konzentrationen unterscheiden sich signifikant zwischen den Gruppen. Die PGF2-Gruppe erhielt 300 g PG je Tier und Tag von Tag 1 bis Tag 40 pp. Jede Gruppe umfasste 15 Tiere.

#### 4.10.3 Gehalt an Cholesterol und weiteren Sterolen in der Totalen Mischration

Zur Klärung der Herkunft des im Serum nachgewiesenen Cholesterols (siehe Kap 4.10.2) wurden die Gehalte an Cholesterol sowie weiteren Sterolen in der eingesetzten TMR untersucht. Dazu wurden Futterproben der Ration der CON2-Gruppe sowie der Ration der PGF2-Gruppe als jeweils ein Pool untersucht. Beide TMR wiesen eine identische Sterolzusammensetzung auf, wobei Sitosterol die höchsten Konzentrationen in der Ration zeigte, gefolgt von Stigmasterol, Campesterol und Brassicasterol (siehe Tabelle 13). Cholesterol war in keiner der beiden untersuchten Rationen nachweisbar. Lediglich Lanosterol war in sehr geringen Mengen in der Rinderration enthalten. Die relativen Anteile der Phytosterole sind in Abbildung 14 dargestellt.

**Tabelle 13.** Konzentrationen der untersuchten Sterole in den Futterrationen der CON2- und PGF2-Gruppe. Die Futterproben wurden zu verschiedenen Zeitpunkten gewonnen und als eine Poolprobe je Gruppe jeweils einmal untersucht. Die Rationen der beiden Gruppen zeigen sehr ähnliche Sterolgehalte.

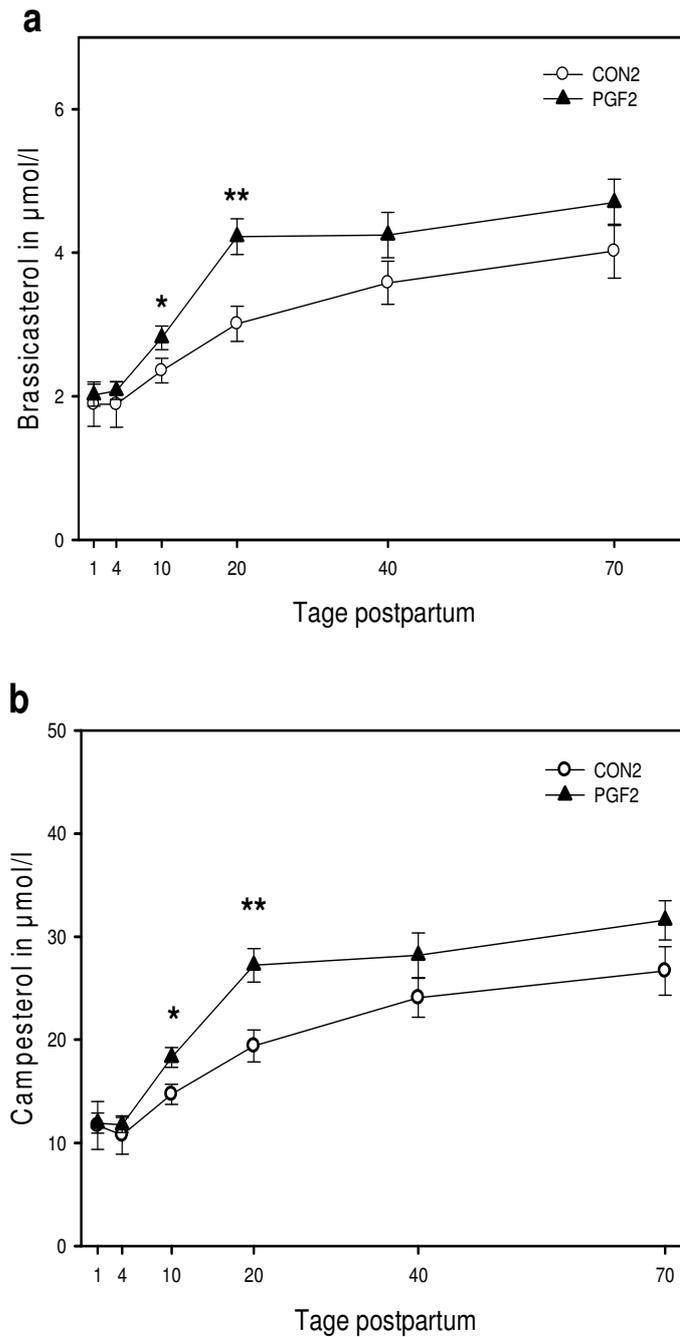
	Konzentration in mg / kg TS					
	Brassicasterol	Campesterol	Stigmasterol	Sitosterol	Lanosterol	Cholesterol
TMR gepoolt	18,8	96,4	192,3	351,1	7,3	nicht nachweisbar
TMR + PG gepoolt	19,7	83,3	155,1	296,2	7,6	nicht nachweisbar



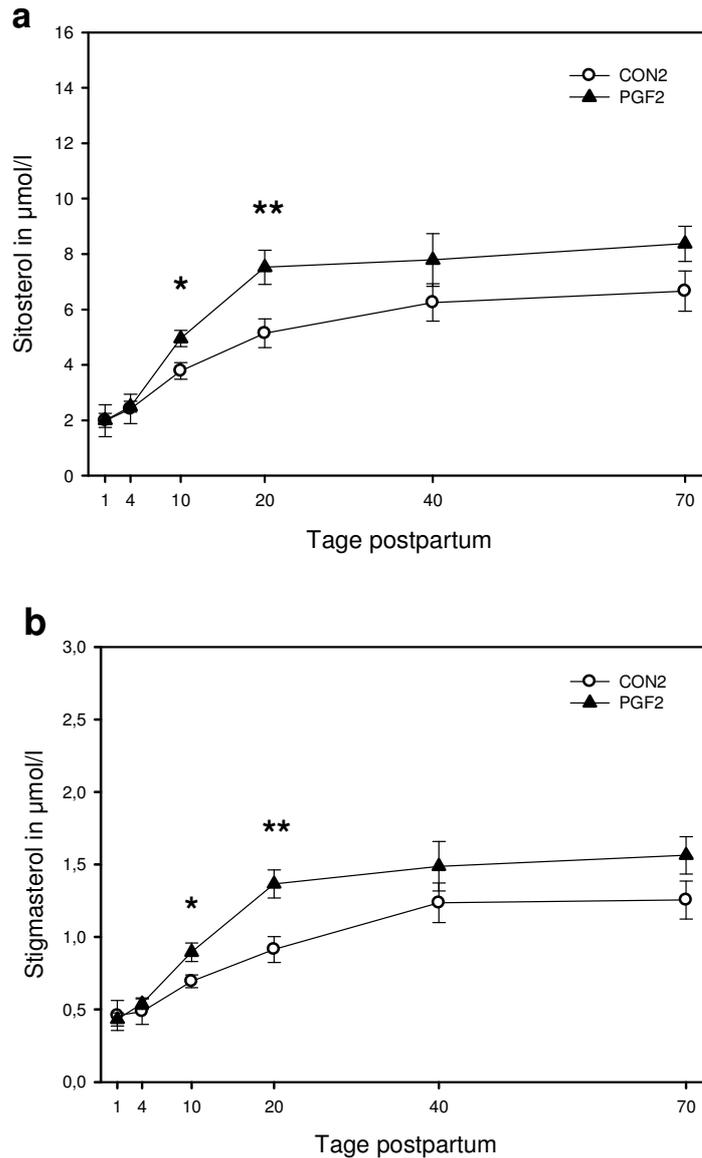
**Abbildung 14.** Prozentuale Verteilung von Sterolen in der Futterration der Gruppen CON2 und PGF2. TMR = totale Mischration

#### **4.11 Phytosterole im Blutserum**

Parallel zur Messung der Konzentrationen von Cholesterin und seinen Vorstufen wurden auch die Konzentrationen von den vier Phytosterolen Brassicasterol, Campesterol (Abbildung 15), Sitosterol, und Stigmasterol (Abbildung 16) im Blutserum gemessen. Bei allen vier untersuchten Phytosterolen ähnelte der zeitliche Verlauf ihrer Serumkonzentrationen postpartum sehr stark dem Verlauf der Konzentrationen von Cholesterin und seinen Vorstufen (vgl. Abbildung 13). Ab Tag 10 pp. traten jeweils signifikant höhere Konzentrationen in der PGF2 Gruppe im Vergleich zur CON2-Gruppe auf. Der größte Unterschied in den Konzentrationen war am Tag 20 pp. nachzuweisen. Zu späteren Zeitpunkten näherten sich die Konzentrationen der beiden Gruppen wieder an wobei in der PGF2 Gruppe stets tendenziell höhere Konzentrationen gemessen wurden. Den größten Anteil an den gemessenen Phytosterolen im Blut machte das Campesterol aus. Seine Konzentration im Blut war rund fünfmal so hoch wie die Konzentration an Stigmasterol und Brassicasterol. Sitosterol nimmt eine Zwischenstellung ein. Trotz alledem machten die Phytosterole nur einen Bruchteil aller Sterole im Blut aus. Allein die Konzentration an Cholesterin im Blutserum war rund tausendfach höher (Einheit: mmol/l) als die Konzentrationen der verschiedenen Phytosterole (Einheit:  $\mu\text{mol/l}$ ).



**Abbildung 15 a-b.** Konzentration von Brassicasterol (a) und Campesterol (b) im Blutserum im Zeitraum von der Abkalbung bis 70 Tage postpartum. Die Blutkonzentrationen sind dargestellt als MW + SEM im Zeitraum von der Abkalbung (Tag 0) bis zum Tag 70 pp. Konzentrationen, die mit \* ( $p < 0,05$ ) oder \*\* ( $p < 0,01$ ) gekennzeichnet sind unterscheiden sich signifikant zwischen den beiden Gruppen. Jede Gruppe umfasste 15 Tiere.



**Abbildung 16 a-b.** Konzentration von Sitosterol (a) und Stigmasterol (b) im Blutserum im Zeitraum von der Abkalbung bis 70 Tage postpartum. Die Blutkonzentrationen sind dargestellt als MW + SEM im Zeitraum von der Abkalbung bis zum Tag 70 pp. Konzentrationen, die mit \* ( $p < 0,05$ ) oder \*\* ( $p < 0,01$ ) gekennzeichnet sind unterscheiden sich signifikant zwischen den beiden Gruppen. Jede Gruppe umfasste 15 Tiere.

## 5 Diskussion

Propylenglycol (PG) wird seit Jahrzehnten zur Ketoseprophylaxe und Therapie beim Rind eingesetzt (JOHNSON 1954). Der Nutzen der PG-Supplementierung wird vor allem in der Zufuhr glucoplastischer Substrate (PG, Propanol, Propionat) gesehen (KRISTENSEN und RAUN 2007, CHUNG et al. 2009). Nachdem KRISTENSEN et al. (2002) zeigen konnten, dass oral verabreichtes Propylenglycol in größerem Umfang intakt aus dem Pansen ins Blut resorbiert wird und YAMAMOTO und ADACHI (1978) sowie DEAN und STOCK (1974) bei Ratten Hinweise auf weitere als die bekannte nutritive Wirkweise von Propylenglycol beobachteten, sollte die vorliegende Arbeit Aufschluss über eine mögliche regulatorische Wirkung des PG bzw. seiner Metaboliten auf Gene bedeutender Stoffwechselwege in der Leber geben. Frühere Studien zum Wirkmechanismus des PG untersuchten lediglich Konzentrationsänderungen von Blutwerten und erhielten damit nur eine indirekte Aussage über die Beeinflussung des Leberstoffwechsels durch PG. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Studie die Mikroarraymethode gewählt, womit in einem Schritt die Genexpression einer Vielzahl von stoffwechselrelevanten Reaktionswegen in der Leber untersucht werden kann.

### 5.1 Allgemeine metabolische Wirkungen des Propylenglycol

In der vorliegenden Studie konnten keine Einflüsse von Propylenglycol (PG) auf die Ketonkörper- und Glucosekonzentration sowie die Konzentration an kurzkettigen Fettsäuren (NEFA) im Blut beobachtet werden. Als einziger Blutwert wurde die Cholesterinkonzentration durch Propylenglycolfütterung signifikant erhöht, was in späteren Kapiteln ausführlich besprochen wird.

Im Stoffwechsel der Hochleistungskuh dienen Ketonkörper und auch NEFA besonders postpartum als wichtige Substrate für die Energiebereitstellung und Milchsynthese (HEITMANN et al. 1987), werden jedoch bei übermäßiger Freisetzung als Verursacher von metabolischen Störungen angesehen (BAIRD et al. 1968, ENJALBERT et al. 2001, BOBE et al. 2004). In der vorliegenden Studie konnten in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von FORMIGONI et al. (1996) an frischlaktierenden Kühen im Zeitraum von bis zu 10 Wochen postpartum keine signifikanten Konzentrationsänderungen zwischen den Gruppen für Ketonkörper nachgewiesen werden. Neben weiteren Studien die ebenfalls keinen Einfluss auf die Ketonkörperkonzentration nach PG-Fütterung beobachteten (COZZI et al. 1996, CHRISTENSEN et al. 1997, MOALLEM et al. 2007a) soll insbesondere die Untersuchung von IWERSEN (2010) hervorgehoben werden. In seiner Untersuchung konnte bei identischem Versuchsdesign zur vorliegenden Studie an einer deutlich größeren Tierzahl

auch kein Effekt einer Propylenglycolsupplementierung der TMR auf die Ketonkörperkonzentration im Serum nachgewiesen werden. Es gibt eine weitere Untersuchung in der nach 500 ml PG-Fütterung an frischlaktierende Kühe eine tendenzielle Senkung der Ketonkörperkonzentrationen im Blut beobachtet werden konnte (PICKETT et al. 2003). Eine Studie, die eine Senkung der Ketonkörperkonzentration durch PG nachwies, erfolgte an trockenstehenden Kühen welche durch Futterrestriktion in eine Ketose versetzt wurden (GRUMMER et al. 1994). STUDER et al. (1993) konnten ebenfalls an trockenstehenden Kühen im präpartalen Zeitraum eine Senkung der Ketonkörperkonzentration durch 1 l PG als oralen Drench beobachten, postpartum konnte hingegen kein Effekt von PG auf die Ketonkörperkonzentration beobachtet werden. Einen antiketotischen Effekt im postpartalen Zeitraum konnten SAUER et al. (1973) und HOEDEMAKER et al. (2004) nachweisen. Insgesamt wurden die Studien, in denen eine Beeinflussung der Ketonkörperkonzentration beobachtet werden konnte, häufiger an trockenstehenden Kühen mit z.T. experimentell induzierter Ketose durchgeführt. Es könnte spekuliert werden, dass die Wirkung von PG auf den Ketonkörperstoffwechsel evtl. auch abhängig vom Laktationsstadium ist.

Auch bei der NEFA-Konzentration konnten einige frühere Untersuchungen eine Senkung der NEFA-Konzentrationen nach PG-Fütterung beobachten (STUDER et al. 1993, GRUMMER et al. 1994). Die vorliegende Untersuchung konnte diese Beobachtungen aber in Übereinstimmung mit den Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen nicht nachweisen (COZZI et al. 1996, MOALLEM et al. 2007a). Es fällt auf, dass eine Senkung der NEFA-Konzentration im Blut am häufigsten in Studien erfolgte in denen die Versuchstiere verhältnismäßig hohe Ausgangskonzentrationen an NEFA aufwiesen (GRUMMER et al. 1994, MIYOSHI et al. 2001, PICKETT et al. 2003). Die Tiere in der vorliegenden Untersuchung wiesen relativ physiologische NEFA-Konzentrationen auf, was als Erklärung dafür dienen könnte, dass die leichte Senkung der NEFA-Konzentration in der PGD-Gruppe nicht statistisch signifikant war. Weiterhin scheint die Dauer der Verabreichung bzw. auch die Verabreichungsart des PG einen Einfluss auf die Senkung der NEFA-Konzentrationen durch PG auszuüben. Studien mit einer mehrtägiger Verabreichung von PG in konzentrierter Form, beispielsweise als Drench, konnten deutlich häufiger eine Beeinflussungen der NEFA-Konzentration nachweisen (FORMIGONI et al. 1996, MIYOSHI et al. 2001, BUTLER et al. 2006), so dass die einmalige hochdosierte Verabreichung als Drench, zusätzlich zum PG in der TMR, in der vorliegenden Studie offenbar nicht ausreichte, um die NEFA-Konzentrationen signifikant zu senken. Es ist nicht auszuschließen, dass eine Senkung der NEFA-Konzentrationen in der vorliegenden Studie erst nach dem Drench an Tag 10 pp. erfolgte und dadurch mit dem gewählten Versuchsdesign nicht erfasst werden konnte.

In der vorliegenden Untersuchung wurde keine Beeinflussung der Glucose-Konzentration nach PG-Supplementierung beobachtet. Die Untersuchungen von MOALLEM et al. (2007a) sowie von CASTANEDA-GUTIERREZ et al. (2009) kamen zu einem ähnlichen Ergebnis. Zwei weitere Studien wiesen besonders bei PG-Dosierungen von 500 ml PG bzw. 1 l PG im Futter bzw. Drench eine Erhöhung der Glucose-Konzentration nach (MIYOSHI et al. 2001, BUTLER et al. 2006). Eine mögliche Erklärung für die fehlende Beeinflussung der Glucose-Konzentration durch PG könnte in der geringeren Menge des eingesetzten PG liegen, denn in der vorliegenden Studie wurde mit Ausnahme des einmaligen Drenchs an Tag 10 pp. lediglich 300 g PG pro Tier und Tag mit der TMR verfüttert. Es gibt jedoch auch Untersuchungen in denen geringere Mengen PG (als Drench verabreicht) zu Veränderungen der Glucosekonzentration führten (GRUMMER et al. 1994, JUCHEM et al. 2004). Weiterhin muss die besondere Stoffwechselsituation des Rindes postpartum bedacht werden. Zu diesem Zeitpunkt wird der größte Teil der Blutglucose zur Laktosesynthese in der Milchdrüse benötigt (KRONFELD et al. 1968, ASCHENBACH et al. 2010). Es könnte spekuliert werden, dass die durch PG in erhöhtem Maße bereitgestellte Glucose möglicherweise durch den gesteigerten Bedarf der laktierenden Milchdrüse sofort wieder entzogen wird.

Die Propylenglycol-Fütterung führte zu keiner Änderung der Insulin-Konzentrationen in der vorliegenden Untersuchung. Diese Ergebnisse entsprechen früheren Untersuchungen von FORMIGONI et al. (1996) und MOALLEM et al. (2007b). Man könnte vermuten, dass der fehlende Effekt auf die Insulinkonzentration aufgrund der unveränderten Glucosekonzentration zu erwarten wäre. Die Insulinkonzentration unterliegt beim Rind aber einer besonderen Regulation. So stellt im Gegensatz zu Monogastriern weniger die Blut-Glucosekonzentration sondern v.a. die Blut-Konzentration an kurzkettigen Fettsäuren den entscheidenden Reiz für die Insulinausschüttung dar (HORINO et al. 1968, HARMON 1992). Da Propylenglycol im Pansen z.T. zu Propionat umgewandelt wird, könnte es über die verstärkte Resorption dieser Substanz zu einer Konzentrationserhöhung nach PG-Fütterung kommen. Die kurzkettigen Fettsäuren, zu denen Propionat zählt, fluten jedoch vor allem in Abhängigkeit von der Futteraufnahme im Pfortaderblut an (ASCHENBACH et al. 2010). In der vorliegenden Studie hatten die Versuchstiere 24 Stunden pro Tag Zugang zu den gefütterten totalen Mischrationen (TMR), so dass eventuelle PG-Effekte auf die Insulinkonzentration durch die zeitlich unterschiedlichen Fresszeiten der Versuchstiere und somit unterschiedliche Anflutung von Propionat im Pfortaderblut verwischt sein können. Auch bei der Verabreichung des PG als oraler Drench werden die höchsten Propionatkonzentrationen im Pansen erst vier bis acht Stunden nach Verabreichung gemessen. Das könnte erklären warum in der vorliegenden Studie zum Biopsiezeitpunkt ~ zwei Stunden nach Verabreichung des Drench noch keine Blut-Konzentrationsänderung für Insulin nachweisbar war.

Die Blut-Konzentrationen der untersuchten Leberenzyme GOT, GPT, GGT und GLDH waren in Übereinstimmung mit früheren Studien durchweg im physiologischen Bereich. (BUTLER et al. 2006, CASTAÑEDA-GUTIÉRREZ et al. 2009).

Insgesamt lässt sich die Schlussfolgerung ziehen, dass die vorliegende Studie an einer relativ gut geführten, stoffwechselstabilen Stichprobe einer Herde durchgeführt wurde, deren Milchleistung sich auf einem hohen Niveau befand. Die gute Stoffwechselsituation könnte einerseits eine Erklärung dafür sein, dass Zielmetaboliten des PG-Einsatzes (Ketonkörper, NEFA, Glucose) nicht statistisch signifikant zwischen Kontrollgruppe und PG-supplementierten Gruppen unterschieden. Dieses gute Tiermaterial sollte aber auch andererseits ideale Voraussetzungen bieten, transkriptionelle Wirkungen von PG nachweisen zu können.

## **5.2 Propylenglycol und Propanol und weitere Metaboliten als mögliche Auslöser der PG-Wirkung in der Leber**

Um die Effekte von Propylenglycol auf den Leberstoffwechsel zu postulieren, muss zuerst sichergestellt werden, dass PG in ausreichender Menge im Blut der Tiere ankommt. Erst das Erreichen nachweisbarer Serum-Spiegel für PG ermöglicht es direkt in der Leber Wirkungen zu erzielen. In der eigenen Studie konnte nachgewiesen werden, dass PG, welches in die TMR eingemischt wurde, bis zum Zeitpunkt der Fütterung stabil blieb. An den untersuchten Futterproben konnte nachgewiesen werden, dass die Konzentration an PG in der TMR ausreichend war, um bei einer geschätzten Futteraufnahme von ca. 20 kg Trockensubstanz die Dosis von 300 g PG pro Tier und Tag in den Gruppen PGF1 und PGF2 sowie PGD zu gewährleisten. Die Verabreichung eines zusätzlichen PG-Drenches führte zu signifikant höheren PG-Konzentrationen im Serum im Vergleich zur alleinigen Applikation über die TMR. Die Blutprobennahme zur Bestimmung der Konzentrationen an PG und Propanol im Serum erfolgte zum Zeitpunkt der Biopsie, also etwa 120 min nach dem Drench. Damit wurde nachgewiesen, dass zum Biopsie-Zeitpunkt eine deutlich nachweisbare Menge des mittels Drench zugeführten PG im Blut zirkulierte. Dies wird unterstützt von den Ergebnissen anderer Autoren, die zeigen konnten, dass ein Teil des oral verabreichten PG unverändert aus dem Gastrointestinaltrakt ins Blut resorbiert wird. (EMERY et al. 1964, KRISTENSEN et al. 2002, RAUN et al. 2005). Andererseits wird Propylenglycol zu einem großen Teil bereits im Pansen durch Mikroorganismen abgebaut (CZERKAWSKI und BRECKENRIDGE 1972, KRISTENSEN et al. 2002, KRISTENSEN und RAUN 2007). Ein wichtiger Metabolit, welcher durch diesen Abbau entsteht, ist Propanol (CZERKAWSKI und BRECKENRIDGE 1972, KRISTENSEN und RAUN 2007). Propanol konnte in der vorliegenden Arbeit erst nach hoher Dosierung von PG in signifikant höheren Konzentrationen im Serum nachgewiesen werden, während sich die Propanolkonzentration bei PG-Fütterung über TMR nicht von der

Kontrollgruppe unterschied. Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen frühere Ergebnisse von RAUN et al. (2005) die ebenfalls eine signifikante Erhöhung der Propanol-Konzentration im Blut nach intraruminaler Verabreichung von PG nachwiesen. Der Unterschied in den Propanol-Konzentrationen zwischen der PGF1 und PGD-Gruppe könnte im Zusammenhang mit den unterschiedlichen PG-Konzentrationen im Blutserum stehen. Die PG-Konzentration in der PGD-Gruppe war fast zwanzigfach höher als in der PGF1-Gruppe. Da Propanol in gewissen Mengen (ähnlich Ethanol) bereits in Futtermitteln vorhanden ist (KRISTENSEN et al. 2007) bzw. bei anderen Stoffumsetzungen im Pansen entstehen kann, bedarf es offensichtlich einer großen PG-Zufuhr, bevor die Plasmakonzentration von Propanol messbar ansteigt.

Welcher PG-Metabolit letztendlich (alleine oder in Kombination) die Genexpression der Schlüsselenzyme der Cholesterinsynthese beeinflusste, konnte in der vorliegenden Arbeit nicht abschließend geklärt werden. Sowohl die Serumkonzentrationen von PG als auch seines Metaboliten Propanol korrelierten mit der Höhe der Genexpression für die Schlüsselenzyme 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase und teilweise Squalenmonooxygenase. Da aber die Serumkonzentration von PG und Propanol ihrerseits korreliert waren, bleibt leider offen welche der beiden Substanzen ggf. den (größeren) Einfluss auf die Genexpression ausübte. Auch eine regulatorische Wirkung von Propionat kann prinzipiell nicht ausgeschlossen werden, erscheint aber weniger wahrscheinlich, da der Stoffwechsel von Propionat beim Wiederkäuer gut untersucht ist (LENG 1970, YOUNG 1977) und Propionat auch physiologisch in unterschiedlichen Konzentrationen im Blut vorkommt. Es kann mit der vorliegenden Studie auch nicht ausgeschlossen werden, dass möglicherweise weitere bisher nicht identifizierte Metabolite die regulatorische Wirkung ausübten.

### **5.3 Genexpressionsänderung stoffwechselrelevanter Gengruppen**

Die zur Untersuchung herangezogenen Gengruppen wurden im Vorfeld nach erfolgtem Studium der verfügbaren Literatur als potenziell durch PG beeinflusst zusammengestellt (Kap 2.5). Bei der Untersuchung der Genexpression stoffwechselrelevanter Gengruppen erwies sich lediglich der Stoffwechselweg Cholesterinsynthese als signifikant hochreguliert durch Propylenglycol-Fütterung. Frühere Genexpressionsuntersuchungen an Rindern konnten zeigen, dass sich die Expression von Genen der Cholesterinsynthese sowohl im Verlauf der Laktation als auch bei Vorliegen einer experimentell induzierten Ketose ändert (LOOR et al. 2005, VAN DORLAND et al. 2009, GRABER et al. 2010 SCHLEGEL et al. 2012). Die Expression von Schlüsselenzymen der Cholesterinsynthese ist zum Zeitpunkt kurz nach der Abkalbung am niedrigsten und steigt mit Fortschreiten der Laktation stetig an (VAN DORLAND et al. 2009, GRABER et al. 2010). Eine weitere Studie fand im postpartalen

Zeitraum eine signifikante Steigerung der Genexpression für HMGCR sowie für Farnesyl-Diphosphat-Synthase bis zur ersten Woche pp. danach wurde im Gegensatz zu den Untersuchungen von VAN DORLAND et al. (2009) und GRABER et al. (2010) ein Abfallen der mRNA Konzentrationen dieser Gene auf deutlich niedrigere Werte beobachtet (SCHLEGEL et al. 2012). Bei experimentell induzierter Ketose sind die Expressionswerte für Gene der Cholesterinsynthese deutlich vermindert (LOOR et al. 2007). Die in der vorliegenden Studie nachgewiesene Erhöhung der Genexpression für Enzyme der Cholesterinbiosynthese durch PG kann also sowohl die nach der Abkalbung physiologischerweise niedrige Cholesterinsynthese als auch die bei der Ketose pathologischerweise niedrige Cholesterinbiosynthese stimulieren. Da zur Cholesterinsynthese zum einen ebenfalls Acetyl-CoA, der Ausgangsstoff der Ketonkörpersynthese (siehe Kap. 2.1.4), verbraucht wird und zum anderen Ketonkörper direkt genutzt werden können (ENDEMANN et al. 1982, AZAIN und ONTKO 1990) trägt dies zur Abmilderung einer Ketose bei und begründet möglicherweise eine der positiven Wirkungen, die PG auf die Ketose der Milchkuh ausübt (zur biologischen Bedeutung der Cholesterinsynthese postpartum siehe Kap. 5.7).

Insgesamt existieren bisher nahezu keine Untersuchungen zu Genexpressionsänderungen im Leberstoffwechsel nach PG-Fütterung. Die in der vorliegenden Studie erhobenen Daten zur Beeinflussung der Cholesterinsynthese durch PG konnten jedoch in der vorliegenden Untersuchung zusätzlich durch die Einzelgen-basierten Untersuchung bestätigt werden, indem sich auch in dieser Untersuchung allein 7 der 74 differentiell exprimierten Genen dem Stoffwechselweg Cholesterinsynthese zuordnen ließen. Unter diesen Einzelgenen befanden sich auch zwei Schlüsselenzyme der Cholesterinsynthese (HMGCR und SQLE) welche nachweislich auch transkriptionell reguliert werden (FRIESEN und RODWELL 2004, CASEY et al. 2004, GRABER et al. 2010). In der Einzelgen-basierten Untersuchung konnte jedoch aufgrund der großen Genanzahl auf dem Mikroarray für kein Gen eine signifikante Expressionsänderung festgestellt werden (Siehe Kap 4.5). Interessant ist, dass die sieben differentiell regulierten Gene der Cholesterinsynthese gleichsinnig durch PG höher exprimiert waren, was mit der Beobachtung in einer früherer Studie zur Gennexpressionsänderung im postpartalen Zeitraum beim Rind übereinstimmt, in der ebenfalls eine gleichsinnige Expressionserhöhung von Genen für Schlüsselenzyme der Cholesterinsynthese im Laktationsverlauf, also unter physiologischen Konditionen, beobachtet wurde (GRABER et al. 2010).

Alle weiteren im Vorfeld als potenziell reguliert diskutierten Stoffwechselwege (Kap.2.5) wurden durch PG nicht genomisch reguliert. Letzteres schließt nicht aus, dass bei einigen Stoffwechselwegen trotzdem eine Regulation über andere Mechanismen erfolgt, z.B. posttranslationale Modifikation oder Aktivitätsänderung von Schlüsselenzymen. Darüber

hinaus muss beachtet werden, dass in der vorliegenden Studie alle Versuchstiere zum selben Zeitpunkt postpartum untersucht wurden. Dabei sind möglicherweise die unmittelbar postpartum physiologisch stattfindenden Expressionsänderungen im Leberstoffwechsel (VAN DORLAND et al. 2009, GRABER et al. 2010) dominierender, als mögliche geringere durch PG bedingte Expressionsänderungen. Auch in der Einzelgen-basierten Untersuchung waren offensichtlich keine Gene-Cluster weiterer Stoffwechsel- oder Signalwege differentiell exprimiert.

#### **5.4 Bestätigung der Mikroarrayergebnisse mittels qRT-PCR**

Die quantitative Real-time PCR als Methode zur Validierung der ermittelten Mikroarrayergebnisse wies für die beiden Schlüsselenzyme der Cholesterinsynthese HMGCR und SQLE (WHITE und RUDNEY 1970, SHAPIRO und RODWELL 1971, FERGUSON und BLOCH 1977, SINGH et al. 2003, FRIESEN und RODWELL 2004) in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Mikroarray Untersuchung ebenfalls eine höhere mRNA Konzentration durch PG-Fütterung nach. Damit konnte durch eine zweite, unabhängige Methode die transkriptionelle Beeinflussung der Cholesterinsynthese durch PG-Fütterung bestätigt werden. Die qRT-PCR-Werte bestätigten nicht nur die Regulation der Cholesterinsynthese; die mittels qRT-PCR erhobenen relativen Expressionswerte für HMGCR und SQLE korrelierten auch signifikant miteinander, was eher auf eine globale Beeinflussung des gesamten Cholesterin-Synthesestoffwechselweges als auf die zufällige Regulation eines einzelnen Gens hinweist. Auch zwischen den beiden Methoden qRT-PCR und Mikroarray, war eine signifikante positive Korrelation für HMGCR und SQLE nachweisbar, was die Kompatibilität beider Methoden bestätigt. Bei der qRT-PCR wurde ein Referenzgen mitgeführt um eventuelle Bearbeitungseffekte auszuschließen. Dieses Referenzgen (B2MG) korrelierte weder mit den Expressionswerten für HMGCR und SQLE aus der Mikroarrayuntersuchung noch mit den qRT-PCR Ergebnissen für diese beiden Gene. Damit kann eine auf Bearbeitungseffekten basierende, scheinbare Korrelation der ausgewählten Schlüsselgene, sowie eine mögliche, durch unterschiedliche mRNA-Stabilität bedingte unterschiedliche Genexpression mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden.

Zusammenfassend bestätigte die qRT-PCR Untersuchung die Ergebnisse der Mikroarrayuntersuchung, also die globale Hochregulierung des Stoffwechselweges Cholesterinsynthese auf Transkriptionsebene.

## **5.5 Biologische Signifikanz der transkriptionellen Regulation der Cholesterinsynthese**

Die Untersuchung der Genexpressionsänderung mittels Mikroarray ermöglicht die Quantifizierung der Regulation von Stoffwechselwegen auf Transkriptionsebene. Expressionsänderungen auf dieser Ebene können noch keine Aussage über die tatsächliche Beeinflussung eines Stoffwechselweges treffen. Auch eine fehlende Regulation auf dieser Ebene schließt eine Beeinflussung eines Stoffwechselweges nicht aus. Aus diesem Grund wurde an einer weiteren Stichprobe aus derselben Herde (CON2 und PGF2) der zeitliche Verlauf der Sterol-Konzentrationen im Blut bestimmt. Dabei zeigte sich, dass die Blutkonzentration an Cholesterin durch die Verabreichung von PG signifikant gesteigert werden kann.

### **5.5.1 Zeitlicher Verlauf der Cholesterinkonzentration im Serum**

Die Cholesterinkonzentration wurde bisher eher selten im Zusammenhang mit einer PG-Fütterung untersucht. In der vorliegenden Untersuchung konnten bei den Tieren der PGF2-Gruppe ab Tag 20 postpartum signifikant höhere Cholesterinkonzentrationen beobachtet werden. Insgesamt lagen die Cholesterinkonzentrationen im gesamten Zeitverlauf in der PGF2-Gruppe stets über den Konzentrationen der Kontrollgruppe. Die höheren Konzentrationen an Cholesterin im Zeitverlauf zeigten sich auch in einer signifikant größeren AUC für Cholesterin in der PGF2-Gruppe im Applikationszeitraum des PG (d1-d40 pp). MALCHAU (2011) konnte ebenfalls eine signifikante Konzentrationserhöhung für Cholesterin im Serum nach PG-Fütterung nachweisen. In ihrer Untersuchung an Holsteinkühen die ab der Kalbung 250 g PG über das Futter verabreicht bekamen, wurden die Cholesterinkonzentrationen bis zum 56 Tag pp. als Gesamtmittelwert verglichen. Eine Studie von FORMIGONI et al. (1996) bestätigt diese Ergebnisse ebenfalls, indem hier ab Tag 25 pp. signifikant höhere Cholesterinkonzentrationen im Serum nach täglicher Verabreichung von 300 g PG gemessen wurden. Dabei wurde sowohl in der vorliegenden Studie als auch von FORMIGONI et al. (1996) beobachtet, dass die Cholesterinkonzentration im Verlauf der Laktation bis etwa zum Tag 50 bzw. 70 pp. stetig ansteigt. Nach dem Erreichen erhöhter Cholesterinkonzentrationen zur Mitte der Laktation konnte in Untersuchungen von COZZI et al. (1996) keine weitere Steigerung der Cholesterinsynthese durch PG mehr nachgewiesen werden.

In der vorliegenden Studie lagen die Cholesterinkonzentrationen in beiden Gruppen für den betrachteten Zeitpunkt der Früh-laktation deutlich oberhalb einer als unteren Grenzwert angegebenen Konzentration von 1,5 mmol/l (FÜRLL 2005) und somit im physiologischen Bereich. Die in der vorliegenden Studie ermittelten Cholesterinkonzentrationen lagen auch deutlich über den Mittelwerten der Cholesterinkonzentration die MALCHAU (2011) ermittelte.

Da höhere Cholesterinkonzentrationen erst ab Tag 20 pp. nachgewiesen wurden, scheint die PG-Wirkung nicht auf einer abrupten Erhöhung der Cholesterinkonzentration im Serum zu beruhen sondern eher auf einer kontinuierlichen Steigerung der Syntheseraten. Ähnliche Zeitspannen bis zum Erreichen von Konzentrationsänderungen wurden auch in einer Studie zur Wirksamkeit Cholesterinspiegel-regulierender Medikamente beim Menschen beobachtet (AXELSON et al. 1998). Die ersten Hinweise auf eine Beeinflussung des Cholesterinstoffwechsels wurden 1978 nach Fütterung von PG an Ratten erhoben (AMMA et al. 1978). Dabei kam es nicht primär zu einer Steigerung der Cholesterinkonzentration im Blut sondern vielmehr zu einer erhöhten Cholesterineinlagerung in Leber und Herzmuskel, was die Autoren veranlasste, eine kritische Einstellung bezüglich eines Langzeiteinsatzes von PG am Menschen zu vertreten. Ob der PG-Einsatz in der Rinderfütterung längerfristig auch den Cholesterin-Plasmaspiegel des Endkonsumenten Mensch erhöhen kann ist bisher nicht untersucht, sollte aber aufgrund der schwerwiegenden Gesundheitsfolgen einer Hypercholesterinämie beim Menschen (GARCIA und MOODIE 1990) in weiteren Studien Beachtung finden.

Eine Abwägung der erhobenen Befunde mit Hinblick auf die Bedeutung einer forcierten Cholesterinsynthese für die Milchkuh wird in Kap. 5.7 gegeben.

### **5.5.2 Herkunft des Cholesterins im Serum**

Zur endgültigen Bestätigung der gesteigerten Cholesterinsynthese durch PG-Fütterung muss die Herkunft des Cholesterins aus der endogenen Synthese nachgewiesen werden. Zuerst konnte die Aufnahme von Cholesterin mit der Futterration der Versuchstiere ausgeschlossen werden, da die hier eingesetzte rein pflanzliche Ration nachweislich kein Cholesterin enthielt. Weiterhin erfolgte die Untersuchung der Konzentrationen an Lanosterol und Desmosterol im Serum. Beide Sterole sind Vorstufen des Cholesterins, die im Verlauf der endogenen Cholesterinsynthese entstehen (OTT und LACHANCE 1981). Diese Vorstufen wurden ausgewählt weil ihre Konzentration im Serum in Studien beim Menschen gut mit der Aktivität der Schlüsselenzyme der Cholesterinsynthese (HMGCR und SQLE) korrelierten (BJORKHEM et al. 1987, LUND et al. 1989, AXELSON et al. 1998). Dadurch können Lanosterol und Desmosterol beim Menschen als gute Indikatoren für eine gesteigerte endogene Cholesterinsynthese angesehen werden. Da Untersuchungen zur Korrelation dieser Vorstufen mit den Schlüsselenzymen der Cholesterinsynthese beim Rind bisher nicht existieren, wurde diese Beziehung vorerst auch für das Rind angenommen.

Während Desmosterol ausschließlich in tierischen Zellen im Verlauf der Cholesterinsynthese entsteht, wird Lanosterol neben der endogenen Cholesterinsynthese auch bei der Synthese von pflanzlichen Sterolen (Phytosterolen) gebildet (SUZUKI et al. 2006). Die Ration wurde auch auf den Gehalt an Lanosterol untersucht, um den Anteil des

mit der Nahrung aufgenommenen Lanosterols abschätzen zu können. Lanosterol war in der eingesetzten TMR nur in Spuren nachweisbar. Der Anteil des Lanosterol lag deutlich unter den Konzentrationen der weiteren untersuchten Phytosterole, so dass eine messbare Änderung der Serum-Konzentration von Lanosterol durch diese geringen Konzentrationen im Futter vermutlich ausgeschlossen werden kann. Die Konzentrationen an Lanosterol und Desmosterol im Serum verliefen parallel zur Konzentration an Cholesterin, wobei sich die Konzentration an Desmosterol bereits am Tag 10 pp. signifikant zwischen den Gruppen unterschied. Am Tag 20 pp. war die Konzentration im Serum für beide Vorstufen in der PG-gefütterten Gruppe signifikant höher. Insgesamt konnte damit nachgewiesen werden, dass PG in der vorliegenden Studie die endogene Cholesterinsynthese steigert, was zu einer Erhöhung der Gehalte an Cholesterin sowie seiner Vorstufen im Serum im Vergleich zur Kontrollgruppe führte.

Die Bewertung der in der vorliegenden Studie gemessenen Konzentrationen ist schwierig, da Referenzwerte über physiologische Konzentrationen von Lanosterol und Desmosterol für das Rind bisher nicht existieren und für den postpartalen Zeitraum in dieser Arbeit erstmals erhoben wurden.

## **5.6 Einfluss der Phytosterole im Futter auf die Cholesterinsynthese der Kuh**

Phytosterole sind Sterole ausschließlich pflanzlichen Ursprungs (WEIHRAUCH und GARDNER 1978), die beim Menschen einen regulierenden Effekt auf die Cholesterinkonzentration im Blut ausüben (YANG et al. 2004).

Die durchgeführten Untersuchungen zur Beeinflussung der Cholesterinsynthese durch Phytosterole beschränkten sich bisher auf Mensch sowie Labornager. In diesen Studien kam es bei sehr hohen Phytosterolkonzentrationen im Serum zu einer ausgeprägten Hemmung der Cholesterinsynthese auf Transkriptionsebene. Diese Hemmung wurde beim Menschen von PATEL et al. (1998) auch speziell für das Schlüsselenzym der Cholesterinsynthese (HMGCR) nachgewiesen. Bei Mäusen konnten YANG et al. (2004) eine Hemmung der Cholesterinsynthese nach Fütterung sehr hoher Phytosterolkonzentrationen beobachten. Eine weitere Studie an Mäusen fand im Gegensatz dazu bei gesteigerter Phytosterolfütterung erhöhte mRNA Konzentrationen für das Schlüsselenzym HMGCR (XU et al. 2008).

Die pflanzliche Ration einer Milchkuh (~16 g Phytosterole /Tag) weist wesentlich höhere Gehalte an Phytosterolen auf als die durchschnittliche, zum Teil auf Fertiggerichten basierende Mischkost des Menschen (~400 mg Phytosterole/Tag, CALPE-BERDIEL et al. 2009). Die Konzentrationen von ausgewählten Phytosterolen (Brassicasterol, Campesterol, Sitosterol und Stigmasterol) im Serum der Versuchstiere wurden untersucht, um einen möglichen Zusammenhang zwischen der Phytosterol-Aufnahme mit der Nahrung und dem

Cholesterinstoffwechsel abzuklären. Da bisher keine Untersuchungen zu physiologischen Phytosterol-Konzentrationen beim Rind durchgeführt wurden, müssen die in der vorliegenden Studie für die Kontrollgruppe ermittelten Werte als physiologische Werte einer frühlaktierenden Kuh angesehen werden.

Die Serumkonzentrationen der untersuchten Phytosterole unterschieden sich in der vorliegenden Arbeit an Tag 10 und Tag 20 pp. signifikant zwischen den Tieren der CON2-Gruppe und der PGF2-Gruppe, wobei die Tiere der PGF2-Gruppe bei allen vier untersuchten Phytosterolen deutlich höhere Konzentrationen aufwiesen. Die Ursachen dieser unterschiedlichen Phytosterolkonzentrationen könnten zum einen in den gefütterten Rationen beider Versuchsgruppen liegen. Das konnte in der vorliegenden Studie durch den Nachweis nahezu identischer Phytosterolkonzentrationen in beiden TMR ausgeschlossen werden. Zum Anderen könnte eine durch PG-Fütterung verminderte mikrobielle Aktivität der Mikroorganismen im Pansen vorliegen, so dass mehr Phytosterole unverändert im Darm ankommen und resorbiert werden können, denn Phytosterole werden durch die Mikroorganismen im Pansen bevorzugt zu Stanolen hydriert (ASHES et al. 1978, GULATI et al. 1978). Da in der vorliegenden Studie keine Untersuchungen an Pansensaft vorgenommen wurden kann diese Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden und bedarf weiterer Klärung.

Möglicherweise hat auch die gesteigerte Cholesterinsynthese der PG gefütterten Tiere einen Einfluss auf die Phytosterolkonzentrationen im Blut. Der Mechanismus der Resorption der Phytosterole ist bisher nicht vollständig aufgeklärt, erfolgt aber vermutlich indem in Gegenwart von Cholesterin Micellen gebildet werden, welche dann resorbiert werden (HAMADA et al. 2006). Da Cholesterin für die Bildung jener Micellen erforderlich ist durch welche die Phytosterole letztendlich resorbiert werden (HAMADA et al. 2006) könnte eine gesteigerte Cholesterinverfügbarkeit im Darm aufgrund einer höheren Cholesterinausscheidung über die Galle zu höherer Resorption und somit höheren Blutspiegeln an Phytosterolen führen.

Es muss auch diskutiert werden, ob umgekehrt möglicherweise die Unterschiede in der Phytosterolkonzentration Einfluss auf die Cholesterinsynthese der Versuchstiere ausübten. Das die nachgewiesene Beeinflussung der Cholesterinsynthese durch die Phytosterole bedingt war, erscheint in der vorliegenden Studie wenig wahrscheinlich, da sich die Werte der Versuchstiere zum einen im Bereich des für den Menschen festgelegten physiologischen Bereiches befanden (TILVIS und MIETTINEN 1986, LUTJOHANN et al. 1995, LEMBCKE et al. 2005) und zum anderen bei Menschen und Nagern lediglich bei stark bis krankhaft erhöhten Phytosterolkonzentrationen eine Beeinflussung der Cholesterinsynthese nachgewiesen wurde. Dabei handelt es sich um Spekulationen, denn beim Rind bedarf dieser mögliche Zusammenhang weiterer Untersuchungen. Man kann ebenfalls nur

spekulieren, dass die höheren Phytosterolkonzentrationen auch ein Hinweis darauf sein könnten, dass nicht nur die Cholesterinsynthese in der Leber, sondern auch die Steroltransportvorgänge im Darm direkt oder indirekt durch PG beeinflusst werden. Entsprechend könnte auch eine unterschiedlich starke Rückresorption von Cholesterin über den enterohepatischen Kreislauf aus dem Darm für die im vorigen Kapitel analysierten Veränderungen der Cholesterinserumwerte nach PG-Fütterung in gewissem Maße mit verantwortlich sein (CHEN et al. 1995). Die Klärung dieser Hypothesen bedarf jedoch weiterer Untersuchungen, da nicht abschließend festgelegt werden kann ob die gesteigerte mRNA-Expression der Schlüsselenzyme der Cholesterinsynthese in der vorliegenden Studie nicht oder nicht ausschließlich durch PG und/oder seinen Metaboliten hervorgerufen wurde, sondern evtl. sekundär durch die höheren Phytosterol-Serumkonzentrationen der PG-gefütterten Tiere am Tag 10 pp. bedingt war.

## **5.7 Die biologische Bedeutung einer forcierten Cholesterinsynthese für die Hochleistungskuh**

Cholesterin ist für den tierischen Stoffwechsel essentiell. Es erfüllt weitreichende Aufgaben der Membranstabilität (YEAGLE 1985, BROWN und GOLDSTEIN 1999; GARCIA-RUIZ et al. 2009) sowie im Lipoprotein-Stoffwechsel (GRUMMER und CARROLL 1988, BAUCHART 1993, BROWN und GOLDSTEIN 1999, BERNABUCCI et al. 2004). Eine Hochleistungskuh scheidet über die Milch bis zu 8 g Cholesterin täglich aus (VITURRO et al. 2009). Die Kuh als reiner Pflanzenfresser ist aber aufgrund des Fehlens von Cholesterin in pflanzlicher Nahrung vollständig auf die endogene Synthese angewiesen.

Die Kuh muss vermehrt Cholesterin synthetisieren, um dem gesteigerten Cholesterinverbrauch mit Einsetzen der Laktation gerecht zu werden (VITURRO et al. 2009). In einer Untersuchung von CHEN et al. (1995) wurde nachgewiesen, dass die Cholesterinsynthese in der Leber von nichtträchtigen, nichtlaktierenden Rinder auf relativ niedrigem Niveau stattfand. Bei experimentell herbeigeführtem Cholesterinmangel war die Leber allerdings in der Lage, die Cholesterinsynthese um das 10-fache zu steigern und somit anstelle des Darmes zum Hauptort der Cholesterinsynthese zu werden (CHEN et al. 1995). Die experimentellen Bedingungen, die in der Studie von CHEN et al. (1995) zu einem starken Cholesterinmangel führten, könnten ggf. mit der Belastung durch den hohen Cholesterinbedarf in der Früh-laktation gleichgesetzt werden, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Leber bei erhöhtem Bedarf, wie beispielsweise bei Einsetzen der Laktation, ihre Cholesterinsynthesekapazität erheblich steigern muss. Diese Erhöhung der Cholesterinsynthese spiegelt sich offensichtlich auch in den Cholesterinkonzentrationen im Blut im postpartalen Zeitraum wieder. So wiesen Kühe die niedrigsten Cholesterinkonzentrationen zum Zeitpunkt der Abkalbung auf (VAN DEN TOP et al. 1995,

FORMIGONI et al. 1996), gefolgt von einem stetigen langsamen Ansteigen der Cholesterinkonzentrationen innerhalb von etwa 5 Wochen nach Abkalbung (WATERMAN et al. 1972, KAPPEL et al. 1984, VAN DEN TOP et al. 1995, FORMIGONI et al. 1996, ITOH et al. 1998).

In Untersuchungen zur Genexpression in der Leber des Rindes im peripartalen Zeitraum konnten sowohl VITURRO et al. (2009) als auch GRABER et al. (2010) im postpartalen Zeitraum in Übereinstimmung zu den Beobachtungen beim Serum-Cholesterinspiegel eine deutliche Erhöhung der Expression von Genen der Cholesterinsynthese beobachten. Im Gegensatz zu diesem physiologischen Zustand postpartum konnte bei ketotischen Kühen eine relative Abnahme der Expression für Gene des Cholesterinstoffwechsels beobachtet werden (LOOR et al. 2007). In der vorliegenden Studie konnten durch Propylenglycolfütterung nicht bloß höhere mRNA-Konzentrationen für Schlüsselenzyme der Cholesterinsynthese nachgewiesen werden, es wurden ebenfalls schneller höhere Cholesterin-Konzentrationen im Blut erreicht. Wahrscheinlich beruht die bisher unbekannte Wirkung des PG, welche es in früheren Untersuchungen den anderen glukoplastischen Substraten überlegen machte (SAUER et al. 1973, FISHER et al. 1973, HAMADA et al. 1982, MALCHAU 2011), auf der in der vorliegenden Studie nachgewiesenen Steigerung der endogenen Cholesterinsynthese und dem damit früheren Bereitstellen von Cholesterin im Blut. Ein positiver Nebeneffekt der gesteigerten Cholesterinsynthese ist, dass Ketonkörper in Versuchen an Labornagern als Ausgangssubstrate dieses Stoffwechselweges dienen können (ENDEMANN et al. 1982, AZAIN und ONTKO 1990) und somit bei der Cholesterinsynthese verbraucht werden. Dies könnte zu dem in einigen Studien beobachteten positiven Effekt von PG auf die Ketonkörperkonzentration im Blut beitragen. In der Untersuchung von MALCHAU (2011) wurden parallel zu signifikant höheren Cholesterinkonzentrationen im Serum in der PG-Versuchsgruppe signifikant niedrigerer Konzentrationen an Ketonkörpern gemessen, was diese Vermutung bestätigen könnte. Am Tag der Ketonkörperbestimmung in dieser Studie (Tag 10 pp.) war die Cholesterinsynthese noch nicht signifikant stimuliert, was möglicherweise den fehlenden Einfluss auf die Ketonkörperkonzentration in der vorliegenden Studie erklären könnte. Möglicherweise war aber in der vorliegenden Studie die Fütterung auch in der Kontrollgruppe so optimiert, dass auch die Kontrolltiere bereits hohe Cholesterinkonzentrationen im Serum aufwiesen, welche über den in früheren Studien gemessenen Werten lagen (KAPPEL et al. 1984, MALCHAU 2011) und der positive Einfluss von PG ist vorwiegend in Herden mit schlechteren Cholesterinausgangswerten zu beobachten.

Zusammenfassend zeichnet sich die Wirkung von PG in der Ketosebehandlung dadurch aus, dass es neben einer inkonstant beobachteten Wirkung als glukoplastisches Substrat möglicherweise eine zusätzliche Funktion erfüllt. Durch die frühzeitige Bereitstellung von ausreichenden Mengen Cholesterins und einem gesteigerten Verbrauch von Ketonkörpern könnte PG deutliche Vorteile in der Adaptation der Hochleistungskuh an die postpartale Stoffwechselsituation bieten.

## 6 Zusammenfassung

Kerstin Reisberg

Mikroarrayuntersuchung zur Beeinflussung der Genexpression in der Rinderleber nach postpartaler Propylenglycol-Supplementierung.

Institut für Veterinär-Physiologie, Fachbereich Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin  
105 S., 16 Abb., 13 Tab., 199 Lit.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der oralen Verabreichung von Propylenglykol auf die Genexpression bedeutender Stoffwechselwege in der Leber untersucht. Propylenglycol (PG) wird seit Jahrzehnten zur Ketoseprophylaxe und Therapie beim Rind empfohlen. Frühere Studien zum Wirkmechanismus des PG untersuchten lediglich Konzentrationsänderungen von Glucose, Ketonkörpern und allgemeinen Stoffwechselwerten im Blut und erhielten damit nur eine indirekte Aussage über die Beeinflussung des Leberstoffwechsels durch PG. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Studie die Oligonukleotid-Mikroarraymethode als eine Untersuchungsmethode gewählt, mit der in einem Schritt die Genexpression einer Vielzahl von stoffwechselrelevanten Reaktionswegen in der Leber untersucht werden konnte. Dazu kam ein kommerziell verfügbarer Mikroarray der Firma Affymetrix zum Einsatz.

Am Tag der Abkalbung wurden 30 Kühe der Rasse Holstein-Friesian zufällig in 3 Gruppen eingeteilt. Die Kontrollgruppe (CON1) erhielt eine totale Mischration (TMR) ohne Zusätze, die PGF1-Gruppe erhielt 300 g PG eingemischt in die TMR und die PGD-Gruppe erhielt 300 g PG eingemischt in die TMR + zusätzlich an Tag 10 postpartum 512 g PG (500 ml PG in 10 l Wasser gemischt) als oralen Drench. Die PG-Applikation erfolgte vom Tag 1 bis 40 pp. Die Tiere hatten ad libitum Zugang zu Wasser sowie zur TMR. Die Leberbiopsieentnahme erfolgte am Tag 10 pp. in einem zeitlichen Abstand von mindestens 2 Stunden nach dem Drenchen. In einem zweiten Versuchsteil wurden an den Tagen 1, 4, 10, 20, 40 und 70 pp. Blutproben von jeweils 15 Tieren der Kontroll- und Versuchsgruppe (CON2 und PGF2) entnommen und auf die Konzentration von Sterolen untersucht.

Aus dem im ersten Versuchsteil gewonnenen Lebergewebe wurde die mRNA isoliert und in mehreren Schritten markiert, fragmentiert, als cRNA auf den Affymetrix Mikroarray aufgetragen und hybridisiert. Die statistische Auswertung der erhaltenen Expressionsdaten zeigte eine gruppenweise Hochregulierung von Genen des Cholesterinsynthese-Stoffwechselweges an. Mit der qRT-PCR-Untersuchung von 2 Genen für Schlüsselenzyme der Cholesterinsynthese (3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase und Squalenmonooxygenase) konnte die Hochregulierung des Stoffwechselweges

Cholesterinsynthese in der Leber auf Genexpressionsebene bestätigt werden. Um nachzuweisen, ob die transkriptionelle Beeinflussung des Cholesterinsynthesestoffwechselweges auch funktionell relevant ist, wurde die Konzentration von Cholesterin sowie von zwei Cholesterinvorstufen, Lanosterol und Desmosterol, im Blutserum bestimmt. Dabei konnten am Tag 20 pp. signifikant höhere Cholesterinkonzentrationen im Blutserum der PG-supplementierten Tiere gemessen werden. Zusammen mit den ebenfalls signifikant höheren Konzentrationen der Cholesterin-Vorstufen Lanosterol und Desmosterol bei PG-supplementierten Tieren unterstützten diese Daten die Ergebnisse der Mikroarrayuntersuchung und wiesen einen messbaren Effekt von PG auf die Cholesterinkonzentration im Serum durch PG-Applikation nach.

Die Cholesterinsynthese wurde beim Rind bisher nicht in Zusammenhang mit Propylenglycolfütterung untersucht. Der Nachweis einer regulatorischen Wirkung von PG auf die Cholesterinsynthese in der Leber von Wiederkäuern stellt eine neue Erkenntnis bezüglich der Anwendung in der Frühlaktation dar.

Phytosterole aus der Nahrung weisen beim Menschen einen Einfluss auf die Cholesterinkonzentration im Blut sowie auf die Genexpression auf. Dieser Einfluss wurde beim Rind bisher noch nicht näher untersucht, obwohl die Futtermittel von Rindern hohe Konzentrationen an Phytosterolen enthält. In der vorliegenden Arbeit wurden in der CON2- und PGF2-Gruppe erstmals Serumkonzentrationen für die vier Phytosterole: Brassicasterol, Campesterol, Sitosterol und Stigmasterol beim Rind mittels Flüssigchromatographie sowie Massenspektrometrie bestimmt. Dabei konnten trotz gleichem Phytosterolgehalt in den beiden eingesetzten TMR am Tag 10 und 20 pp. höhere Phytosterolkonzentrationen im Serum der PG-supplementierten Tiere gemessen werden. Dies könnte möglicherweise darauf hindeuten, dass PG neben der Beeinflussung der hepatischen Genexpression der Cholesterinsynthese weitere regulatorische Funktionen auf die Steroltransportfunktionen im Darm ausübt.

Es kann geschlussfolgert werden, dass die in der vorliegenden Studie erstmals nachgewiesene Beeinflussung der hepatischen Cholesterinsynthese durch PG eine mögliche Erklärung dafür bietet, warum PG anderen glukoplastischen Substraten bei der Prophylaxe und Therapie der postpartalen Ketose des Rindes überlegen ist. Die Cholesterinsynthese ist einerseits ein Ketonkörper-verbrauchender Stoffwechselweg und stellt andererseits Cholesterin für die Lipoprotein- und Milchfettbildung zur Verfügung. Ob die regulatorische Wirkung auf die Cholesterinsynthese durch PG selbst, durch PG-Metaboliten oder durch veränderte Bioverfügbarkeit von Phytosterolen induziert wird, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

## 7 Summary

Kerstin Reisberg

Microarray studies on the influence of postpartum propylene glycol supplementation on gene expression in the liver of cows.

Institute of Veterinary Physiology, Department of Veterinary Medicine, Freie Universität Berlin

105 pages, 16 figures, 13 tables, 199 references

The aim of this study was to investigate the influence of an oral propylene glycol (PG) administration on gene expression of major metabolic pathways in the liver of dairy cows. PG has been used over decades in the prevention and therapy of bovine ketosis although its mode of action is still not understood completely. When investigating the mode of action of PG, earlier studies preferred to measure only the changes in blood concentrations of glucose, ketone bodies and other metabolites and therefore retrieved only indirect results on liver metabolism. In the present study, an Affymetrix microarray was used to investigate genome-wide gene expression in bovine liver.

Fresh lactating Holstein dairy cows were randomly assigned to three treatment groups. Control group (CON), PGF1 group (300 g/day PG as total mixed ration [TMR]) or PGD (300 g/day PG as TMR and additionally 512 g PG (500 ml PG mixed into 10 l water) as Drench at d 10 post partum [pp.]). Cows received PG supplementation from day 1 until day 40 pp. They had ad libitum access to TMR and water. In the first part of the study, liver biopsies were collected from cows in CON1, PGF1 and PGD on day 10 pp. (10 cows per group; 2 hours after drenching). In the second part of this study blood samples were taken from 15 cows of a CON2 and PGF2 group on day 1, 4, 10, 20, 40, and 70 pp. for analysis of sterol concentration in the serum.

Liver tissue mRNA was extracted and reverse transcribed using the Affymetrix protocol. cRNA probes were labeled, fragmented and hybridized to the bovine oligonucleotide microarray (Affymetrix). The raw data was processed and analyzed using Bioconductor and the statistical software R. The statistical analysis of predefined sets of genes showed an up-regulation of genes encoding for enzymes of the cholesterol biosynthesis pathway on day 10 pp. The results from qRT-PCR experiments on the same samples verified a simultaneous up-regulation of two genes encoding for two key enzymes of the cholesterol biosynthesis (hydroxymethylglutaryl-CoA reductase and squalene monooxygenase). To prove that up-regulation of genes belonging to the cholesterol synthesis pathway is functionally relevant, the concentration of cholesterol, as well as the concentrations of its precursors lanosterol

## 80 Summary

and desmosterol, were measured in blood. For all three sterols, concentrations were significantly elevated after PG feeding on day 20 post partum. Stimulation of endogenous de novo synthesis can be assumed as the origin of the measured increase in serum cholesterol because the TMR was demonstrably free of cholesterol. Elevated levels of lanosterol and desmosterol also point towards an increased endogenous synthesis due to PG feeding.

Cholesterol biosynthesis has never received focused attention in cattle in connection with propylene glycol feeding. Transcriptional regulation of cholesterol synthesis in the liver of ruminants is a completely new observation and should be kept in mind when using PG as feed additive in early lactation.

In humans, cholesterol synthesis is, among others, regulated by phytosterol concentration. The influence of phytosterols on cholesterol synthesis in the liver of cattle has not been investigated in detail until today. Phytosterols are common components of plants, and food of cattle contains phytosterols in high concentrations. In this study, for the first time, serum concentration of the phytosterols brassicasterol, campesterol, sitosterol and stigmasterol were measured in cattle (CON2 and PGF2). Despite the equal concentration of phytosterols in both rations, the serum concentrations of phytosterols were elevated on day 10 and 20 pp. after PG administration. This could suggest that PG not only promotes the cholesterol synthesis in liver tissue of cattle, but may also have an additional influence on sterol transport in the gut.

As a conclusion, the fact that cholesterol synthesis in the liver of cattle is regulated by PG could provide an explanation for the better suitability of PG in treatment and prevention of bovine ketosis compared to other glucogenic substances. Cholesterol synthesis is on the one hand a ketone body utilizing pathway and on the other hand generates cholesterol for lipoprotein and milk fat synthesis. This study shows for the first time, that PG feeding up-regulates cholesterol synthesis in the liver in a transcriptional way, the underlying mechanism of this regulation requires further investigation.

## 8 Literaturverzeichnis

- Amma M K, Dani H M, Ahluwalia P, Dhingra A, Kaur J, Kaur C, Sharma S, Jain K, Singh S, Sareen K. 1,2-Propanediol-induced changes in plasma and tissue lipids of rats. *Lipids*. 1978; 13: 455-457.
- Andersson L. Subclinical ketosis in dairy cows. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*. 1988; 4: 233-251.
- Andersson L, Emanuelson U. An epidemiological study of hyperketonaemia in Swedish dairy cows; Determinants and the relation to fertility. *Prev vet med*. 1985; 3: 449-462.
- Anderwald C, Brunmair B, Stadlbauer K, Krebs M, Fürnsinn C, Roden M. Effects of free fatty acids on carbohydrate metabolism and insulin signalling in perfused rat liver. *Eur J Clin Invest*. 2007; 37: 774-782.
- Aschenbach J R, Kristensen N B, Donkin S S, Hammon H M, Penner G B. Gluconeogenesis in dairy cows: The secret of making sweet milk from sour dough. *IUBMB Life*. 2010; 62: 869-877.
- Aschenbach J R, Penner G B, Stumpff F, Gäbel G. Ruminant Nutrition Symposium: Role of fermentation acid absorption in the regulation of ruminal pH. *J Anim Sci*. 2011; 89: 1092-1107.
- Ashes J R, Gulati S K, Cook L J, Mills S C, Scott T W. Ruminal hydrogenation of cholesterol. *J Lipid Res*. 1978; 19: 244-249.
- Asl A N, Nazifi S, Ghasrodashti A R, Olyaei A. Prevalence of subclinical ketosis in dairy cattle in the Southwestern Iran and detection of cutoff point for NEFA and glucose concentrations for diagnosis of subclinical ketosis. *Prev vet med*. 2011; 100: 38-43.
- Axelsson M, Angelin B, Hillebrant C-G, Reihner E, Einarsson C. The level of 7-dehydrocholesterol in plasma reflects the activity of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in the human liver. *Biochim Biophys Acta*. 1998; 1394: 153-157.
- Azain M J, Ontko J A. Ketone body utilization for lipogenesis in the perfused liver of the obese Zucker rat. *Horm Metab Res*. 1990; 22: 561-565.
- Baird G D, Heitzman R J, Hibbitt K G. Effects of starvation on intermediary metabolism in the lactating cow. A comparison with metabolic changes occurring during bovine ketosis. *Biochem J*. 1972; 128: 1311-1318.
- Baird G D, Hibbitt K G, Hunter G D, Lund P, Stubbs M, Krebs H A. Biochemical aspects of bovine ketosis. *Biochem J*. 1968; 107: 683-689.
- Baird G D. Primary Ketosis in the High-Producing Dairy Cow: Clinical and Subclinical Disorders, Treatment, Prevention, and Outlook. *J Dairy Sci*. 1982; 65: 1-10.
- Bauchart D. Lipid absorption and transport in ruminants. *J Dairy Sci*. 1993; 76: 3864-3881.
- Bäurle G, Bieber S, Hornstein O P, Nurnberg E, Muckenschnabel R. Über die Eignung von Propylenglykol (1,2-Propandiol) als antimikrobiell wirksamer Hilfsstoff für Cremesysteme. *Z Hautkr*. 1985; 60: 1198-1213.

- Bergman E N. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiol Rev.* 1990; 70: 567-590.
- Bergstrom J D, Robbins K A, Edmond J. Acetoacetyl-Coenzyme A synthetase activity in rat liver cytosol: A regulated enzyme in Lipogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1982; 106: 856-862.
- Bernabucci U, Ronchi B, Basirico L, Pirazzi D, Rueca F, Lacetera N, Nardone A. Abundance of mRNA of apolipoprotein b100, apolipoprotein e, and microsomal triglyceride transfer protein in liver from periparturient dairy cows. *J Dairy Sci.* 2004; 87: 2881-2888.
- Bertram H C, Petersen B O, Duus J, Larsen M, Raun B L, Kristensen N B. Proton nuclear magnetic resonance spectroscopy based investigation on propylene glycol toxicosis in a Holstein cow. *Acta Vet Scand.* 2009; 51: 25.
- Bjorkhem I, Miettinen T, Reihner E, Ewerth S, Angelin B, Einarsson K. Correlation between serum levels of some cholesterol precursors and activity of HMG-CoA reductase in human liver. *J Lipid Res.* 1987; 28: 1137-1143.
- Blum W F, Breier B H. Radioimmunoassays for IGFs and IGF-BPs. *Growth Regul.* 1994; 4: 11-19.
- Bobe G, Young J W, Beitz D C. Invited Review: Pathology, Etiology, Prevention, and Treatment of Fatty Liver in Dairy Cows. *J Dairy Sci.* 2004; 87: 3105-3124.
- Bouchard N C, Fulton J A, Hoffman R S. Propylene glycol accumulation after high-dose lorazepam: what have we learned? *Crit Care Med.* 2005; 33: 468.
- Brooks D E, Wallace K L. Acute propylene glycol ingestion. *J Toxicol Clin Toxicol.* 2002; 40: 513-516.
- Brown M S, Goldstein J L. A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96: 11041-11048.
- Butler S T, Pelton S H, Butler W R. Energy balance, metabolic status, and the first postpartum ovarian follicle wave in cows administered propylene glycol. *J Dairy Sci.* 2006; 89: 2938-2951.
- Calpe-Berdiel L, Escola-Gil J C, Blanco-Vaca F. New insights into the molecular actions of plant sterols and stanols in cholesterol metabolism. *Atherosclerosis.* 2009; 203: 18-31.
- Casey O M, Fitzpatrick R, McInerney J O, Morris D G, Powell R, Sreenan J M. Analysis of gene expression in the bovine corpus luteum through generation and characterisation of 960 ESTs. *Biochim Biophys Acta.* 2004; 1679: 10-17.
- Castañeda-Gutiérrez E, Pelton S H, Gilbert R O, Butler W R. Effect of peripartum dietary energy supplementation of dairy cows on metabolites, liver function and reproductive variables. *Anim Reprod Sci.* 2009; 112: 301-315.
- Chen Z, Herdt T H, Liesman J S, Ames N K, Emery R S. Reduction of bovine plasma cholesterol concentration by partial interruption of enterohepatic circulation of bile salts: a novel hypocholesterolemic model. *J Lipid Res.* 1995; 36: 1544-1556.
- Christensen J O, Grummer R R, Rasmussen F E, Bertics S J. Effect of method of delivery of propylene glycol on plasma metabolites of feed-restricted cattle. *J Dairy Sci.* 1997; 80: 563-568.

- Chung Y H, Martinez C M, Brown N E, Cassidy T W, Varga G A. Ruminal and blood responses to propylene glycol during frequent feeding. *J Dairy Sci.* 2009; 92: 4555-4564.
- Cicinnati V R, Shen Q, Sotiropoulos G C, Radtke A, Gerken G, Beckebaum S. Validation of putative housekeeping genes for gene expression studies in human hepatocellular carcinoma using real-time quantitative RT-PCR. *BMC Cancer.* 2008; 8: 350.
- Clapperton J L, Czerkawski J W. Metabolism of propane-1:2-diol infused into the rumen of sheep. *Br J Nutr.* 1972; 27: 553-560.
- Cozzi G, Berzaghi P, Gottardo F, Gabai G, Andrighetto I. Effects of feeding propylene glycol to mid-lactating dairy cows. *Anim Feed Sci Technol.* 1996; 64: 43-51.
- Czerkawski J W, Breckenridge G. Dissimilation of 1,2-propanediol by rumen microorganisms. *Br J Nutr.* 1972; 29: 317-330.
- Danfaer A, Tetens V, Agergaard N. Review and an experimental study on the physiological and quantitative aspects of gluconeogenesis in lactating ruminants. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 1995; 111: 201-210.
- Dann H M, Morin D E, Bollero G A, Murphy M R, Drackley J K. Prepartum Intake, Postpartum Induction of Ketosis, and Periparturient Disorders Affect the Metabolic Status of Dairy Cows. *J Dairy Sci.* 2005; 88: 3249-3264.
- Davis K J, Jenner P M. Toxicity of three drug solvents. *Toxicol Appl Pharm.* 1959; 1: 576-578.
- Dean M E, Stock B H. Propylene glycol as a drug solvent in the study of hepatic microsomal enzyme metabolism in the rat. *Toxicol Appl Pharm.* 1974; 28: 44-52.
- Desvergne B, Michalik L, Wahli W. Transcriptional Regulation of Metabolism. *Physiol Rev.* 2006; 86: 465-514.
- Dirksen G, Gründer H-D, Stöber M. *Innere Medizin und Chirurgie des Rindes.* 5. Aufl. Stuttgart: Parey in MVS Medizinverlage; 2006.
- Dohoo I R, Martin S W. Subclinical ketosis: prevalence and associations with production and disease. *Can J Comp Med.* 1984; 48: 1-5.
- Donkin S S, Armentano L E. Insulin and glucagon regulation of gluconeogenesis in preruminating and ruminating bovine. *J Anim Sci.* 1995; 73: 546-551.
- Dorman D C, Haschek W M. Fatal propylene glycol toxicosis in a horse. *J Am Vet Med Assoc.* 1991; 198: 1643-1644.
- Duffield T. Subclinical ketosis in lactating dairy cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 2000; 16: 231-253.
- Duffield T F, Lissemore K D, McBride B W, Leslie K E. Impact of hyperketonemia in early lactation dairy cows on health and production. *J Dairy Sci.* 2009; 92: 571-580.
- Duffield T F, Sandals D, Leslie K E, Lissemore K, McBride B W, Lumsden J H, Dick P, Bagg R. Effect of Prepartum Administration of Monensin in a Controlled-release Capsule on Postpartum Energy Indicators in Lactating Dairy Cows. *J Dairy Sci.* 1998; 81: 2354-2361.

- Edmonson A J, Lean I J, Weaver L D, Farver T, Webster G. A Body Condition Scoring Chart for Holstein Dairy Cows. *J Dairy Sci.* 1989; 72: 68-78.
- Efron B, Tibshirani R. On Testing the significance of Sets of Genes. *Ann Appl Stat.* 2007; 1: 107-129.
- Emery R S, Brown R E, Black A L. Metabolism of DL-1,2-Propanediol-2-14C in a Lactating Cow. *J Nutr.* 1967; 92: 348-356.
- Emery R S, Burg N, Brown L D, Blank G N. Detection, Occurrence, and Prophylactic Treatment of Borderline Ketosis with Propylene Glycol Feeding. *J Dairy Sci.* 1964; 47: 1074-1079.
- Emery R S, Williams J A. Incidence of Ketosis, other Diseases, and Some Postpartum Reproductive Ailments in Normal and Triiodothyronine-Treated Cows. *J Dairy Sci.* 1964; 47: 879-881.
- Emery R S, Liesman J S, Herdt T H. Metabolism of Long Chain Fatty Acids by Ruminant Liver. *J Nutr.* 1992; 122: 832-837.
- Endemann G, Goetz P G, Edmond J, Brunengraber H. Lipogenesis from ketone bodies in the isolated perfused rat liver. Evidence for the cytosolic activation of acetoacetate. *J Biol Chem.* 1982; 257: 3434-3440.
- Enjalbert F, Nicot M C, Bayourthe C, Moncoulon R. Ketone Bodies in Milk and Blood of Dairy Cows: Relationship between Concentrations and Utilization for Detection of Subclinical Ketosis. *J Dairy Sci.* 2001; 84: 583-589.
- Erb H N, Martin S W. Age, breed and seasonal patterns in the occurrence of ten dairy cow diseases: a case control study. *Can J Comp Med.* 1978; 42: 1-9.
- Erhardt W, Henke J, Kroker R. Anästhesie und Analgesie beim Klein- und Heimtier. 1. Auflage, Stuttgart: Schattauer; 2004.
- Ferguson J B, Bloch K. Purification and properties of a soluble protein activator of rat liver squalene epoxidase. *J Biol Chem.* 1977; 252: 5381-5385.
- Fincher M G. Clinical Observations in Acetonemia of Cattle. *Cornell Vet.* 1936; 26: 142-155.
- Fisher L J, Erfle J D, Lodge G A, Sauer F D. effects of propylene glycol or glycerol supplementation of the diet of dairy cows on feed intake, milk yield and composition, and incidence of ketosis. *Can J Anim Sci.* 1973; 53: 289-296.
- Fleischer P, Metzner M, Beyerbach M, Hoedemaker M, Klee W. The Relationship Between Milk Yield and the Incidence of Some Diseases in Dairy Cows. *J Dairy Sci.* 2001; 84: 2025-2035.
- Fleming G. A text-book of veterinary obstetrics: including the diseases and accidents. New York: Albert Cogswell; 1879.
- Formigoni A, Cornil M C, Prandi A, Mordenti A, Rossi A, Portetelle D, Renaville R. Effect of propylene glycol supplementation around parturition on milk yield, reproduction performance and some hormonal and metabolic characteristics in dairy cows. *J Dairy Res.* 1996; 63: 11-24.
- Foster L A. Clinical ketosis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 1988; 4: 153-267.

- Fox F H. Clinical Diagnosis and Treatment of Ketosis. *J Dairy Sci.* 1971; 54: 974-978.
- Francos G, Insler G, Dirksen G. Routine testing for mik beta-hydroxybutyrat for the detection of subclinal ketosis in dairy cows. *The Bovine Practitioner.* 1997; 31: 61-64.
- Friesen J, Rodwell V. The 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme-A (HMG-CoA) reductases. *Genome Biol.* 2004; 5: 248.
- Fronk T J, Schultz L H, Hardie A R. Effect of Dry Period Overconditioning on Subsequent Metabolic Disorders and Performance of Dairy Cows. *J Dairy Sci.* 1980; 63: 1080-1090.
- Fürll, M. Spezielle Untersuchungen beim Wiederkäuer. In: *Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin.* / W. Kraft, and U. M. Dürr (Hrsg.) 2005; Stuttgart: Schattauer. - ISBN: 3-7945-2308-3.
- Garcia R E, Moodie D S. Implications of childhood hypercholesterolemia. *Cleve Clin J Med.* 1990; 57: 715-720.
- Garcia-Ruiz C, Mari M, Colell A, Morales A, Caballero F, Montero J, Terrones O, Basanez G, Fernandez-Checa J C. Mitochondrial cholesterol in health and disease. *Histol Histopathol.* 2009; 24: 117-132.
- Geishauser T, Leslie K, Kelton D, Duffield T. Evaluation of Five Cowside Tests for Use with Milk to Detect Subclinical Ketosis in Dairy Cows. *J Dairy Sci.* 1998; 81: 438-443.
- Gentleman R, Carey V, Bates D, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S, Ellis B, Gautier L, Ge Y, Gentry J, Hornik K, Hothorn T, Huber W, Iacus S, Irizarry R, Leisch F, Li C, Maechler M, Rossini A, Sawitzki G, Smith C, Smyth G, Tierney L, Yang J, Zhang J. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol.* 2004; 5: R80.
- Gillund P, Reksen O, Grhn Y T, Karlberg K. Body Condition Related to Ketosis and Reproductive Performance in Norwegian Dairy Cows. *J Dairy Sci.* 2001; 84: 1390-1396.
- Graber M, Kohler S, Kaufmann T, Doherr M G, Bruckmaier R M, van Dorland H A. A field study on characteristics and diversity of gene expression in the liver of dairy cows during the transition period. *J Dairy Sci.* 2010; 93: 5200-5215.
- Greenfield R B, Cecava M J, Donkin S S, Williams E L, Rodriguez S M, Beitz D C, Donkin S S, Velez J C, Donkin S S, Murondoti A, Jorritsma R, Beynen A C, Wensing T, Geelen M J. Changes in mRNA expression for gluconeogenic enzymes in liver of dairy cattle during the transition to lactation. *J Dairy Sci.* 2000; 83: 1228-1236.
- Grohn Y T, Eicker S W, Hertl J A. The Association Between Previous 305-day Milk Yield and Disease in New York State Dairy Cows. *J Dairy Sci.* 1995; 78: 1693-1702.
- Grohn Y T, Erb H N, McCulloch C E, Saloniemi H S. Epidemiology of Metabolic Disorders in Dairy Cattle: Association Among Host Characteristics, Disease, and Production. *J Dairy Sci.* 1989; 72: 1876-1885.
- Gröhn Y T, Heinonen K, Lindberg L A. Fat infiltration in the liver of Finnish Ayrshire cows during early lactation. *Acta Vet Scand.* 1987; 28: 143-149.
- Grummer R R, Carroll D J. A Review of Lipoprotein Cholesterol Metabolism: Importance to Ovarian Function. *J Anim Sci.* 1988; 66: 3160-3173.

- Grummer R R, Winkler J C, Bertics S J, Studer V A. Effect of propylene glycol dosage during feed restriction on metabolites in blood of prepartum Holstein heifers. *J Dairy Sci.* 1994; 77: 3618-3623.
- Grummer R R. Nutritional and management strategies for the prevention of fatty liver in dairy cattle. *Vet J.* 2008; 176: 10-20.
- Guinard-Flament J, Delamaire E, Lambertson P, Peyraud J L. Adaptations of Mammary Uptake and Nutrient Use to Once-Daily Milking and Feed Restriction in Dairy Cows. *J Dairy Sci.* 2007; 90: 5062-5072.
- Gulati S K, Cook L J, Ashes J R, Scott T W. Effects of Feeding Protected Cholesterol on Ruminant Milk Fat Secretion. *Lipids.* 1978; 13: 814-819.
- Gupta N K, Robinson W G. The Enzymatic Conversion of Lactaldehyde to Propanediol. *J Biol Chem.* 1960; 235: 1609-1612.
- Hamada T, Goto H, Yamahira T, Sugawara T, Imaizumi K, Ikeda I. Solubility in and affinity for the bile salt micelle of plant sterols are important determinants of their intestinal absorption in rats. *Lipids.* 2006; 41: 551-556.
- Hamada T, Ishii T, Taguchi S. Blood Changes of Spontaneously Ketotic Cows Before and Four Hours After Administration of Glucose, Xylitol, 1,2-Propanediol, or Magnesium Propionate. *J Dairy Sci.* 1982; 65: 1509-1513.
- Hanzlik P J, Lehman A J, van Winkle W Jr, Kennedy N K. General metabolic and glycogenic actions of propylene glycol and some other glycols. *J Pharmacol Exp Ther.* 1939; 67: 114-126.
- Hardeng F, Edge V L. Mastitis, Ketosis, and Milk Fever in 31 Organic and 93 Conventional Norwegian Dairy Herds. *J Dairy Sci.* 2001; 84: 2673-2679.
- Harmon D L. Impact of nutrition on pancreatic exocrine and endocrine secretion in ruminants: a review. *J Anim Sci.* 1992; 70: 1290-1301.
- Hayirli A. The role of exogenous insulin in the complex of hepatic lipidosis and ketosis associated with insulin resistance phenomenon in postpartum dairy cattle. *Vet Res Commun.* 2006; 30: 749-774.
- Heitmann R N, Dawes D J, Sensenig S C. Hepatic Ketogenesis and Peripheral Ketone Body Utilization in the Ruminant. *J Nutr.* 1987; 117: 1174-1180.
- Hellerich, B. Zusammenhänge zwischen Fütterung, Haltung sowie Managmentaspekten und der Tiergesundheit in Milchviehbetrieben. [Dissertation med. vet.] Hannover: Tierärztliche Hochschule Hannover; 2008
- Heuer C, Schukken Y H, Dobbelaar P. Postpartum Body Condition Score and Results from the First Test Day Milk as Predictors of Disease, Fertility, Yield, and Culling in Commercial Dairy Herds. *J Dairy Sci.* 1999; 82: 295-304.
- Heuwieser W, Iwersen M, Gossellin J, Drillich M. Short communication: Survey of fresh cow management practices of dairy cattle on small and large commercial farms. *J Dairy Sci.* 2010; 93: 1065-1068.
- Hidalgo C O, Gomez E, Prieto L, Duque P, Goyache F, Fernandez L, Fernandez I, Facal N, Diez C. Pregnancy rates and metabolic profiles in cattle treated with propylene glycol prior to embryo transfer. *Theriogenology.* 2004; 62: 664-676.

- Hoedemaker M, Prange D, Zerbe H, Frank J, Daxenberger A, Meyer H H. Peripartal propylene glycol supplementation and metabolism, animal health, fertility, and production in dairy cows. *J Dairy Sci.* 2004; 87: 2136-2145.
- Horber H, Mäder F, Jucker H. Ketone body concentration in blood, milk and urine of healthy cows and in those with primary ketosis. *Schweiz Arch Tierheilkd.* 1980; 122: 553-564.
- Horino M, Machlin L J, Hertelendy F, Kipnis D M. Effect of Short-Chain Fatty Acids on Plasma Insulin in Ruminant and Nonruminant Species. *Endocrinology.* 1968; 83: 118-128.
- Huber W, von Heydebreck A, Sultmann H, Poustka A, Vingron M. Variance stabilization applied to microarray data calibration and to the quantification of differential expression. *Bioinformatics.* 2002; 18: S96-104.
- Huff E. The metabolism of 1,2-propanediol. *Biochim Biophys Acta.* 1961; 48: 506-517.
- Hünninger F, Staufenbiel R. Einsatz von Propylenglycol in der Milchviehfütterung. *Prakt Tierarzt.* 1999; 80: 694-697.
- Itoh N, Koiwa M, Hatsugaya A, Yokota H, Taniyama H, Okada H, Kudo K. Comparative Analysis of Blood Chemical Values in Primary Ketosis and Abomasal Displacement in Cows. *Zentralbl Veterinarmed A.* 1998; 45: 293.
- Iwersen M. Einfluss von Propylenglykol als Bestandteil einer Totalen Mischration während der Früh-laktation auf die Tier- und Stoffwechselfgesundheit sowie auf Leistungsparameter von Milchkühen. [Dissertation med. vet.] Berlin: Freie Univ. Berlin, 2010.
- Iwersen M, Falkenberg U, Voigtsberger R, Forderung D, Heuwieser W. Evaluation of an electronic cowside test to detect subclinical ketosis in dairy cows. *J Dairy Sci.* 2009; 92: 2618-2624.
- Johnson R B. The treatment of ketosis with glycerol and propylene glycol. *Cornell Vet.* 1954; 44: 6-21.
- Jorens P G, Demey H E, Schepens P J, Coucke V, Verpooten G A, Couttenye M M, Van H, V. Unusual D-lactic acid acidosis from propylene glycol metabolism in overdose. *J Toxicol Clin Toxicol.* 2004; 42: 163-169.
- Juchem S O, Santos F A, Imaizumi H, Pires A V, Barnabe E C. Production and blood parameters of Holstein cows treated prepartum with sodium monensin or propylene glycol. *J Dairy Sci.* 2004; 87: 680-689.
- Kappel L C, Ingraham R H, Morgan E B, Zeringue L, Wilson D, Babcock D K. Relationship between fertility and blood glucose and cholesterol concentrations. *Am J Vet Res.* 1984; 45: 2607-12
- Kelly J M. Changes in serum B hydroxybutyrate concentrations in dairy cows kept under commercial farm conditions. *Vet Rec.* 1977; 101: 499-502.
- Kelner M J, Bailey D N. Propylene glycol as a cause of lactic acidosis. *J Anal Toxicol.* 1985; 9: 40-42.
- Koundakjian P P, Snoswell A M. Ketone body and fatty acid metabolism in sheep tissues. 3-Hydroxybutyrate dehydrogenase, a cytoplasmic enzyme in sheep liver and kidney. *Biochem J.* 1970; 119: 49-57.

- Kraft W, Dürr D U. Kapitel 13, Leber. In: Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin. / W. Kraft, and U. M. Dürr (Hrsg.) 2005; Stuttgart: Schattauer. - ISBN: 3-7945-2308-3. S. 145-153.
- Kristensen N B, Danfaer A, Rojen B A, Raun B M, Weisbjerg M R, Hvelplund T. Metabolism of propionate and 1,2-propanediol absorbed from the washed reticulorumen of lactating cows. *J Anim Sci.* 2002; 80: 2168-2175.
- Kristensen N B, Raun B M L. Ruminal and Intermediary Metabolism of Propylene Glycol in Lactating Holstein Cows. *J Dairy Sci.* 2007; 90: 4707-4717.
- Kristensen N B, Storm A, Raun B M L, Rojen B A, Harmon D L. Metabolism of Silage Alcohols in Lactating Dairy Cows. *J Dairy Sci.* 2007; 90: 1364-1377.
- Kronfeld D S, Raggi F, Ramberg C F. Mammary blood flow and ketone body metabolism in normal, fasted, and ketotic cows. *Am J Physiol.* -- Legacy Content. 1968; 215: 218-227.
- Lembcke J, Ceglarek U, Fiedler G M, Baumann S, Leichtle A, Thiery J. Rapid quantification of free and esterified phytosterols in human serum using APPI-LC-MS/MS. *J Lipid Res.* 2005; 46: 21-26.
- Leng R A. Glucose synthesis in ruminants. *Adv Vet Sci Comp Med.* 1970; 14: 209-260.
- Lessmann H, Schnuch A, Geier J, Uter W. Skin-sensitizing and irritant properties of propylene glycol. *Contact Dermatitis.* 2005; 53: 247-259.
- Liu G W, Zhang Z G, Wang J G, Wang Z, Xu C, Zhu X L. Insulin Receptor Gene Expression in Normal and Diseased Bovine Liver. *J Comp Pathol.* 2010; 143: 258-261.
- Löffler G, Petrides P. *Biochemie und Pathobiochemie.* 8. Aufl. Berlin: Springer-Verlag; 2006.
- Loor J J, Dann H M, Everts R E, Oliveira R, Green C A, Guretzky N A J, Rodriguez-Zas S L, Lewin H A, Drackley J K. Temporal gene expression profiling of liver from periparturient dairy cows reveals complex adaptive mechanisms in hepatic function. *Physiol Genomics.* 2005; 23: 217-226.
- Loor J J, Everts R E, Bionaz M, Dann H M, Morin D E, Oliveira R, Rodriguez-Zas S L, Drackley J K, Lewin H A. Nutrition-induced ketosis alters metabolic and signaling gene networks in liver of periparturient dairy cows. *Physiol Genomics.* 2007; 32: 105-116.
- Lund, E., Sisfontes, L., Reihner, E., and Bjorkhem, I. Determination of serum levels of unesterified lathosterol by isotope dilution-mass spectrometry. *Scand J Clin Lab Inv.* 1989; 49: 165-171.
- Lutjohann D, Bjorkhem I, Beil U F, von Bergmann K. Sterol absorption and sterol balance in phytosterolemia evaluated by deuterium-labeled sterols: effect of sitostanol treatment. *J Lipid Res.* 1995; 36: 1763-1773.
- Mackay J. Acetonemia in dairy cattle. *Vet Rec.* 1943; 55: 455.

- Malchau I. Vergleichende Untersuchungen zu den Auswirkungen einer Verabreichung von Propylenglykol, Glycerin und L-Carnitin auf den Stoffwechsel und verschiedene Leistungsparameter von Milchkühen im Rahmen der Ketoseprophylaxe. [Dissertation med. vet.] Berlin: Freie Univ. Berlin, 2011.
- Maplesden D C. Propylene Glycol In The Treatment Of Ketosis. *Can J Comp Med Vet Sci.* 1954; 18: 287-293.
- Markusfeld O, Galon N, Ezra E. Body condition score, health, yield and fertility in dairy cows. *Vet Rec.* 1997; 141: 67-72.
- McClanahan S, Hunter J, Murphy M, Valberg S. Propylene glycol toxicosis in a mare. *Vet Hum Toxicol.* 1998; 40: 294-296.
- McIntosh R A. Acetonemia-Ketosis. *Can J Comp Med Vet Sci.* 1944; 8: 227-232.
- Miettinen P. Propylene glycol in prevention of bovine ketosis. *Acta Vet Scand Suppl.* 1993; 89: 135-136.
- Miyoshi S, Pate J L, Palmquist D L. Effects of propylene glycol drenching on energy balance, plasma glucose, plasma insulin, ovarian function and conception in dairy cows. *Anim Reprod Sci.* 2001; 68: 29-43.
- Moallem U, Katz M, Arieli A, Lehrer H. Effects of Peripartum Propylene Glycol or Fats Differing in Fatty Acid Profiles on Feed Intake, Production, and Plasma Metabolites in Dairy Cows. *J Dairy Sci.* 2007a; 90: 3846-3856.
- Moallem U, Katz M, Lehrer H, Livshitz L, Yakoby S. Role of Peripartum Dietary Propylene Glycol or Protected Fats on Metabolism and Early Postpartum Ovarian Follicles. *J Dairy Sci.* 2007b; 90: 1243-1254.
- Moon P F. Acute toxicosis in two dogs associated with etomidate-propylene glycol infusion. *Lab Anim Sci.* 1994; 44: 590-594.
- Needham L L, Hill R H, Orti D L, Felver M E, Liddle J A. Electron-capture, capillary column gas chromatographic determination of low-molecular-weight diols in serum. *J Chromatogr.* 1982; 223: 9-17.
- Nielen M, Aarts M G, Jonkers A G, Wensing T, Schukken Y H. Evaluation of two cow-side tests for the detection of subclinical ketosis in dairy cows. *Can Vet J.* 1994; 35: 229-232.
- Nielsen N I, Ingvartsen K L. Propylene glycol for dairy cows: A review of the metabolism of propylene glycol and its effects on physiological parameters, feed intake, milk production and risk of ketosis. *Anim Feed Sci Technol.* 2004; 115: 191-213.
- Nocek J E, English J E, Braund D G. Effects of Various Forage Feeding Programs During Dry Period on Body Condition and Subsequent Lactation Health, Production, and Reproduction. *J Dairy Sci.* 1983; 66: 1108-1118.
- O'Brien R M, Granner D K. PEPCK gene as model of inhibitory effects of insulin on gene transcription. *Diabetes Care.* 1990; 13: 327-339.
- O'Brien R M, Streeper R S, Ayala J E, Stadelmaier B T, Hornbuckle L A. Insulin-regulated gene expression. *Biochem Soc Trans.* 2001; 29: 552-558.

- Osteras O, Solbu H, Refsdal A O, Roalkvam T, Filseth O, Minsaas A. Results and Evaluation of Thirty Years of Health Recordings in the Norwegian Dairy Cattle Population. *J Dairy Sci.* 2007; 90: 4483-4497.
- Ott D B, Lachance P A. Biochemical controls of liver cholesterol biosynthesis. *Am J Clin Nutr.* 1981; 34: 2295-2306.
- Patel S B, Honda A, Salen G. Sitosterolemia: exclusion of genes involved in reduced cholesterol biosynthesis. *J Lipid Res.* 1998; 39: 1055-1061.
- Pfaffl M W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucl Acids Res.* 2001; 29: e45.
- Pickett M M, Piepenbrink M S, Overton T R. Effects of propylene glycol or fat drench on plasma metabolites, liver composition, and production of dairy cows during the periparturient period. *J Dairy Sci.* 2003; 86: 2113-2121.
- Pintchuk P A, Galey F D, George L W. Propylene glycol toxicity in adulte dairy cows. Research Abstract Program of the 11<sup>th</sup> Annual ACVIM Forum; *J Vet Intern Med.* 1993; 7: 150.
- Powers L, Ciralo S T, Agarwal K C, Kumar A, Bomont C, Soloviev M V, David F, Desrochers S, Brunengraber H. Assay of the Enantiomers of 1,2-Propanediol, 1,3-Butanediol, 1,3-Pentanediol, and the Corresponding Hydroxyacids by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Anal Biochem.* 1994; 221: 323-328.
- R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2005. URL <http://www.R-project.org>. ISBN 3-900051-07-0.
- Radloff H D, Schultz L H. Blood and Rumen Changes in Cows in Early Stages of Ketosis. *J Dairy Sci.* 1967; 50: 68-72.
- Radonic A, Thulke S, Mackay I M, Landt O, Siegert W, Nitsche A. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochem Bioph Res Co.* 2004; 313: 856-862.
- Raun B M, Røjen B, Kristensen N B. Absorption and metabolism of propylene glycol, propanal, and n-propanol in dairy cows dosed intraruminally with propylene glycol. *J Dairy Sci.* 2005; 88: 58.
- Ruddick J A. Toxicology, metabolism, and biochemistry of 1,2-propanediol. *Toxicol Appl Pharm.* 1972; 21: 102-111.
- Ruegg P L, Milton R L. Body Condition Scores of Holstein Cows on Prince Edward Island, Canada: Relationships with Yield, Reproductive Performance, and Disease. *J Dairy Sci.* 1995; 78: 552-564.
- Sauer, F. D., Erfle, J. D., and Fisher, L. J. Propylene Glycol and Glycerol as a feed additive for lactating dairy cows: an evaluation of blood metabolite parameters. *Can J Anim Sci.* 1973; 53: 265-271.
- Schlegel G, Ringseis R, Keller J, Schwarz F J, Eder K. Changes in the expression of hepatic genes involved in cholesterol homeostasis in dairy cows in the transition period and at different stages of lactation. *J Dairy Sci.* 2012; 95: 3826-3836.

- Schnier C, Hielm S, Saloniemi H S. Comparison of the disease incidences of Finnish Ayrshire and Finnish Black and White dairy cows. *Prev Vet Med.* 2004; 62: 285-298.
- Schultz L H. Symposium: Herd Health: Ketosis in Dairy Cattle. *J Dairy Sci.* 1968; 51: 1133-1140.
- Schultz L H. Management and Nutritional Aspects of Ketosis. *J Dairy Sci.* 1971; 54: 962-973.
- Seidenfeld, M. A and Hanzlik, P. J. The general properties, actions and toxicity of propylene glycol. *J Pharmacol Exp Ther.* 1932; 44: 109-121.
- Selenka F. Die Wirkung von Propylenglycol (1,2 Propandiol) auf Bakterien. Beeinflussung der Wachstumsrate im flüssigen Medium. *Arch Hyg Bakteriol.* 1963; 147: 189-200.
- Shapiro D J, Rodwell V W. Regulation of Hepatic 3-Hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A Reductase and Cholesterol Synthesis. *J Biol Chem.* 1971; 246: 3210-3216.
- Shaw J C. Ketosis in Dairy Cattle. A Review. *J Dairy Sci.* 1956; 39: 402-434.
- Simianer H, Solbu H, Schaeffer L R. Estimated Genetic Correlations Between Disease and Yield Traits in Dairy Cattle. *J Dairy Sci.* 1991; 74: 4358-4365.
- Singh D K, Mokashi V, Elmore C L, Porter T D. Phosphorylation of Supernatant Protein Factor Enhances Its Ability to Stimulate Microsomal Squalene Monooxygenase. *J Biol Chem.* 2003; 278: 5646-5651.
- Sjollema, B. and Van der Zande, J. E. Metabolism of milk cows. *J Metabol Res.* 1923; IV: 525.
- Smith K L, Waldron M R, Ruzzi L C, Drackley J K, Socha M T, Overton T R. Metabolism of Dairy Cows as Affected by Prepartum Dietary Carbohydrate Source and Supplementation with Chromium Throughout the Periparturient Period. *J Dairy Sci.* 2008; 91: 2011-2020.
- Spiekers H, Potthast V, Nussbaum H. Erfolgreiche Milchviehfütterung. 5. Aufl. Frankfurt: DLG-Verlags-GmbH; 2009.
- Studer V A, Grummer R R, Bertics S J, Reynolds C K. Effect of prepartum propylene glycol administration on periparturient fatty liver in dairy cows. *J Dairy Sci.* 1993; 76: 2931-2939.
- Suzuki M, Xiang T, Ohyama K, Seki H, Saito K, Muranaka T, Hayashi H, Katsube Y, Kushiro T, Shibuya M, Ebizuka Y. Lanosterol synthase in dicotyledonous plants. *Plant Cell Physiol.* 2006; 47: 565-571.
- Tilvis R S, Miettinen T A. Serum plant sterols and their relation to cholesterol absorption. *Am J Clin Nutr.* 1986; 43: 92-97.
- Trabue S, Scoggin K, Tjandrakusuma S, Rasmussen M A, Reilly P J. Ruminal Fermentation of Propylene Glycol and Glycerol. *J Agr Food Chem.* 2007; 55: 7043-7051.
- Tranquada R E. Lactic acidosis. *Calif Med.* 1964; 101: 450-461.
- Udall D H. The practice of veterinary medicine. 4th Ithaca, New York: published by the author; 1943.

- van den Berg R, Haenen G R M M, van den Berg H, Bast A. Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. *Food Chemistry*. 1999; 66: 511-517.
- Van den Top A M, Wensing T, Geelen M J, Wentink G H, van't Klooster A T, Beynen A C. Time trends of plasma lipids and enzymes synthesizing hepatic triacylglycerol during postpartum development of fatty liver in dairy cows. *J Dairy Sci*. 1995; 78: 2208-2220.
- van Dorland H A, Richter S, Morel I, Doherr M G, Castro N, Bruckmaier R M. Variation in hepatic regulation of metabolism during the dry period and in early lactation in dairy cows. *J Dairy Sci*. 2009; 92: 1924-1940.
- van Knegsel A T M, van den Brand H, Graat E A M, Dijkstra J, Jorritsma R, Decuypere E, Tamminga S, Kemp B. Dietary energy Source in Dairy Cows in Early Lactation: Metabolites and Metabolic Hormones. *J Dairy Sci*. 2007; 90: 1477-1485.
- Veenhuizen J J, Drackley J K, Richard M J, Sanderson T P, Miller L D, Young J W. Metabolic changes in blood and liver during development and early treatment of experimental fatty liver and ketosis in cows. *J Dairy Sci*. 1991; 74: 4238-4253.
- Vernon R G. Lipid metabolism during lactation: a review of adipose tissue-liver interactions and the development of fatty liver. *J Dairy Res*. 2005; 72: 460-469.
- Vituro E, Koenning M, Kroemer A, Schlamberger G, Wiedemann S, Kaske M, Meyer H H D. Cholesterol synthesis in the lactating cow: Induced expression of candidate genes. *J Steroid Biochem*. 2009; 115: 62-67.
- Walker N J. A Technique Whose Time Has Come. *Science*. 2002; 296: 557-559.
- Waltner S S, McNamara J P, Hillers J K. Relationships of Body Condition Score to Production Variables in High Producing Holstein Dairy Cattle. *J Dairy Sci*. 1993; 76: 3410-3419.
- Waterman R, Schwalm J W, Schultz L H. Nicotinic Acid Treatment of Bovine Ketosis I. Effects on Circulatory Metabolites and Interrelationships. *J Dairy Sci*. 1972; 55: 1447-1453.
- Weihrauch, J. L. and Gardner, J. M. Sterol content of foods of plant origin. *J Am Diet Assoc*. 1978; 73: 39-47.
- Whitaker, D. A., Kely, J. M., and Smith, E. J. Subclinical ketosis and serum beta-hydroxybutyrate levels in dairy cattle. *Br Vet J*. 1983; 139: 462-463.
- Whitaker D A, Macrae A I, Burrough E. Disposal and disease rates in British dairy herds between April 1998 and March 2002. *Vet Rec*. 2004; 155: 43-47.
- White L W, Rudney H. Biosynthesis of 3-hydroxy-3-methylglutarate and mevalonate by rat liver homogenates in vitro. *Biochemistry*. 1970; 9: 2713-2724.
- Wilson Claire, Pepper DS, Miller CJ. QC and Affymetrix Data. 2008. URL <http://bioinformatics.picr.man.ac.uk/simpleaffy/QCandSimpleaffy.pdf>
- Wurtz C. *Elements of modern chemistry*. 1859; 5th Edition, 586.
- Xu Z, Le K, Moghadasian M H. Long-term phytosterol treatment alters gene expression in the liver of apo E-deficient mice. *J Nutr Biochem*. 2008; 19: 545-554.

- Yamamoto T, Adachi Y. Effect of oral administration of propylene glycol on the induction of enzymes and proteins in microsomes and cytosol of the rat liver. *Gastroenterol Jpn.* 1978; 13: 359-365.
- Yang C, Yu L, Li W, Xu F, Cohen J C, Hobbs H H. Disruption of cholesterol homeostasis by plant sterols. *J Clin Invest.* 2004; 114: 813-822.
- Yeagle P L. Cholesterol and the cell membrane. *Biochim Biophys Acta.* 1985; 822: 267-287.
- Young J W. Gluconeogenesis in Cattle: Significance and Methodology. *J Dairy Sci.* 1977; 60: 1-15.
- Zar T, Graeber C, Perazella M A. Recognition, treatment, and prevention of propylene glycol toxicity. *Semin Dial.* 2007; 20: 217-219.

## 9 Anhang

### Anhang 1

Zusammensetzung von 1kg des Mineralfutter SN 2260 für Kühe der Fa. SN Neuruppin

#### Analytische Bestandteile und Gehalte:

18,0% Calcium  
8,8% Natrium  
5,4% Phosphor  
4,0% Magnesium

#### Zusatzstoffe:

450.000 I.E. Vitamin A  
50.000 I.E. Vitamin D3  
5.450 mg Vitamin E ( $\alpha$  Tocopherolacetat)  
2.700 mg Eisen (E1, Eisen-(II)-carbonat)  
2.500 mg Mangan (E5, Mangan-(II)-oxid)  
750 mg Kupfer (E4, Kupfer-(II)-sulfat, Pentahydrat)  
40 mg Kobalt (E3, Kobalt-(II)-sulfat, Heptahydrat)  
3.000 mg Zink (E6, Zinkoxid)  
720 mg Zink (E6, Glycin-Zinkchelate, Hydrat)  
25 mg Jod (E2, Calciumjodat, wasserfrei)  
17 mg Selen (E8, Natriumselenit)

#### Zusammensetzung:

Calciumcarbonat, Natriumchlorid, Monocalciumphosphat, Magnesiumsulfat, Calcium-Magnesiumcarbonat, Calcium-Natriumphosphat, Magnesiumoxid, Zuckerrübenmelasse

**Tabelle Anhang 2** Auflistung der Gene der stoffwechselwegbezogenen Mikroarrayuntersuchung, sortiert nach ausgewählten Stoffwechselwegen.

Affymetrix Bezeichnung	Abkürzung	Name
Cholesterin Synthese		
Bt.22763.1.S1_at	HMGCS	Hydroxymethylglutaryl-CoA Synthase 1
Bt.22763.2.S1_a_at	HMGCS	Hydroxymethylglutaryl-CoA Synthase 1
Bt.11465.1.S1_at	HMGCR	Hydroxymethylglutaryl-CoA Reduktase
Bt.26959.1.A1_at	MVK	Mevalonat Kinase
Bt.26959.2.S1_at	MVK	Mevalonat Kinase
Bt.22207.1.S1_at	PMVK	Phosphomevalonat Kinase
Bt.3884.1.S1_at	MVD	Diphosphomevalonate Decarboxylase
Bt.3884.2.S1_at	MVD	Diphosphomevalonate Decarboxylase
Bt.3764.1.S1_at	IDI1	Isopentenyl-diphosphate delta isomerase 1
Bt.23182.1.S1_at	FDPS	Farnesyl Diphosphate Synthase
Bt.21724.2.S1_a_at	FDFT1	Farnesyl-diphosphate farnesyltransferase 1
Bt.21724.3.A1_at	FDFT1	Farnesyl-diphosphate farnesyltransferase 1
Bt.21724.1.S1_at	FDFT1	Farnesyl-diphosphate farnesyltransferase 1
Bt.9767.1.S1_a_at	SQLE	Squalene Epoxidase
Bt.29302.1.A1_at	SQLE	Squalene Epoxidase
Bt.17801.1.A1_at	LSS	Lanosterol Synthase
Bt.621.1.S1_at	CYP51A1	Lanosterol 14-alpha demethylase
Bt.9126.1.S1_at	SC5DL	Sterol-C5-desaturase
Bt.5449.1.S1_at	DHCR7	7-Dehydrocholesterol Reductase
Ketonkörper Synthese		
Bt.9689.1.A1_at	HMGCS2	3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 2
Bt.3357.1.S1_at	HMGCL	3-Hydroxymethyl-3-methylglutaryl-Coenzyme A lyase
Bt.9777.1.S1_at	BDH	3-Hydroxybutyrate Dehydrogenase
Ketonkörper Abbau		
Bt.9777.1.S1_at	BDH	3-Hydroxybutyrat Dehydrogenase
Gluconeogenese		
Bt.23154.1.S1_at		Glucose-6-Phosphatase
Bt.13505.1.S1_at	GPI	Glucose phosphate Isomerase
Bt.13428.1.S1_at	FBP	Fructose-1,6-bisphosphatase
Bt.13428.2.S1_at	FBP1	Fructose-1,6-bisphosphatase 1
Bt.28208.1.S1_at	FBP2	Fructose-1,6-bisphosphatase 2
Bt.22533.1.S1_at	ALDOA	Fructose-bisphosphate Aldolase A
Bt.5125.1.S1_at	ALDOB	Fructose-bisphosphate Aldolase B
Bt.4837.1.A1_at	ALDOC	Fructose-bisphosphate Aldolase C
Bt.8293.1.S1_at	GAPDH	Glycerinaldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase
AFFX-Bt-gapd-5_at	GAPDH	Glycerinaldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase

<b>AFFX-Bt-gapd-M_at</b>	GAPDH	Glycerinaldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase
<b>AFFX-Bt-gapd-3_at</b>	GAPDH	Glycerinaldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase
<b>Bt.6091.1.S1_at</b>	GAPDH	Glycerinaldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase
<b>Bt.5252.1.S1_at</b>	PGAM1	Phosphoglycerate mutase 1
<b>Bt.20090.1.S1_at</b>	ENO2	Enolase 2
<b>Bt.12768.1.S1_at</b>	PCK1	Phosphoenolpyruvate carboxykinase 1
<b>Bt.12769.1.S1_at</b>	PCK2	Phosphoenolpyruvate carboxykinase 2
<b>Bt.5345.1.S1_at</b>	MDH1	Malate dehydrogenase 1
<b>Bt.26829.1.S1_at</b>	MDH1	Malate Dehydrogenase 1
<b>Bt.7915.1.S1_at</b>	MDH2	Malate dehydrogenase 2
<b>Bt.24594.1.A1_at</b>	MDH3	Malate Dehydrogenase 3
<b>Bt.24594.2.S1_at</b>	MDH3	Malate Dehydrogenase 3
<b>Bt.24594.3.A1_at</b>	MDH3	Malate Dehydrogenase 3
<b>Bt.12339.3.S1_a_at</b>	PC	Pyruvate carboxylase
<b>Bt.12339.3.A1_at</b>	PC	Pyruvate carboxylase
<b>Bt.12339.1.S1_at</b>	PC	Pyruvate carboxylase
Glycolyse		
<b>Bt.9225.1.A1_at</b>	HK3	Hexokinase 3
<b>Bt.5061.1.S1_at</b>	PFK	Phosphofruktokinase
<b>Bt.3794.1.S1_at</b>	PFK	Phosphofruktokinase
<b>Bt.2347.3.S1_a_at</b>	PFK	Phosphofruktokinase
<b>Bt.23399.1.S1_at</b>	PK	Pyruvate kinase
<b>Bt.12736.1.A1_at</b>	PK	Pyruvate kinase
<b>Bt.23399.1.S1_at</b>	PK	Pyruvate kinase
<b>Bt.12736.1.A1_at</b>	PK	Pyruvate kinase
<b>Bt.29746.1.A1_at</b>	PDHA1	Pyruvate dehydrogenase alpha 1
<b>Bt.29746.1.S1_at</b>	PDHA1	Pyruvate dehydrogenase alpha 1
<b>Bt.19415.1.A1_at</b>	PDHA1	Pyruvate dehydrogenase alpha 1
<b>Bt.2973.2.S1_a_at</b>	PDHB	Pyruvate dehydrogenase beta
<b>Bt.2973.3.A1_at</b>	PDHB	Pyruvate dehydrogenase beta
<b>Bt.19866.1.A1_at</b>	PDP2	Pyruvate dehydrogenase phosphatase 2
<b>Bt.23505.1.S1_at</b>	PDK4	Pyruvate dehydrogenase kinase
<b>Bt.13505.1.S1_at</b>	GPI	Glucose phosphate isomerase
<b>Bt.22533.1.S1_at</b>	ALDOA	Fructose-bisphosphate Aldolase A
<b>Bt.5125.1.S1_at</b>	ALDOB	Fructose-bisphosphate Aldolase B
<b>Bt.4837.1.A1_at</b>	ALDOC	Fructose-bisphosphate Aldolase C
<b>Bt.8293.1.S1_at</b>	GAPDH	Glycerinaldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase
<b>AFFX-Bt-gapd-5_at</b>	GAPDH	Glycerinaldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase
<b>AFFX-Bt-gapd-M_at</b>	GAPDH	Glycerinaldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase
<b>AFFX-Bt-gapd-3_at</b>	GAPDH	Glycerinaldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase
<b>Bt.6091.1.S1_at</b>	GAPDH	Glycerinaldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase
<b>Bt.5252.1.S1_at</b>	PGAM1	Phosphoglycerate mutase 1
<b>Bt.20090.1.S1_at</b>	ENO2	Enolase 2

Pentosephosphatweg		
<b>Bt.29913.1.S1_at</b>	G6PD	Glucose-6-phosphate dehydrogenase
<b>Bt.23084.1.S1_at</b>	PGLS	6-phosphogluconolactonase
<b>Bt.1244.1.S1_at</b>	PGD	Phosphogluconate dehydrogenase
<b>Bt.20216.3.S1_a_at</b>	RPIA	Ribose 5-phosphate isomerase A
<b>Bt.20216.2.S1_at</b>	RPIA	Ribose 5-phosphate isomerase A
Propionat-Abbau		
<b>Bt.620.1.S1_at</b>	PCCA	Propionyl Coenzyme A carboxylase
<b>Bt.5108.1.S1_at</b>	PCCB	Propionyl Coenzyme A carboxylase
<b>Bt.7169.1.S1_at</b>	MCM	Methylmalonyl Coenzyme A mutase
<b>Bt.16108.1.A1_at</b>	MCEE	Methylmalonyl CoA epimerase
PG -Alkohol-Stoffwechsel		
<b>Bt.9697.1.A1_at</b>	ADH6	Alcohol dehydrogenase 6
<b>Bt.4449.1.S1_at</b>	AKR1A1	Aldo-keto reductase family 1, member A1
<b>Bt.18564.1.A1_at</b>	ADH1C	Alcohol dehydrogenase 1C
<b>Bt.18564.2.A1_at</b>	ADH1C	Alcohol dehydrogenase 1C
<b>Bt.19521.1.A1_at</b>	ADH4	Alcohol dehydrogenase 4
<b>Bt.2561.1.S1_at</b>	ADH5	Alcohol dehydrogenase 5
<b>Bt.14188.1.A1_at</b>	ADH5	Alcohol dehydrogenase 5
<b>Bt.4732.1.S1_at</b>	ALDH1A1	Aldehyde dehydrogenase 1 family, member A1
<b>Bt.19093.1.S1_at</b>	ALDH1A2	Aldehyde dehydrogenase 1 family, member A2
<b>Bt.13145.1.S1_at</b>	ALDH1B1	Aldehyde dehydrogenase 1 family, member B1
<b>Bt.4659.1.S1_at</b>	ALDH2	Aldehyde dehydrogenase 2
<b>Bt.21822.1.S1_at</b>	ALDH3B1	Aldehyde dehydrogenase 3 family, member B1
<b>Bt.21822.2.S1_at</b>	ALDH3B1	Aldehyde dehydrogenase 3 family, member B1
<b>Bt.29495.1.A1_at</b>	ALDH5A1	Aldehyde dehydrogenase 5 family, member A1
<b>Bt.2173.1.S1_at</b>	ALDH5A1	Aldehyde dehydrogenase 5 family, member A1
<b>Bt.436.1.S1_at</b>	ALDH6A1	Aldehyde dehydrogenase 6 family, member A1
<b>Bt.16137.1.S1_at</b>	ALDH9A1	Aldehyde dehydrogenase 9 family, member A1
<b>Bt.7760.1.S1_at</b>	GLO1	Glyoxalase I
<b>Bt.3809.2.S1_a_at</b>	LDHA	Lactate dehydrogenase A
<b>Bt.3809.1.S1_at</b>	LDHA	Lactate dehydrogenase A
<b>Bt.3005.1.S1_at</b>	LDHB	Lactate dehydrogenase B
<b>Bt.17791.1.A1_at</b>	LDHC	Lactate dehydrogenase C
β-Oxidation		
<b>Bt.24210.1.S1_at</b>	ACSL1	Acyl-CoA synthetase long-chain family member 1
<b>Bt.17121.1.S1_at</b>	ACSL3	Acyl-CoA synthetase long-chain family member 3
<b>Bt.15886.1.S1_at</b>	ACSL5	Acyl-CoA synthetase long-chain family member 5
<b>Bt.11904.1.S1_at</b>	ACSL6	Acyl-CoA synthetase long-chain family member 6
<b>Bt.11770.1.S1_a_at</b>	CACT	Carnitine/acylcarnitine translocase

<b>Bt.11770.1.S1_at</b>	CACT	Carnitine/acylcarnitine translocase
<b>Bt.21113.1.S1_a_at</b>	CPT1B	Carnitine palmitoyltransferase 1B
<b>Bt.7806.1.A1_at</b>	CPT1C	Carnitine palmitoyltransferase 1C
<b>Bt.4599.1.S1_at</b>	CROT	Carnitine O-octanoyltransferase
<b>Bt.1065.1.S1_at</b>	CPT2	Carnitine palmitoyltransferase 2
<b>Bt.21015.1.S1_at</b>	CRAT	Carnitine acetyltransferase
<b>Bt.5218.1.S1_at</b>	ECHS1	Enoyl Coenzyme A hydratase
<b>Bt.23607.1.S1_at</b>	HADH	Hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase
<b>Bt.5231.1.S1_at</b>	HADH	Hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase
<b>Bt.2050.1.A1_at</b>	ACAA1	Acetyl-Coenzyme A acyltransferase 1
<b>Bt.23569.1.S1_at</b>	ACAA2	Acetyl-Coenzyme A acyltransferase 2
<b>Bt.7237.2.S1_a_at</b>	HADHA	Hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase
<b>Bt.832.1.S1_at</b>	HADHA	Hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase
Fettsäure-Synthese		
<b>Bt.22854.2.S1_at</b>	FASN	Fatty acid synthase
<b>Bt.4735.1.S1_at</b>	ACACA	Acetyl-coenzyme A carboxylase alpha
<b>Bt.4735.1.S2_at</b>	ACACA	Acetyl-coenzyme A carboxylase alpha
Fettsäure-Aktivierung		
<b>Bt.12640.1.S1_at</b>	ACSS2	Acyl-CoA synthetase short-chain family member 2
<b>Bt.17231.1.A1_at</b>	ACSM2A	Acyl-CoA synthetase medium-chain family member 2A
<b>Bt.29947.1.S1_at</b>	AACS	Acetoacetyl-CoA synthetase
<b>Bt.29947.2.S1_at</b>	AACS	Acetoacetyl-CoA synthetase
Citratcyclus		
<b>Bt.1129.1.S1_at</b>	CS	Citrate synthase
<b>Bt.1129.2.S1_at</b>	CS	Citrate synthase
<b>Bt.5210.1.S1_at</b>	ACO2	Aconitase 2
<b>Bt.13324.1.S1_a_at</b>	IDH1	Isocitrate dehydrogenase 1
<b>Bt.13324.4.S1_at</b>	IDH1	Isocitrate dehydrogenase 1
<b>Bt.5520.1.S1_at</b>	IDH2	Isocitrate dehydrogenase 2
<b>Bt.13324.2.S1_a_at</b>	IDH3	Isocitrate dehydrogenase 3
<b>Bt.23357.1.S1_at</b>	IDH3	Isocitrate dehydrogenase 3
<b>Bt.26154.1.A1_at</b>	IDH	Isocitrate dehydrogenase
<b>Bt.12910.1.S1_at</b>	OGDH	Oxoglutarate dehydrogenase
<b>Bt.2711.1.S1_at</b>	SUCLG1	Succinate-CoA ligase
<b>Bt.23260.1.S1_at</b>	SUCLG2	Succinate-CoA ligase
<b>Bt.16217.1.A1_at</b>	SUCLA2	Succinate-CoA ligase
<b>Bt.5033.1.S1_at</b>	SDHA	Succinate dehydrogenase complex
<b>Bt.4677.1.S1_at</b>	SDHD	Succinate dehydrogenase complex
<b>Bt.13128.1.S1_at</b>	SDHB	Succinate dehydrogenase complex
<b>Bt.29030.1.A1_at</b>	SDHA	Succinate dehydrogenase complex
<b>Bt.13170.1.S1_at</b>	SDHC	Succinate dehydrogenase complex

<b>Bt.2587.2.S1_a_at</b>	FH	Fumarate hydratase
<b>Bt.2587.1.S1_at</b>	FH	Fumarate hydratase
<b>Bt.5345.1.S1_at</b>	MDH1	Malate dehydrogenase 1
<b>Bt.26829.1.S1_at</b>	MDH1	Malate dehydrogenase 1
<b>Bt.7915.1.S1_at</b>	MDH2	Malate dehydrogenase 2
<b>Bt.24594.1.A1_at</b>	MDH3	Malate dehydrogenase 3
<b>Bt.24594.2.S1_at</b>	MDH3	Malate dehydrogenase 3
<b>Bt.24594.3.A1_at</b>	MDH3	Malate dehydrogenase 3
Insulinrezeptor-assoziierte Proteine		
<b>Bt.21193.1.S1_at</b>	CBLC	Cas-Br-M ecotropic retroviral transforming sequence c
<b>Bt.16056.1.A1_at</b>	CBLC	Cas-Br-M ecotropic retroviral transforming sequence c
<b>Bt.16056.2.S1_at</b>	CBLC	Cas-Br-M ecotropic retroviral transforming sequence c
<b>Bt.23034.1.S1_at</b>	CRKL	Crk-like protein
<b>Bt.23034.2.S1_at</b>	CRKL	Crk-like protein
<b>Bt.26529.1.S1_at</b>	DOK1	Docking protein 1
<b>Bt.20119.1.S1_at</b>	GRAP	GRB2-related adaptor protein
<b>Bt.8815.1.S1_at</b>	GRB2	Growth factor receptor-bound protein 2
<b>Bt.453.1.S1_at</b>	INS	Insulin
<b>Bt.28461.1.A1_a_at</b>	INSR	Insulin receptor
<b>Bt.28461.1.A1_at</b>	INSR	Insulin receptor
<b>Bt.28461.1.S1_a_at</b>	INSR	Insulin receptor
<b>Bt.28461.1.S1_at</b>	INSR	Insulin receptor
<b>Bt.28461.2.S1_a_at</b>	INSR	Insulin receptor
<b>Bt.6903.1.S1_at</b>	INSR	Insulin receptor
<b>Bt.6613.1.S1_at</b>	IRS1	Insulin receptor substrate
<b>Bt.27066.1.A1_at</b>	IRS1	Insulin receptor substrate
<b>Bt.27066.2.S1_at</b>	IRS1	Insulin receptor substrate
<b>Bt.10999.2.S1_at</b>	NCK2	NCK adaptor protein 2
<b>Bt.10999.1.A1_at</b>	NCK2	NCK adaptor protein 2
<b>Bt.4671.1.S1_at</b>	PPM1A	Protein phosphatase 1A
<b>Bt.21503.1.S1_at</b>	PPP1CA	Protein phosphatase 1
<b>Bt.18486.1.A1_at</b>	SHC1	SHC-transforming protein 1
Primäre Insulin-Zielgene		
<b>Bt.22785.1.S1_at</b>	CEBPB	CCAAT/enhancer binding protein
<b>Bt.410.1.S1_at</b>	GCG	Glucagon
<b>Bt.13134.1.S1_at</b>	JUN	Jun oncogene
<b>Bt.1939.1.S1_at</b>	LEP	Leptin
<b>Bt.7197.1.S1_at</b>	PRL	Prolactin
<b>Bt.7197.3.A1_at</b>	PRL	Prolactin
Sekundäre Insulin-Zielgene		
<b>Bt.5381.1.S1_at</b>	CSN2	Casein beta

<b>Bt.5381.2.A1_at</b>	CSN2	Casein beta
<b>Bt.5381.2.S1_x_at</b>	CSN2	Casein beta
<b>Bt.4391.1.S2_at</b>	SLC2A4	Solute carrier family 2
Bestandteile des PI3K-Signaltransduktionsweges		
<b>Bt.20313.1.S1_at</b>	BCL2L1	BCL2-like 1
<b>Bt.20043.1.S1_at</b>	DUSP14	Dual specificity phosphatase 14
<b>Bt.20043.2.S1_at</b>	DUSP14	Dual specificity phosphatase 14
<b>Bt.20043.3.A1_at</b>	DUSP14	Dual specificity phosphatase 14
<b>Bt.190.1.A1_at</b>	IGFBP1	Insulin-like growth factor binding protein 1
<b>Bt.5229.1.S1_at</b>	SERPIME1	Serpin peptidase inhibitor
<b>Bt.15667.1.S1_a_at</b>	SREBF1	Sterol regulatory element binding transcription factor 1
<b>Bt.15667.1.S1_at</b>	SREBF1	Sterol regulatory element binding transcription factor 1
<b>Bt.15667.2.S1_at</b>	SREBF1	Sterol regulatory element binding transcription factor 1
<b>Bt.507.1.S1_at</b>	UCP1	Uncoupling protein 1
<b>Bt.5402.1.S1_a_at</b>	VEGFB	Vascular endothelial growth factor B
<b>Bt.3913.1.S1_at</b>	VEGFC	Vascular endothelial growth factor C
<b>Bt.4138.1.S1_a_at</b>	VEGFA	Vascular endothelial growth factor A
<b>Bt.13096.1.S1_at</b>	FIGF	C-fos induced growth factor
<b>Bt.13096.1.A1_at</b>	FIGF	C-fos induced growth factor
Zielgene PI3-Kinase		
<b>Bt.4843.1.S1_at</b>	AKT1	V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
<b>Bt.4843.1.S2_at</b>	AKT1	V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
<b>Bt.500.1.S1_at</b>	HK1	Hexokinase 1
<b>Bt.18755.1.A1_at</b>	GSK3B	Glycogen synthase kinase 3 beta
<b>Bt.18755.2.S1_at</b>	GSK3B	Glycogen synthase kinase 3 beta
<b>Bt.9144.1.A1_at</b>	PDPK1	3-Phosphoinositide dependent protein kinase-1
<b>Bt.9459.1.S1_at</b>	PDPK1	3-Phosphoinositide dependent protein kinase-1
<b>Bt.447.1.S1_at</b>	PIK3CA	Phosphoinositide-3-kinase
<b>Bt.515.1.S1_at</b>	PIK3R2	phosphoinositide-3-kinase
<b>Bt.7236.1.S1_at</b>	PIK3R1	Phosphoinositide-3-kinase
<b>Bt.608.1.S1_at</b>	PIK3R3	Phosphoinositide-3-kinase
<b>Bt.5435.1.S1_at</b>	PRKCB	Protein kinase C
<b>Bt.12762.1.S1_at</b>	PRKCG	Protein kinase C
<b>Bt.28047.1.A1_at</b>	PRKCI	Protein kinase C
<b>Bt.15734.1.S1_at</b>	PRKCZ	Protein kinase C
<b>Bt.27200.1.S1_at</b>	RPS6KB1	Ribosomal protein S6 kinase
<b>Bt.4646.1.S1_at</b>	SLC2A1	Solute carrier family 2

**Tabelle Anhang 3** Vollständige Liste der in beiden Versuchsgruppen differentiell exprimierten Gene sortiert nach Stoffwechselwegen bzw. Funktionen.

Affymetrix-Annotation	Genebank ID	Bezeichnung	Abkürzung	Trend	FC PGF1	FC PGD
<u>Fettstoffwechsel</u>						
Bt.12559.1.S1_at	CB433477	ACLY	ATP citrate lyase	↑durch PG	0,433	0,385
Bt.23182.1.S1_at	NM_177497.2	FDPS	farnesyl diphosphate synthase	↑durch PG	0,504	0,421
Bt.3764.1.S1_at	CK958906	MGC139111	Similar to isopentenyl-diphosphate delta isomerase	↑durch PG	0,552	0,379
Bt.11465.1.S1_at	AU276294	HMGCR	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase	↑durch PG	0,674	0,528
Bt.5449.1.S1_at	BF776610	DHCR7	7-dehydrocholesterol reductase	↑durch PG	0,674	0,435
Bt.621.1.S1_at	CK961820	CYP51	lanosterol 14-demethylase P450	↑durch PG	0,699	0,459
Bt.22763.2.S1_a_at	CK976192	HMGCS1	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1 (soluble)	↑durch PG	0,779	0,611
Bt.9767.1.S1_a_at	CK949309	SQLE	squalene epoxidase	↑durch PG	0,845	0,486
<u>Stoffwechsel und Metabolismus</u>						
Bt.12255.1.S1_at	AY265992.1	CYP2C19	cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 19	↓durch PG	-0,767	-0,833
Bt.19247.2.S1_at	BF042377	SULT1C2	sulfotransferase family, cytosolic, 1C, member 2	↓durch PG	-0,575	-0,554
Bt.19247.1.S1_at	CK837929	SULT1C2	sulfotransferase family, cytosolic, 1C, member 2	↓durch PG	-0,485	-0,557
Bt.19884.2.S1_at	CK831550	PLA1A	phospholipase A1 member A	↓durch PG	-0,464	-0,420
<u>Akute Phase Proteine</u>						
Bt.17678.1.A1_at	CB464637	APCS	amyloid P component, serum	↑durch PG	0,535	0,438
Bt.12553.1.S1_at	CB534474	HP	haptoglobin	↓durch PG	-0,939	-0,798
<u>Signaltransduktion und Transkriptionsfaktoren</u>						
Bt.21997.1.S1_at	AV605223	PPM1K	protein phosphatase 1K (PP2C domain containing)	↓durch PG	-0,403	-0,327
Bt.16137.1.S1_at	CK838029	ALDH9A1	aldehyde dehydrogenase 9 family, member A1	↓durch PG	-0,466	-0,387
Bt.28366.1.A1_at	CK979039	ECT2	epithelial cell transforming sequence 2 oncogene protein	↓durch PG	-0,517	-0,610
Bt.18685.1.A1_at	CB448367	DTX1	deltex homolog 1	↓durch PG	-0,222	-0,243
Bt.5993.1.S1_at	CK950804	KPNA2	Karyopherin alpha 2 (RAG cohort 1, importin alpha 1)	↓durch PG	-0,498	-0,499
Bt.9527.1.A1_at	BM435193	LOC522795	Similar to TGF-beta inducible early protein	↓durch PG	0,392	0,484
Bt.7033.2.S1_a_at	CB532983	FOLR2	Folate receptor 2 (fetal)	↓durch PG	-0,886	-0,571
Bt.7033.2.S1_at	CB532983	FOLR2	Folate receptor 2 (fetal)	↓durch PG	-0,626	-0,390
Bt.1518.1.S1_at	AW430532	HMMR	Hyaluronan-mediated motility receptor (RHAMM)	↓durch PG	-0,408	-0,425

## 102 Anhang

Affymetrix-Annotation	Genebank ID	Bezeichnung	Abkürzung	Trend	FC PGF1	FC PGD
<u>Zellwachstum und Differenzierung</u>						
Bt.2353.1.S1_at	CK772080	BIRC5	baculoviral IAP repeat-containing 5 (survivin)	↓durch PG	-0,553	-0,561
Bt.20277.1.S1_at	CB443446	TOP2A	topoisomerase (DNA) II alpha 170kDa	↓durch PG	-0,888	-1,021
Bt.17939.1.S1_at	CB436656	LMNB1	HUMAN Lamin B1	↓durch PG	-0,433	-0,352
Bt.18776.1.S1_at	CK979795	KIAA0101	KIAA0101	↓durch PG	-0,672	-0,821
Bt.13573.1.A1_at	BP110236	CKS2	CDC28 protein kinase regulatory subunit 2	↓durch PG	-0,736	-0,679
Bt.3137.1.S1_at	CK848121	STMN1	stathmin	↓durch PG	-0,716	-0,881
Bt.2.1.S1_at	NM_174016.2	CDC2	Cell division cycle 2, G1 to S and G2 to M	↓durch PG	-0,653	-0,679
Bt.20428.2.S1_a_at	CK954514	PRC1	Protein regulator of cytokinesis 1	↓durch PG	-0,648	-0,723
Bt.28185.1.S1_at	CK962142	RACGAP1P	Rac GTPase activating protein 1 pseudogene	↓durch PG	-0,615	-0,712
Bt.25661.1.A1_at	CK772666	BUB1B	Mitotic checkpoint serine/threonine-protein kinase BUB1 beta	↓durch PG	-0,557	-0,595
Bt.12328.1.S1_at	BF073044	CENPF	centromere protein F (350/400kD),	↓durch PG	-0,49	-0,453
Bt.21513.1.A1_at	CK846625	BUB1	budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog	↓durch PG	-0,487	-0,514
Bt.25412.1.A1_at	BE723538	NUSAP1	nucleolar and spindle associated protein 1	↓durch PG	-0,471	-0,563
Bt.41.1.S1_at	NM_174264.2	CCNB2	Bos taurus cyclin B2	↓durch PG	-0,448	-0,486
Bt.15980.1.A1_at	CB443402	CCNB1	Cyclin B1	↓durch PG	-0,41	-0,357
Bt.18081.1.A1_at	CB439354	KIF20A	kinesin family member 20A	↓durch PG	-0,37	-0,413
Bt.2551.1.S1_at	CB424618	CCNA2	cyclin A2	↓durch PG	-0,363	-0,341
Bt.20420.1.S1_at	CK772904	CDKN2C	cyclin-dependent kinase inhibitor 2C (p18, inhibits CDK4)	↓durch PG	-0,357	-0,333
Bt.5578.1.S1_at	BT026235.1	CKAP2L	cytoskeleton associated protein 2-like	↓durch PG	-0,324	-0,338
Bt.639.1.S1_at	CK950535	CDC20	cell division cycle 20 homolog	↓durch PG	-0,302	-0,291
Bt.19819.1.S1_at	CB535016	ASPM	asp (abnormal spindle)-like, microcephaly associated (Drosophila)	↓durch PG	-0,287	-0,279
Bt.28797.1.A1_at	CK952083	BM039	uncharacterized bone marrow protein BM039 (Homo sapiens)	↓durch PG	-0,284	-0,321
Bt.5934.1.S1_at	CB172104	NEK2	NIMA (never in mitosis gene a)-related kinase 2	↓durch PG	-0,269	-0,297
Bt.3756.1.A1_at	CB168917	PTTG1	pituitary tumor-transforming 1	↓durch PG	-0,691	-0,728
Bt.26683.2.S1_at	CK978780	AURKA	aurora kinase A	↓durch PG	-0,215	-0,237

Affymetrix-Annotation	Genebank ID	Bezeichnung	Abkürzung	Trend	FC PGF1	FC PGD
<u>Transport</u>						
Bt.27975.1.S1_s_at	BF046064	CALM2	calmodulin 2	↓durch PG	-0,632	-0,48
Bt.6126.1.S1_at	NM_174222.2	TAP2	transporter 2, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)	↓durch PG	-0,453	-0,239
Bt.9807.1.S1_at	CB433486	GPNUMB	glycoprotein (transmembrane) nmb	↑durch PG	0,798	0,802
<u>Nucleinsäurestoffwechsel</u>						
Bt.11936.1.S1_a_at	CK775532	DUT	deoxyuridine triphosphatase	↓durch PG	-0,433	-0,546
Bt.10648.1.S1_at	CK979761	RRM2	ribonucleotide reductase M2 polypeptide	↓durch PG	-0,393	-0,677
Bt.13336.1.A1_at	AW657807	SMC4	structural maintenance of chromosomes 4	↓durch PG	-0,585	-0,509
Bt.13336.2.S1_at	CB442617	SMC4	structural maintenance of chromosomes 4	↓durch PG	-0,443	-0,469
<u>unbekannt</u>						
Bt.10007.1.A1_at	CK944937		Transcribed sequences	↓durch PG	-1,088	-1,108
Bt.19813.1.A1_at	CB534828		Transcribed sequence	↓durch PG	-0,892	-0,945
Bt.20519.2.S1_at	BM253188	DKFZp564G202.1	hypothetical protein DKFZp564G202.1	↓durch PG	-0,818	-0,519
Bt.24202.1.S1_at	CK957201		Transcribed sequences	↓durch PG	-0,771	-0,889
Bt.21523.1.S1_at	BE663592		Transcribed sequences	↓durch PG	-0,764	-0,766
Bt.8633.1.A1_at	BI535494		Transcribed sequences	↓durch PG	-0,712	-0,649
Bt.28741.1.A1_at	CK778368	DKFZp434F192.1	hypothetical protein DKFZp434F192.1	↓durch PG	-0,569	-0,56
Bt.9679.1.S1_at	BM433653	LOC785058	Hypothetical protein LOC785058	↓durch PG	-0,523	-0,397
Bt.5329.2.S1_at	CK970588	MGC140183	Similar to Protein C10orf57 homolog	↓durch PG	-0,492	-0,376
Bt.2810.1.A1_at	AV588896		Transcribed locus	↓durch PG	-0,451	-0,379
Bt.9863.1.S1_at	CK770815		Transcribed sequences	↓durch PG	-0,427	-0,501
Bt.28741.2.S1_at	CB452551	DKFZp434F192.1	hypothetical protein DKFZp434F192.1	↓durch PG	-0,386	-0,41
Bt.16065.1.S1_at	BP108954		Transcribed sequences	↓durch PG	-0,385	-0,309
Bt.1296.1.S1_at	BI537914		Transcribed sequences	↓durch PG	-0,3	-0,3
Bt.14109.1.S1_at	BM087691		Transcribed sequences	↓durch PG	-0,272	-0,312
Bt.28502.1.S1_at	BI536014	FAM83D	family with sequence similarity 83, member D	↓durch PG	-0,269	-0,278
Bt.16047.1.S1_at	CB426310	MGC16386	hypothetical protein MGC16386	↓durch PG	-0,244	-0,258
Bt.11587.3.A1_a_at	CK774460	DKFZp434H1210.1	hypothetical protein DKFZp434H1210.1	↓durch PG	-0,226	-0,229
Bt.12583.1.A1_at	CA035005		Transcribed sequences	↑durch PG	0,38	0,311
Bt.11167.1.S1_at	CB530920	LOC505935	Hypothetical LOC505935	↑durch PG	0,718	0,909

## *Danksagung*

Besonderen Dank möchte ich an meinen Doktorvater Prof. Jörg Aschenbach richten. Seine Begeisterung für das Forschungsprojekt, sein unerschütterlicher Optimismus sowie die überragende fachliche Betreuung und sein in mich gesetztes Vertrauen während dieser Jahre haben diese Leistung erst möglich gemacht.

Auch bei Herrn Professor Gotthold Gäbel, sowie allen Mitarbeitern des Veterinär-Physiologischen Institutes der Universität Leipzig möchte ich mich von Herzen für die entgegengebrachte wohlwollende Unterstützung durch die Bereitstellung von Räumen, fachlichem Wissen und netten Gesprächen bedanken. Liebe Anke, Ines, Jana, Caro, Tina, Sabine, Reiko, Arite und Thomas, liebe Kollegen und Freunde : Danke für die schöne Zeit!

Ich möchte mich bei der Firma Pfizer herzlich für die finanzielle Unterstützung dieses Forschungsprojektes bedanken. Insbesondere Dr. Leo Goetze danke ich für das in mich gesetzte Vertrauen und die gewährte Unterstützung, die die Arbeit mit Mikroarrays erst ermöglichte.

Ebenfalls herzlich bedanken möchte ich mich bei

Herrn Dr. Knut Krohn und Frau Süptitz vom IZKF für die exzellente Kooperation bei der Durchführung der Mikroarrayexperimente.

Herrn Dr. Dirk Hasenclever und Herrn Dr. Maciej Rosolowski vom IMISE in Leipzig für die sorgfältige Betreuung der Mikroarraystatistik.

Herrn Prof. Uwe Rösler für die Hilfe bei der Etablierung und Durchführung der qRT-PCR in seinem Hause und das persönliche Engagement dies in kurzer Zeit zu verwirklichen.

Dr. Ute Ceglarek und Dr. Alexander Leichtle vom Institut für Laboratoriumsmedizin der Universität Leipzig. Ohne ihre Bereitschaft und das große wissenschaftliche Interesse die Untersuchungsmethoden zum Sterol-Nachweis an unsere Rinderproben zu adaptieren, würden der Arbeit viele wertvolle Daten fehlen.

Herrn Prof. Niels Bastian Kristensen von der Universität Aarhus, Dänemark, für die Durchführung der Propylenglycolbestimmungen.

Frau Dr. Jutta Gottschalk vom Veterinär-Physiologisch-Chemischen Institut der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig für die Einarbeitung im Isotopenlabor und die Unterstützung bei der IGF-1 Bestimmung

Weiterhin danke ich sehr herzlich

den Mitarbeitern der Medizinischen Tierklinik der Universität Leipzig für die Bereitstellung von Räumen und Geräten sowie für die Einarbeitung in die Methode der TEAC-Bestimmung

Herrn Professor W. Heuwieser sowie den Mitarbeiter der Tierklinik für Fortpflanzung der FU Berlin, insbesondere auch Dr. Michael Iwersen, für die Durchführung der Leberbiopsien sowie als meine Ansprechpartner „vor Ort“ in Hohen Luckow.

Schließlich möchte ich mich von Herzen bei meiner Familie, bei meinen lieben Freundinnen und den Kollegen in Stendal bedanken. Ihr alle habt mit ständigem, liebevollem Antrieb und Interesse sowie unerschütterlichem Glauben an mich diese Arbeit unterstützt und ermöglicht!

*Selbstständigkeitserklärung*

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

Stendal, den 3.05.2012

Kerstin Reisberg