

Institut für Tierernährung und Ernährungsphysiologie
(Direktor: Prof. Dr. K. Eder)
des
Fachbereiches Agrarwissenschaften, Ökotrophologie und Umweltmanagement
der
Justus-Liebig-Universität Gießen
(Dekan: Prof. Dr. Dr. Peter Kämpfer)

**„Untersuchungen zu genomweiten Veränderungen der Genexpression in der Leber von
Sauen während der Laktation“**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Ökotrophologie (Dr. oec. troph.)

vorgelegt von

Diplom-Trophologin Susann Rosenbaum
geboren am 06.05.1983 in Erlabrunn/Erzgebirge

Gutachter: Prof. Dr. K. Eder
Prof. Dr. U. Wenzel

Gießen 2013

Inhaltsverzeichnis

	Seite
<i>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</i>	<i>III</i>
<i>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</i>	<i>IV</i>
1 EINLEITUNG	1
1.1 Zentrale Bedeutung des <i>peroxisome proliferator-activated receptor alpha</i> in katabolen Stoffwechsellagen	2
1.2 Adaptation des Abwehrsystems während der Laktation	4
2 ZIELSTELLUNG	7
2.1 Untersuchungen zu genomweiten Veränderungen des hepatischen Expressionsprofils während der Laktation bei der Sau unter Anwendung der <i>microarray</i> -Technologie	7
2.2 Untersuchung der Expression PPAR α -regulierter Gene des Fettstoffwechsels und der Carnitinsynthese während der Laktation in der Leber von Sauen	8
2.3 Untersuchung der Expression Nrf2-regulierter Gene während der Laktation in der Leber von Sauen	8
3 ORIGINALARBEITEN	10
3.1 Studie 1: Genome-wide transcript profiling indicates induction of energy-generating pathways and an adaptive immune response in the liver of sows during lactation	11
3.2 Studie 2: Genes involved in carnitine synthesis and carnitine uptake are up-regulated in the liver of sows during lactation	23

3.3	Studie 3: The stress signalling pathway nuclear factor E2-related factor 2 is activated in the liver of sows during lactation.	28
4	DISKUSSION	34
4.1	Veränderungen im Intermediärstoffwechsel während der Laktation bei der Sau	35
4.1.1	Veränderungen der Expression von Genen des Lipid- und Carnitin-metabolismus	36
4.1.2	Veränderungen der Expression von Genen des Kohlenhydratstoffwechsels	42
4.1.3	Veränderungen der Expression von Genen des Aminosäurestoffwechsels	43
4.1.4	Veränderungen der Expression von Genen des Citratzyklus und der Atmungskette	45
4.2	Veränderungen des Abwehrsystems während der Laktation bei der Sau	46
4.2.1	Veränderungen der Expression von Genen immunregulatorischer Moleküle des angeborenen Immunsystems	47
4.2.2	Veränderungen der Expression von Genen immunregulatorischer Moleküle des adaptiven Immunsystems	50
4.2.3	Veränderungen der Expression von Genen fokaler Adhäsionsmoleküle	52
4.2.4	Veränderungen des <i>Nuclear factor erythroid-2(E2)-related factor 2</i> -Signalweges	54
5	ZUSAMMENFASSUNG	59
6	SUMMARY	62
7	LITERATURVERZEICHNIS	65
ERKLÄRUNG		
DANKSAGUNG		

Abbildungsverzeichnis

Abbildung	Titel	
Abb. 1	Schematische Darstellung der PPAR α vermittelten transkriptionellen Regulation von Genen.	4
Abb. 2	Schematische Darstellung der Nrf2 vermittelten transkriptionellen Regulation von Genen.	5
Abb. 3	Modell zu den metabolischen Veränderungen in der Leber von Sauen während der Laktation.	56

Abkürzungsverzeichnis

ABCD3	<i>ATP-binding cassette, subfamily D, member 3</i>
ACAD8	<i>acyl-CoA dehydrogenase family member 8</i>
ACADSB	<i>acyl-CoA dehydrogenase, short/branched chain</i>
ACADVL	<i>acyl-CoA dehydrogenase, very-long-chain</i>
ACOX1	<i>acyl-CoA oxidase 1</i>
ACSL5	<i>acyl-CoA synthetase, long-chain family member 5</i>
ALDH9A1	<i>4-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase</i>
ALT/GPT	Alanin-Aminotransferase
APP	Akute-Phase-Proteine
APR	Akute-Phase-Reaktion
ARE	<i>antioxidant response element</i>
ATF4	<i>activating transcription factor 4</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BB	γ -Butyrobetain
BBD/BBOX	γ -Butyrobetain-Dioxygenase
BCAA	<i>branched chain amino acids</i>
CACT/SLC25A20	Carnitin/Acylcarnitin-Translokase
CD8a	<i>T-cell surface glycoprotein CD8 alpha</i>
CFB	Komplement Faktor B
c-JUN	<i>jun proto-oncogene</i>
CPT	Carnitin-Palmitoyltransferase
CRP	C-reaktives Protein
CYCS	Cytochrom C
CYP4A	<i>cytochrome P450, family 4, subfamily A</i>

DAVID	<i>database of annotation visualisation and integrated discovery</i>
DEFB1	β -Defensin1
DANN	<i>deoxyribonucleic acid</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FABP4	<i>fatty acid-binding protein 4</i>
FADH	Flavin-Adenin-Dinukleotid, reduziert
FBP1	Fruktose-1,6-Bisphosphatase
FC	<i>Fold Change</i>
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
FGG	Fibrinogen γ
FN	Fibronectin
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GCSH	<i>glycine cleavage system protein H</i>
GIT	Gastrointestinaltrakt
GLUT2/SCL2A2	Glukosetransporter 2
GPI	Glucose-6-Phosphat-Isomerase
GPX	<i>glutathione peroxidase</i>
HADHB	<i>hydroxyacyl-CoA DH/3-ketoacylCoA thiolase/enoyl-CoA hydratase trifunctional enzyme beta subunit</i>
HIBCH	<i>3-hydroxyisobutyryl-coenzyme A hydrolase</i>
HMGCS2	<i>3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 2</i>
HO	<i>heme oxygenase</i>
HP	Haptoglobin
IDH1	Isocitrat-Dehydrogenase 1
ITG	Integrin

ITGB3	Integrin beta-3
IκB	<i>inhibitor- κB</i>
KEAP	<i>Kelch-like ECH associated protein</i>
LBP	<i>lipopolysaccharid binding protein</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
NADH/H ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid
NEFA	<i>non-esterified fatty acids</i> /freie Fettsäuren
NFκB	<i>Nuclear Factor kappaB</i>
NQO1	<i>NAD(P)H dehydrogenase quinone 1</i>
Nrf2	<i>Nuclear factor erythroid-2(E2)-related factor 2</i>
OCTN	<i>organic cation transporter</i>
PC	Pyruvatcarboxylase
PDHA	Pyruvat-Dehydrogenase alpha
PDHB	Pyruvat-Dehydrogenase beta
PEPCK	Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase
PHGDH	Phosphoglycerat-Dehydrogenase
PPAR	<i>peroxisome proliferator-activated receptor</i>
PPRE	<i>PPAR-response elements</i>
PRDX6	<i>peroxiredoxin 6</i>
PSPH	Phosphoserin-Phosphatase
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
RT-PCR	<i>reverse transcription-polymerase chain reaction</i>
RXR	<i>retinoid X receptor</i>
SDHA	<i>succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit</i>

SLC22A	<i>solute carrier family 22A</i>
sMaf	<i>small Maf</i>
SOD	<i>superoxide dismutase</i>
TAG	Triglyceride
TML	6-N-Trimethyl-Lysin
TMLHE	<i>trimethyllysine hydroxylase, epsilon</i>
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
TRAC/TCR	T-Zell-Rezeptor
TXNRD1	<i>thioredoxin reductase 1</i>
UGT1A1	<i>glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A1</i>
UPR	<i>unfolded protein response</i>

1 Einleitung

Die Laktation stellt einen physiologischen Zustand dar, welcher durch die Synthese und Sekretion von Milch in der Milchdrüse gekennzeichnet ist. Der laktierende Organismus weist einen deutlich gesteigerten Energie- und Nährstoffbedarf auf, um den Prozess der Milchsynthese sicherzustellen. Dieser wird bei den meisten Spezies durch eine erhöhte Nahrungsaufnahme und durch die Mobilisierung von Nährstoffen aus Körperreserven, wie Fett- und Muskelgewebe gedeckt (Shields und Mahan, 1983; Etienne *et al.*, 1985; Noblet und Etienne, 1987; Dewey, 1997; Loor *et al.*, 2007; Gutgesell *et al.*, 2009b). Aufgrund der oftmals unzureichenden Kapazität der Futteraufnahme ist die peripartale Phase sowohl bei Milchkühen als auch bei Sauen durch ein Umschalten des anabolen Stoffwechsels während der Trächtigkeit in einen katabolen Stoffwechsel in der Laktation charakterisiert (Noblet und Etienne, 1987; van den Brand *et al.*, 2000; Coffey *et al.*, 2002; Walters *et al.*, 2002, Loor *et al.*, 2005). Im Unterschied zum Fastenzustand ist der katabole Status während der Laktation auf eine Bereitstellung von Substraten vorrangig für die Milchsynthese ausgerichtet (Bauman und Currie, 1980). Eine von der Anzahl der säugenden Nachkommen abhängige Milchsyntheserate (Toner *et al.*, 1996) dürfte folgend vor allem den Organismus der laktierenden Sau mit Wurfgrößen von durchschnittlich 10-12 Ferkeln vor eine große Herausforderung stellen. In Relation zum Körpergewicht entspricht die Milchleistung der Sau von täglich 8-10 Litern einer Milchleistung von 30-40 Litern bei Kühen (Kirchgessner *et al.*, 2008). Dies ist bedingt durch den verglichen zur Kuhmilch sehr hohen Energie- und Proteingehalt der Sauenmilch. Folglich ist anzunehmen, dass die laktierende Sau auf eine besonders intensive Umstellung ihres Metabolismus angewiesen ist, um eine adäquate Milchsynthese sicherzustellen. Es ist bekannt, dass Sauen in der 3. Woche der Laktation den Höhepunkt der Milchsynthese erreichen (Noblet und Etienne, 1989; Etienne *et al.*, 1998). Aus diesem Grund ist zu vermuten, dass zu diesem Zeitpunkt die maximale Umstellung des Stoffwechsels gewährleistet sein muss, um eine ausreichende Milchsynthese zu garantieren.

Gewebespezifische Anpassungsmechanismen bezüglich metabolischer Veränderungen während der Laktation wurden bei der Milchkuh und beim Modelltier Nager auf Ebene des Transkriptoms sowie des Proteoms bereits umfangreich untersucht (Loor *et al.*, 2005, 2006, 2007; McCarthy *et al.*, 2010; Gutgesell *et al.*, 2009a, b; Morris *et al.*, 2009; Athipposhy *et al.*, 2011; Rawson *et al.*, 2012; Schlegel *et al.*, 2012a, b). Die Entwicklung von Hochdurchsatzverfahren wie der *microarray*-Technologie ermöglichen es in kurzer Zeit eine große Datenmenge zu generieren. Dabei können in einem Experiment die Veränderungen der

Expression von gleichzeitig mehreren tausend Transkripten erfasst werden. Durch vergleichende Betrachtungen von Genexpressionsunterschieden in verschiedenen Geweben können gewebespezifische Genexpressionsprofile erstellt und komplexe molekulare Wirkmechanismen erfasst werden. Mittels dieser und anderer Methoden zur Analyse der Genexpression wurden tiefgreifende Veränderungen der Transkription von Genen, welche für Proteine des Intermediärstoffwechsels als auch für inflammatorische und immunologische Strukturen codieren, während der Laktation beschrieben. Dabei sind in Bezug auf den Intermediärstoffwechsel erhebliche Unterschiede zwischen verschiedenen Spezies zu erkennen. Nager zeigen eine reduzierte β -Oxidation in Leber und Muskulatur sowie eine Verminderung der Thermogenese in Muskulatur und braunem Fettgewebe. Dies sind Mechanismen, welche dem Nager zur Einsparung von Energie und metabolischen Substraten für die Milchsynthese in der laktierenden Milchdrüse dienen (Trayhurn *et al.*, 1982; Pedraza *et al.*, 2000, 2001; Gutgesell *et al.*, 2009a, b). Untersuchungen an Milchkühen hingegen deuten durch eine gesteigerte Expression von Genen, die in die Carnitinsynthese, den Carnitintransport und die β -Oxidation involviert sind, auf eine gesteigerte Metabolisierung von Fettsäuren zur Energiegewinnung in der Leber hin (Loor *et al.*, 2005, 2006, 2007; Schlegel *et al.*, 2012a).

1.1 Zentrale Bedeutung des *peroxisome proliferator-activated receptor alpha* in katabolen Stoffwechsellagen

Der *peroxisome proliferator-activated receptor* (PPAR) *alpha* (PPAR α) stellt einen liganden-aktivierten Transkriptionsfaktor dar, welcher der Familie der nuklearen Hormonrezeptoren angehört. Eine ausgeprägte Expression des PPAR α ist in Geweben, welche sich durch eine hohe Rate an Fettsäurekatabolismus auszeichnen, vorzufinden. Zu diesen zählen Leber, Muskulatur, Herz, Niere und Fettgewebe (Escher und Wahli, 2000). Die Aktivierung dieses Transkriptionsfaktors kann hier sowohl durch exogene, synthetische Liganden mit lipophilen Eigenschaften, den Fibraten (Clofibrat, Fenofibrat), als auch durch endogene Liganden, wie freie Fettsäuren und Eicosanoide, erfolgen (Escher und Wahli, 2000; Berger und Moller, 2002; Mandard *et al.*, 2004). Die Aufnahme von Fettsäuren über die Nahrung kann ebenfalls eine potente Aktivierung des PPAR α bedingen (Mandard *et al.*, 2004). Nach Ligandenbindung vermittelt der PPAR α die Expression seiner Zielgene, indem er an spezifische Nukleotidsequenzen, die sogenannten *PPAR-response elements* (PPRE) in der Promotorregion, im Intronbereich bzw. dem 5' untranslatierten Bereich der entsprechenden

Gene bindet (dargestellt in Abb. 1)(Berger und Moller, 2002). Diese Bindung erfolgt als Heterodimer mit dem *retinoid X receptor* (RXR) (Escher und Wahli, 2000; Berger und Moller, 2002; Mandard *et al.*, 2004). Aufgrund seines weiten Wirkspektrums im Lipid- und Lipoproteinmetabolismus und der Energiehomöostase wird der Transkriptionsfaktor auch als Masterregulator dieser Stoffwechselwege bezeichnet (Rakhshandehroo *et al.*, 2009). Darüber hinaus ist er unter anderem in die transkriptionelle Regulation von Proteinen der Ketogenese, des Glukosemetabolismus und der Inflammation involviert (Mandard *et al.*, 2004). Bezüglich der basalen Genexpression und der Intensität der Aktivierung des Transkriptionsfaktors gibt es speziesspezifische Unterschiede. Nager wie Maus und Ratte gehören den proliferierenden Spezies an und weisen im Vergleich zu Mensch und Schwein höhere basale mRNA-Konzentrationen des PPAR α in der Leber auf (Holden und Tugwood, 1999; Luci *et al.*, 2007b). Im Gegensatz zum Nager ist beim Schwein zusätzlich eine ausgeprägte Expression des PPAR α im Fettgewebe zu verzeichnen (Ding *et al.*, 2000). Nach induzierter PPAR α -Aktivierung konnte in der Leber von Nagern eine deutlich gesteigerte Expression von Genen, welche für peroxisomale Enzyme codieren, aufgezeigt werden. Des Weiteren ist eine Proliferation von Peroxisomen bis hin zur Entwicklung von Leberkarzinomen zu beobachten (Richert *et al.*, 1996; Perrone *et al.*, 1998; Johnson *et al.*, 2002). Bei Mensch und Schwein führt eine PPAR α -Aktivierung zu einer vergleichsweise schwachen Induktion des peroxisomalen Metabolismus und Peroxisomenproliferation, weshalb diese Spezies auch als Nicht-Proliferatoren bezeichnet werden (Ammerschlaeger *et al.*, 2004; Luci *et al.*, 2007a, c; Ringseis *et al.*, 2009). Eine wichtige physiologische Bedeutung erlangt der Transkriptionsfaktor vor allem in der Vermittlung der Anpassungsprozesse an den Fastenzustand (Kersten *et al.*, 1999; Escher *et al.*, 2001). Die Während des Fastens aus dem Fettgewebe mobilisierten freien Fettsäuren (*non-esterified fatty acids*; NEFA) bedingen eine Aktivierung des PPAR α (Liu *et al.*, 1995; Escher *et al.*, 2001), wobei der Transkriptionsfaktor als Sensor für den Lipidinflux in die Leber fungiert (Kersten *et al.*, 1999; Leone *et al.*, 1999; Hashimoto *et al.*, 2000). Demzufolge können während der Laktation vermehrt vom Fettgewebe freigesetzte NEFA (Etienne *et al.*, 1985; McNamara, 1994; Vernon, 2005) über einen gesteigerten Influx in die Leber ebenfalls als Liganden des PPAR α fungieren. Eine fasteninduzierte Expression von bekannten PPAR α -Zielgenen in der Leber beim Schwein ist bereits in der Literatur dokumentiert (Ringseis *et al.*, 2009). Während der Laktation zeichnet sich neben den Veränderungen im Fettsäurekatabolismus und der Thermogenese eine tiefgreifende Beeinflussung der Genexpression von in die Ketogenese und Glukoneogenese involvierten Genen ab (Loor *et al.*, 2006; van Dorland *et al.*, 2009; Schlegel *et al.*, 2012a, b).

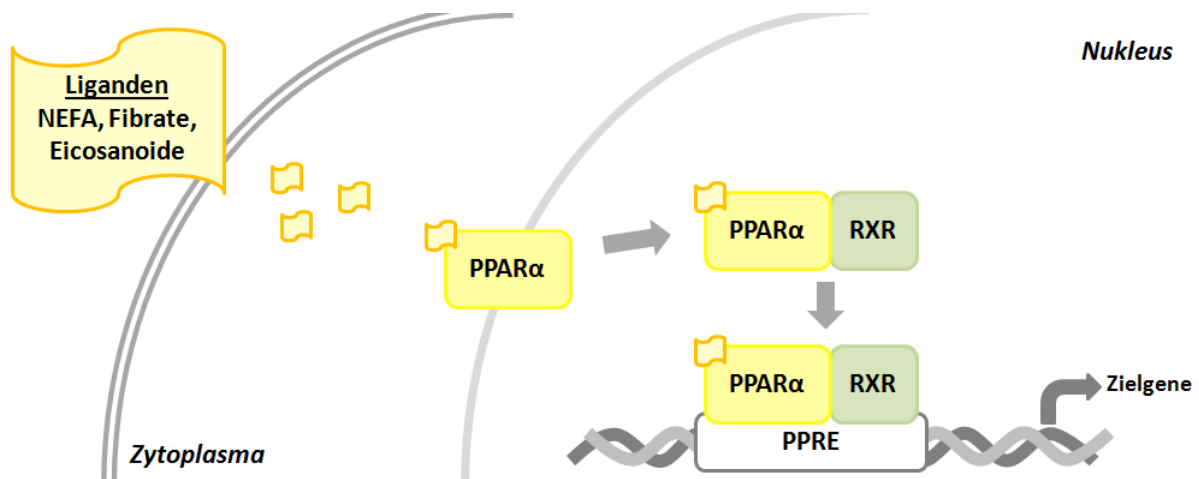


Abb. 1 Schematische Darstellung der PPARα vermittelten transkriptionellen Regulation von Genen.

1.2 Adaptation des Abwehrsystems während der Laktation

In der Literatur werden neben den Veränderungen im Intermediärstoffwechsel komplexe Veränderungen inflammatorisch und immunologisch wirksamer Moleküle beschrieben (Medina *et al.*, 1993; Loor *et al.*, 2005, 2007; Morris *et al.*, 2009; Moyes *et al.*, 2010a, b; Athipposzhy *et al.*, 2011). Die Untersuchungen von Knochenmark, Thymus, Milz, Leukozyten, Darm, Milchdrüse und Leber deuteten dabei auf eine Immunsuppression während der Laktation hin. Dabei wird von einer verminderten Expression von Genen des T-Zell-Signalweges und reduzierten Lymphozytenzahlen berichtet (Van Kampen und Mallard, 1997; Morris *et al.*, 2009; Moyes *et al.*, 2010a, b; Athipposzhy *et al.*, 2011). Dagegen konnten gesteigerte Expressionen von Genen der Akute-Phase-Reaktion (APR) beobachtet werden, was entsprechend auf eine Aktivierung des Immunsystems hindeutet (Loor *et al.*, 2005, 2007; Trevisi *et al.*, 2012; Gessner *et al.*, 2013). In der Literatur existieren des Weiteren Hinweise auf eine gesteigerte Expression von Zielgenen des *nuclear factor erythroid-2(E2)-related factor 2* (Nrf2) während der Laktation (Gessner *et al.*, 2013). Dieser Signalweg ist von großer Bedeutung während inflammatorischer Geschehen. Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe zeigen eine gesteigerte Expression von Nrf2-Zielgenen in der Leber laktierender Kühe auf (Gessner *et al.*, 2013). Daneben wird eine veränderte Genexpression von Nrf2-Zielgenen in der Milz und der Milchdrüse laktierender Kühe beschrieben (Morris *et al.*, 2009; Moyes *et al.*, 2010b). Der Nrf2 ist ein redox-sensitiver nuklearer Transkriptionsfaktor der *Cap-N-Collar* Familie, welcher für die zelluläre Abwehr vieler physikalischer, chemischer und kanzerogener Störfaktoren endogenen und exogenen Ursprungs unabdingbar ist. Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors kann unter anderem durch Xenobiotika, Schwermetalle, Antioxidantien, Elektrophile oder reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*; ROS) erfolgen (Kaspar *et al.*, 2009; Kim *et al.*,

2010; Tkachev *et al.*, 2011). Unter basalen Bedingungen liegt der Nrf2 aufgrund seiner Bindung durch das *Kelch-like ECH associated protein 1* (KEAP1) im Zytoplasma vor, wodurch er einem gesteigerten proteasomalen Abbau unterliegt (Tkachev *et al.*, 2011). Oxidativer Stress, der durch die Produktion einer großen Menge an ROS charakterisiert ist, führt entweder durch direkte oxidative Modifikation des KEAP1 oder nach Phosphorylierung des Nrf2 durch redox-sensitive Proteinkinasen zu einer Dissoziation des KEAP1 vom Nrf2. Folgend transloziert der Transkriptionsfaktor in den Nukleus, wo er als Heterodimer die Transkription von Genen, welche ein *antioxidant response element* (ARE) in ihrer Promotorregion besitzen, reguliert (Tkachev *et al.*, 2011). Die Dimerisierung kann unter anderem mit dem *small Maf* (sMaf) (Li *et al.*, 2008), dem *activating transcription factor 4* (ATF4) (He *et al.*, 2001) oder dem *jun proto-oncogene* (c-JUN) (Venugopal und Jaiswal, 1998) erfolgen. Diese sind wie der Nrf2 den *basic zipper-containing proteins* zuzuordnen (dargestellt in Abb. 2).

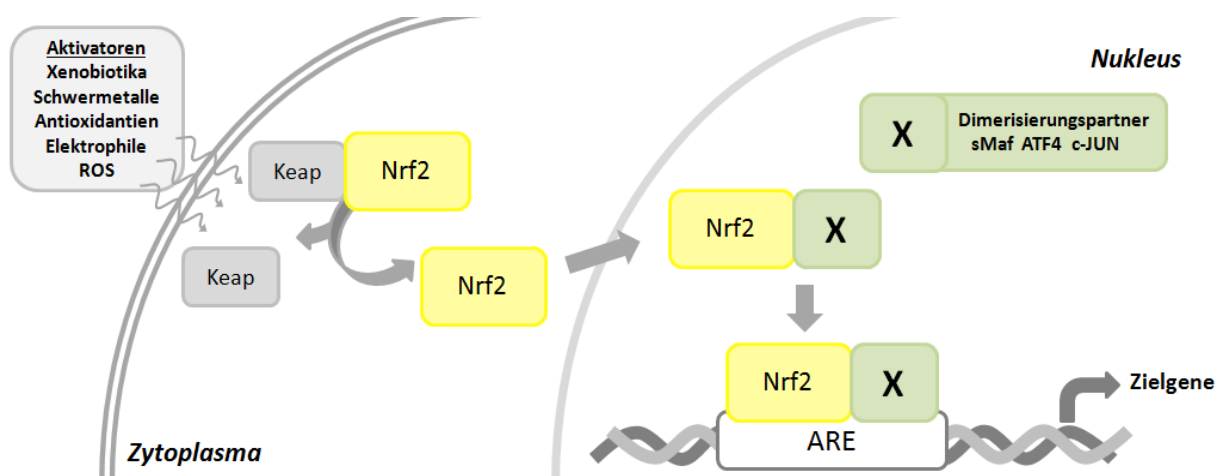


Abb. 2 Schematische Darstellung der Nrf2 vermittelten transkriptionellen Regulation von Genen.

Der Nrf2 vermittelt die transkriptionelle Regulation von Genen, welche in das antioxidative Abwehrsystem des Organismus involviert sind. Seine Wirkung vermittelt der Transkriptionsfaktor einerseits durch die Initiation direkt antioxidativer Mechanismen, welche zu einer gezielten Beseitigung bzw. Neutralisation von ROS führen und damit zum Erhalt der Redox-Homöostase beitragen (Jung und Kwak, 2010). Andererseits ist der Nrf2 ein wichtiger Aktivator der Expression von Genen des Fremdstoffmetabolismus Phase-II (Jung und Kwak, 2010; Kaspar *et al.*, 2009). Diese vermitteln ihre Wirkung, indem sie Xenobiotika inaktivieren und deren Ausscheidung fördern als auch die Entstehung reaktiver Verbindungen verhindern. Damit hat eine Aktivierung dieses Signalweges antioxidative, zytoprotektive und anticancerogene Effekte zur Folge (Jung und Kwak, 2010; Kaspar *et al.*, 2009; Baird und Dinkova-Kostova, 2011).

Die speziesspezifischen Unterschiede laktationsbedingter Veränderungen, vor allem den Intermediärstoffwechsel betreffend, machen deutlich, dass diese nicht speziesübergreifend betrachtet werden können. Derzeit existieren in der Literatur für die laktierende Sau nur Untersuchungen bezüglich Veränderungen der Genexpression in Milchdrüse, Skelettmuskulatur und Fettgewebe (Theil *et al.*, 2005; Laspiur *et al.*, 2009; Ringseis *et al.*, 2011). Diesen Untersuchungen zufolge scheinen laktierende Sauen im Gegensatz zum Nager ihren Metabolismus nicht ausschließlich zugunsten der Einsparung von Substraten und Energie für die Milchsynthese umzustellen (Gutgesell *et al.*, 2009b). Hierauf deuten die gesteigerten Expressionen von Genen des Fettsäurekatabolismus in der Skelettmuskulatur hin. Im Vergleich zur Milchkuh und zum Modelltier Nager (Loor *et al.*, 2007; Gutgesell *et al.*, 2009a; b; Athipposhy *et al.*, 2011) liegen derzeit keine hinreichenden Erkenntnisse bezüglich metabolischer Veränderungen in der Leber von Sauen während der Laktation vor. Die Leber als das zentrale Stoffwechselorgan ist bedeutend sowohl für Lipidstoffwechsel, Ketogenese, Glukosehomöostase und Aminosäurestoffwechsel als auch für die Synthese inflammatorisch wirksamer Proteine. Um die laktationsbegleitenden Veränderungen in der Leber von Sauen genomweit aufzuklären, wurde dieser Arbeit ein Versuch mit 20 laktierenden Sauen der zweiten Parität zugrunde gelegt. Postpartum erfolgte eine randomisierte Aufteilung der Sauen auf zwei Gruppen. Der ersten Gruppe Sauen wurden die Ferkel 24 Stunden nach der Geburt entzogen, wodurch die Milchsynthese aufgrund des fehlenden Saugstimulus eingestellt wird (Quesnel and Prunier, 1995). Diese Sauen bildeten die nicht laktierende Kontrollgruppe. Die Würfe der laktierenden Behandlungsgruppe wurden auf 12 Ferkel pro Sau standardisiert. Durch die Standardisierung der Wurfgrößen sollten alle Sauen auf ein ähnliches Leistungsniveau eingestellt werden, um so leistungsbedingte Unterschiede weitestgehend auszuschließen. Die Entnahme der Leberproben erfolgte mittels Biopsie zum Laktationshöhepunkt am Tag 20 der Laktation. Zusätzlich wurden Blutproben gewonnen.

2 Zielstellung

2.1 Untersuchungen zu genomweiten Veränderungen des hepatischen Expressionsprofils während der Laktation bei der Sau unter Anwendung der *microarray*-Technologie

Es ist bereits hinreichend bekannt, dass die Laktation durch tiefgreifende Veränderungen im Metabolismus charakterisiert ist. Diese dienen vorrangig der Bereitstellung von Substraten für die in der Milchdrüse stattfindende Milchsynthese. Erkenntnisse über Mechanismen der laktationsbedingten Anpassung beim Nager und bei der Milchkuh sind bereits umfassend verfügbar. Untersuchungen zur Genexpression an laktierenden Kühen und Nagern zeigen jedoch deutliche speziesspezifische Unterschiede auf (Loor *et al.*, 2005, 2006, 2007; Gutgesell *et al.*, 2009a, b; McCarthy *et al.*, 2010). Dies verdeutlicht, dass laktationsbedingte Veränderungen nicht speziessübergreifend betrachtet werden können. Vor allem in der Leber laktierender Kühe war unter Anwendung der *microarray*-Technologie auf Ebene der Genexpression ein breites Spektrum an Veränderungen sowohl des intermediären Stoffwechsels als auch des Immunsystems zu beobachten (Loor *et al.*, 2005, 2007). Erkenntnisse bezüglich laktationsbedingter Anpassungsprozesse bei der Sau sind jedoch sehr begrenzt. Ziel der ersten Studie war es, die genomweiten Veränderungen der Genexpression in der Leber von Sauen während der Laktation zu untersuchen. Um dies zu realisieren, wurden am Tag 20 der Laktation Leberproben gewonnen und mithilfe der *microarray*-Technologie untersucht. Zusätzlich wurden relevante Plasma- und Leistungsparameter bestimmt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen, die ausführliche Beschreibung des Versuchsdesigns, Details zu Material und Methoden sowie die Diskussion der Daten sind der folgenden **Studie 1** zu entnehmen.

Studie 1:

Rosenbaum S, Ringseis R, Hillen S, Becker S, Erhardt G, Reiner G, Eder K (2012) Genome-wide transcript profiling indicates induction of energy-generating pathways and an adaptive immune response in the liver of sows during lactation. Comparative Biochemistry and Physiology, Part D Genomics Proteomics 7: 370-381; reproduced with permission of Elsevier

2.2 Untersuchung der Expression PPAR α -regulierter Gene des Fettstoffwechsels und der Carnitinsynthese während der Laktation in der Leber von Sauen

Des Weiteren geht aus Studien am Nager und der laktierenden Milchkuh hervor, dass die Laktation mit deutlichen Veränderungen des PPAR α -Signalweges einhergeht (Gutgesell *et al.*, 2009a, b; Schlegel *et al.*, 2012a, b). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte *microarray*-Untersuchung deutet auch für das Schwein Veränderungen der Expression von PPAR α -regulierten Genen des Lipidstoffwechsels, speziell der Fettsäureaktivierung und der β -Oxidation, an. Wie bereits durch Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe belegt, wird auch die Transkription von Genen der Carnitinsynthese und des -transports durch den PPAR α reguliert (Wen *et al.*, 2010, 2011, 2012). Die *microarray*-Analyse stellt eine semiquantitative Methode zur Analyse der Genexpression dar. Im Rahmen der zweiten Studie sollten die Befunde der *microarray*-Untersuchung in Bezug auf eine PPAR α -Aktivierung mittels *realtime* RT-PCR erhärtet werden. Diese ermöglicht eine mehr quantitative Erfassung von Daten. Hierzu wurden die mRNA-Konzentrationen von Genen involviert in Fettsäuretransport, β -Oxidation, Carnitinsynthese, -transport und Ketogenese bestimmt. Des Weiteren wurden die Carnitinkonzentrationen in der Leber und im Plasma der laktierenden Sauen analysiert. Detaillierte Informationen bezüglich der Versuchsdurchführung, Material und Methoden sowie die Diskussion der generierten Daten sind ersichtlich in **Studie 2**.

Studie 2:

Rosenbaum S, Ringseis R, Most E, Hillen S, Becker S, Erhardt G, Reiner G, Eder K (2013) *Genes involved in carnitine synthesis and carnitine uptake are up-regulated in the liver of sows during lactation. Acta Veterinaria Scandinavica* 55: 24.

2.3 Untersuchung der Expression Nrf2-regulierter Gene während der Laktation in der Leber von Sauen

Zahlreiche Studien am Nager und der laktierenden Milchkuh beschreiben neben den umfangreichen Veränderungen im Intermediärstoffwechsel ebenfalls laktationsbedingte Veränderungen verschiedener Gene des Abwehrsystems. Untersuchungen an laktierenden Sauen sind sehr begrenzt vorhanden. Aus der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten *microarray*-Analyse konnten auch für die laktierende Sau entsprechende Anpassungsprozesse beobachtet werden. Dies zeigte sich neben einer gesteigerten Expression von Genen der APR

in einer verminderten Expression immunologisch wirksamer Gene in der Leber. In der Literatur wird zudem eine gesteigerte Expression von Nrf2-Zielgenen in der Leber und der Milz von Milchkühen während der Laktation beschrieben (Morris *et al.*, 2009; Gessner *et al.*, 2013). Der Nrf2 nimmt aufgrund seiner antioxidativen und zytoprotektiven Wirkmechanismen eine große Bedeutung während inflammatorischer Zustände ein. Ziel der **3. Studie** war es die mittels *microarray*-Untersuchung gewonnenen Hinweise bezüglich einer veränderten Expression von Genen der APR zu bestätigen. Zudem sollte untersucht werden, inwieweit eine Beeinflussung der Expression von Nrf2-Zielgenen während der Laktation bei Sauen zu beobachten ist. Hierzu wurden mittels der *realtime* RT-PCR die mRNA-Konzentrationen verschiedener Akute-Phase-Proteine (APP) und von Nrf2-Zielgenen bestimmt. Die Ergebnisse der Untersuchungen, das Versuchsdesign, Informationen zu Material und Methoden und die Diskussion der Ergebnisse sind der **Studie 3** zu entnehmen.

Studie 3:

Rosenbaum S, Ringseis R, Hillen S, Becker S, Erhardt G, Reiner G, Eder K (2012) The stress signalling pathway nuclear factor E2-related factor 2 is activated in the liver of sows during lactation. *Acta Veterinaria Scandinavica* 54: 59.

3 Originalarbeiten



Genome-wide transcript profiling indicates induction of energy-generating pathways and an adaptive immune response in the liver of sows during lactation

Susann Rosenbaum ^{a,1}, Robert Ringseis ^{a,1}, Sonja Hillen ^b, Sabrina Becker ^b, Georg Erhardt ^c, Gerald Reiner ^b, Klaus Eder ^{a,*}

^a Institute of Animal Nutrition and Nutritional Physiology, Justus-Liebig-University, Heinrich-Buff-Ring 26-32, 35392 Giessen, Germany

^b Department of Veterinary Clinical Sciences, Swine Diseases, Justus-Liebig-University, Frankfurter Straße 112, 35392 Giessen, Germany

^c Institute for Animal Breeding and Genetics, Justus-Liebig-University, Ludwigstraße 21b, 35390 Giessen, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 August 2012

Received in revised form 4 September 2012

Accepted 4 September 2012

Available online 8 September 2012

Keywords:

Lactation

Sow

Gene expression

Microarray

Liver

ABSTRACT

The present study aimed to explore the lactation-induced changes in hepatic gene expression in sows (*Sus scrofa*) during lactation. Using a porcine whole-genome microarray a total of 632 differentially expressed genes in the liver of lactating compared to non-lactating sows could be identified. Enrichment analysis revealed that the differentially expressed genes were mainly involved in fatty acid metabolism, pyruvate metabolism, glutathione metabolism, glycine, serine and threonine metabolism, citrate cycle, glycerophospholipid metabolism, PPAR signaling, and focal adhesion. The most striking observation with respect to intermediary metabolism was that genes involved in fatty acid catabolism, the catabolism of gluconeogenic amino acids, the citrate cycle and the respiratory chain were up-regulated in the liver of sows during lactation. With respect to immune response, it could be demonstrated that genes encoding acute phase proteins and genes involved in tissue repair were up-regulated and genes encoding adhesion molecules were down-regulated in the liver of sows during lactation. The results indicate that energy-generating pathways and pathways involved in the delivery of gluconeogenic substrates are induced in sow liver during lactation. The alterations of expression of genes encoding proteins involved in immune response suggest that lactation in sows may cause an adaptive immune response that possibly counteracts hepatic inflammation.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Lactation is a physiological state, associated with a marked elevation in the energy and nutrient requirement of the organism. In most mammals, this elevated energy and nutrient demand is met by an increase in food intake and a mobilization of body's energy stores, i.e., white adipose and muscle tissue (Aiello et al., 1984; Collier et al., 1984; Trottier and Easter, 1995; Ringseis et al., 2011). To conserve energy and metabolic substrates for milk synthesis in the lactating mammary gland rodents develop metabolic adaptations during lactation, such as reduction of fatty acid oxidation in liver and muscle and a decreased thermogenesis (Trayhurn et al., 1982; Williamson, 1986; Dewey, 1997; Smith and Grove, 2002). In addition, evidence exists in early lactating cows that an inflammatory response is induced in the liver during lactation (Loor et al., 2005, 2006). These examples show that lactation is accompanied not only by profound adaptations of

the intermediary metabolism but also of immune and inflammation responses.

Rats, mice and dairy cows have been extensively studied to elucidate the mechanisms underlying lactation-induced adaptations of the intermediary metabolism and stress response (Loor et al., 2005, 2006, 2007; Gutgesell et al., 2009a, 2009b; Athippozhy et al., 2011; Bionaz and Loor, 2011). When comparing lactation-induced adaptations of intermediary metabolism across different species, e.g. rodents vs. cows, considerable differences are obvious with regard to specific signaling pathways, e.g. the peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) signaling pathway, which plays a major role in regulating lipid catabolism (Loor et al., 2005, 2006, 2007; Gutgesell et al., 2009a, 2009b). This indicates that the pattern of lactation-induced adaptations is unique for different species and the observations obtained in a certain species cannot be simply transferred to other species. Little is known about specific, corresponding adaptation processes in sows (*Sus scrofa*), although the high energy yield and milk performance (Grün et al., 1993a, 1993b) requires a high energy demand compared to other species (Etienne et al., 1998). Thus, negative effects on reproductive performance are a frequent problem in lactating sows with pronounced negative energy balance (Whittemore, 1996). Improving the understanding of metabolic and immunological adaptations during lactation in sows may help to combat these problems. Few studies analyzed the expression of

Abbreviations: β -HBA, β -hydroxybutyrate; NEFA, non-esterified fatty acids; NF- κ B, nuclear factor κ B; PEPCK, phosphoenolpyruvate carboxykinase; PPAR α , peroxisome proliferator-activated receptor α ; TAG, triacylglycerols; TCA, tricarboxylic acid.

* Corresponding author.

E-mail address: klaus.eder@ernaehrung.uni-giessen.de (K. Eder).

¹ These authors contributed equally to this work.

representative genes of selected pathways in lactating sows (Theil et al., 2005; Laspiur et al., 2009; Ringseis et al., 2011). The complex regulation of metabolic and immunological activities during lactation of the sow still remain unclear. The present study was designed to close this gap of knowledge by exploring changes in the hepatic transcriptome of sows during lactation using a genome-wide transcript profiling technique. Microarray technology has the great advantage that changes in the complete transcriptome can be assessed simultaneously, even though only small amounts of tissue, e.g. biopsy samples, are available. Application of this technique in dairy cows has markedly increased the knowledge about hepatic molecular adaptations during the periparturient period (Loor et al., 2005, 2006, 2007). Combined with measurements on selected blood metabolites and animal performance parameters, this combined approach allow to link changes in the hepatic transcriptome to alterations of liver function during the periparturient period, such as enhanced hepatic fatty acid catabolism and hepatic inflammation (Loor et al., 2005, 2006, 2007).

2. Materials and methods

2.1. Animals and housing

All experimental procedures were carried out in accordance with established guidelines for the care and handling of laboratory animals and were approved by the local Animal Welfare Authorities (Regierungspräsidium Giessen; permission no: GI 19/3-No. 29/2010). Twenty second parity sows (*S. scrofa*; Large White & German Landrace) were used for this study. Each sow was artificially inseminated with semen from boars of the own breed. The sows were kept in single crates until d 21 of pregnancy. From d 21 to 110 of pregnancy, the sows were kept in groups in pens that had fully slatted floors, nipple drinkers and feeding stations. On d 110 of pregnancy, they were moved to the farrowing accommodation where they were housed in single farrowing pens. After farrowing, the sows were randomly assigned into two groups of 10 animals each. In the first group of sows (average body mass: 259 ± 17 kg), all piglets were removed from the sow ("non-lactating group") 24 h after parturition. This group served as the non-lactating control. In the second group (average body mass of sows: 256 ± 17 kg), litters were standardized to 12 piglets per sow ("lactating group"). An infrared heater was suspended above the site of the newborn piglets to keep the temperature at constant 35°C . The climate in the dry sow accommodation and the farrowing unit was maintained at a temperature of $19 \pm 1^\circ\text{C}$ and 60–80% relative humidity by means of an air conditioning system. A light:dark cycle (12-h light:12-h dark) was applied. The suckling period was sustained during the complete experimental period (20 ± 1 days).

2.2. Diets and feeding

Two different nutritional adequate diets according to the recommendations for gestating and lactating sows were fed. During gestation, sows of both groups received a commercial diet for gestating sows *ad libitum*. This diet contained (in g/kg diet): wheat (160), barley (705), soy bean meal with 43% crude protein (80), soy oil (5) and a mineral supplement (50) (Sano Fasern Trag®, Sano-Moderne Tierernährung GmbH, Loiching, Germany) and had a metabolizable energy of 12.2 MJ per kg diet. The second diet was fed from the first day of lactation until the end of the experiment and consisted of (in g/kg diet): wheat (440), barley (350), soy bean meal with 43% crude protein (160), soy oil (15) and a mineral supplement (35) (Sauengold Lac®, Sano-Moderne Tierernährung GmbH). The feed contained 13.1 MJ metabolizable energy (ME) per kg diet. During the first 6 days after farrowing, the amount of feed given to the lactating sows was successively increased (1.6 kg/d on day 1; 2.6 kg/d on day 2; 4.1 kg/d on day 3; 5 kg/d on day 4; 5.5 kg/d on day 5 and 6.0 kg/d on day 6). From day 7 of lactation the sows received an individual amount of feed depending

on their body weights, assuming a daily mobilization of 1 kg body mass, which guaranteed the continued supply of nutrients (GfE, 2006). In the group of sows without litters, each sow received an amount of food sufficient to cover the individual energy and nutrient requirement for maintenance (GfE, 2006). The food intake was recorded daily and the body weights were recorded weekly. Water was provided *ad libitum* by nipple drinking systems.

2.3. Estimation of energy balance of the sows

The sows' energy balance during lactation was estimated according to NRC (1998) as the difference of ME from the diet consumed during lactation and the sum of energy requirement for maintenance and energy requirement for milk production.

2.4. Sample collection

On day 20 after farrowing, blood samples were taken from each sow (from *Vena jugularis*) 3 h after feed intake. Blood was collected in heparinised polyethylene tubes (Sarstedt, Nürnberg, Germany) and plasma was obtained by centrifugation and stored at -20°C . Liver biopsies took place in a separated, cleaned and disinfected room in the animal keeping facility. All sows were anesthetized starting with an intramuscular injection of 0.24 mg/kg body mass of azaperon (Stresnil, Janssen, Germany) and 2.7 mg/kg body mass of ketamine (Ursotamin, Serumwerke Bernburg AG, Germany) and maintained with 2.4 mg/kg body mass of thiopental (Thiopental Inresa 0.5 g, Inresa, Germany). The sites for biopsy were clipped, infiltrated with 1 mL of 2% lidocaine hydrochloride (BelaPharm, Germany) and surgically prepared with 70% ethanol and iodine. A stab incision was made through the skin using a scalpel blade and subsequently closed with one suture of 1–0 synthetic, non-absorbable suture. Liver biopsy samples were taken percutaneously with a 16 G/1.65 mm biopsy needle (length: 160 mm) on a HistoCore® system (BIP Biomed. Instrumente & Produkte GmbH, Germany) as described by Washburn et al. (2005). Liver samples were immediately snap-frozen and stored at -80°C until analysis.

2.5. Lipid and ketone body analysis

Plasma concentrations of triacylglycerols (TAG), non-esterified fatty acids (NEFA) and β -hydroxybutyrate (β -HBA) were determined using enzymatic reagent kits from Analyticon Biotechnologies (Lichtenfels, Germany) and Wako Chemicals (Neuss, Germany) according to the manufacturer's protocol.

2.6. RNA isolation and quality control

Total RNA from frozen liver samples was isolated using Trizol™ reagent (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) according to the manufacturer's protocol and purified using the RNeasy Minikit (Qiagen, Hilden, Germany). RNA concentration and purity were estimated from the optical density at 260 and 280 nm, respectively. The A260/A280 ratios were 1.96 ± 0.01 . The integrity of total RNA was checked using 1% agarose gel electrophoresis. RNA was judged as suitable for array hybridization if intact bands corresponding to the 18S and 28S ribosomal subunits were detectable.

2.7. Microarray analysis

For microarray analyses, four RNA pools each, for the non-lactating group ($n = 4$) and the lactating group ($n = 4$), were prepared from eight individual sows per group. To each RNA pool, RNA from two different sows per group contributed identical amounts of RNA. The RNA pools were sent to the Centre of Excellence for Fluorescent Bioanalytic Microarray Technology (KFB) at the University of

Regensburg for hybridization to the 24 K-Affymetrix GeneChip porcine genome array (Affymetrix, UK), which contains 23,937 probe sets that represent approximately 23,256 porcine transcripts from 20,201 *S. scrofa* genes. In brief, total RNA was examined for quality and quantity using an Agilent Bioanalyser 2100. The A260/A280 ratios and the RIN (RNA integrity number) values were 2.02 ± 0.04 and 7.6 ± 0.7 , respectively. Subsequently, total RNA was transcribed to first- and second-strand cDNA. After purification and testing on the Agilent Bioanalyser 2100, the double-stranded cDNA served as a template for the in vitro-transcription reaction for cRNA synthesis. The cRNA was labeled with biotin using the Affymetrix GeneChip labeling kit. After checking the quality and quantity of the labeled cRNA, cRNA was fractionated and hybridized with the Affymetrix GeneChips. GeneChips were washed and stained with the Affymetrix GeneChip Fluidics Station 450. The GeneChips were then scanned with an Affymetrix GeneChip scanner 3000. All procedures were performed according to Affymetrix protocols (GeneChip expression analysis, Technical manual from Affymetrix). The quality of hybridization was assessed in all samples following the manufacturer's recommendations. The microarray data have been deposited in NCB's Gene Expression Omnibus public repository [(Edgar et al., 2002); GEO accession no. GSE38357].

2.8. Functional interpretation of microarray data

After scanning the arrays, cell intensity files containing a single intensity value for each probe cell were computed from the image data with the Affymetrix GeneChip Command Console Software. Probe cell intensity data were further analyzed in the Affymetrix Expression Console software using the Robust Multichip Analysis (RMA) algorithm. The RMA algorithm is a log scale multi-chip analysis approach that fits a robust linear model at the probe level to minimize the effect of probe-specific affinity differences. Expression levels of probe sets are measured using log transformed perfect match values, after carrying out a global background adjustment and across array normalization. The RMA approach increases sensitivity to small changes between experiment and control samples and minimizes variance across the dynamic range, but does compress calculated fold change values (Irizarry et al., 2003). Expression levels of probe sets of the lactating and non-lactating group were compared using an unpaired Student's *t*-test (Two-tailed distribution, two-sample equal variance). Probe sets with a *P*-value < 0.05 and a fold change of ≥ 1.5 or ≤ -1.5 were considered to be differentially expressed. Identified probe sets were annotated by a published annotation list (Tsai et al., 2006).

To extract biological meaning from the identified differentially expressed genes, we used the bioinformatic tools from the Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) bioinformatic resource (Huang da et al., 2009). The DAVID Functional Annotation Chart tool was used for gene-term enrichment analysis with a modified Fisher's exact test (EASE score) in order to identify enriched regulatory pathways with the differentially expressed genes using the KEGG pathway database. In addition, the same tool was used to identify enriched (overrepresented) Gene Ontology (GO) terms (GO categories – biological process and molecular function) with the differentially expressed genes. GO has been widely used as a tool for the interpretation of microarray differential gene expression by grouping genes according to mapped GO terms (Ashburner et al., 2000). Regulatory pathways and GO terms were ranked according to their *P*-values (EASE scores) describing the significance of enrichment. The smaller the *P*-values the more significant they are. Only regulatory pathways and GO terms with an EASE score < 0.1 and < 0.01, respectively, were considered. Moreover, the DAVID Functional Annotation Clustering tool was used for functionally clustering similar terms associated with the differentially expressed genes by integrated analysis of the GO database. The grouping algorithm is based on the hypothesis that similar

annotations should have similar gene members. The DAVID Functional Annotation Clustering tool integrates κ -statistics, which is a chance corrected measure of agreement between two sets of categorized data, to measure the degree of the common genes between two annotations, and fuzzy heuristic clustering to classify the groups of similar annotations according to κ -values. The enrichment score for each annotation group, which is the geometric mean of all enrichment *P*-values (EASE scores) of each annotation term in the group, was used to rank the importance of the identified clusters.

2.9. Quantitative real-time RT-PCR (qPCR)

Microarray expression data of selected genes were validated by qPCR using individual liver RNA samples ($n = 8$ per group). From each RNA sample, 1.2 μg of total RNA were used for cDNA synthesis. Afterwards, qPCR analyses of selected genes using gene-specific primers and the cDNA as template were carried out as described in detail recently (Keller et al., 2012). The primers were designed using Primer3 and BLAST (Table 1). Subsequently, cDNA was aliquoted and stored at -20°C until use. To create a standard curve, a cDNA pool was prepared from all individual samples. qPCR was performed using 2 μL cDNA combined with 18 μL of a mixture containing 10 μL KAPA SYBR FAST qPCR Universal Mastermix (Peqlab, Erlangen, Germany), 0.4 μL each of 10 μM forward and reverse primers and 7.2 μL DNase/RNase free water in 0.1 mL tubes (Ltf Labortechnik, Wasserburg, Germany). qPCR runs were performed using a Rotorgene 2000 system (Corbett Research, Mortlake, Australia). Each run included all samples and a 6-point standard curve plus the non-template control. The protocol for qPCR was: 3 min at 95°C , followed by 40 cycles of a two-step PCR consisting of 5 s denaturation at 95°C and 20 s annealing, and a final extension step at 60°C . Finally, melting curve analysis was performed from 50°C to 95°C to verify the presence of a single PCR product. In addition, the amplification of a single product of the expected size was confirmed using 1.5% agarose gel electrophoresis stained with GelRed™ nucleic acid gel stain (Biotium, Hayward, CA, USA). Rotorgene Software 5.0 (Corbett Research) was used to obtain *Ct* values of target genes and reference genes. Determination of the relative expression levels was carried out by calculating the relative quantities using the GeNorm normalization factor as described recently in detail (Vandesompele et al., 2002). The GeNorm normalization factor was calculated as the geometric mean of expression data of the three most stable out of five tested potential reference genes according to reference gene stability testing described by Vandesompele et al. The calculated stability scores (*M*-values) for the five candidate reference genes were (first: most stable and last: least stable): *RPS9* (0.053), *ATP5G1* (0.054), *GSR* (0.055), *ACTB* (0.064), and *SHAS2* (0.076). From the normalized expression data for the samples of each group the mean and SD were calculated. The mean of the non-lactating group was set to 1 and the mean of the lactating group was scaled proportionally and presented as fold of non-lactating group. Data on qPCR performance for each gene measured are shown in (Table 2).

2.10. Statistical analysis

Values presented in the text are means $\pm$ SD. Effects of non-lactating compared to lactating sows were evaluated by one-way analysis of variance. Fisher's multiple range test was used to generate significant *F*-values of differences with $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Feed intake, body weight development and estimated energy balance of sows

During the whole lactation period, sows of the lactating group had a higher feed intake than sows of the non-lactating group (5.53 ± 1.06 vs.

Table 1
Characteristics of primers used for qPCR.

Gene symbol	Primer sequence (forward, reverse; from 5' to 3')	NCBI GeneBank	Product size (bp)
ATP5G1	CAGTCACCTTGAGCCGGGCGA, TAGCGCCCGGTGGTTTGC	NM_001025218.1	94
ACTB	GACATCCGCAAGGACCTCTA, ACATCTGCTGGAAGGTGGAC	XM_003124280.2	205
GSR	AGCGCGATGCCTACGTGAGC, GGTACGCGCCTGTGGCAAT	AY368271.1	175
RPS9	GTGCAAGACTTATGTGACC, AGCTTAAAGACCTGGGTCTG	XM_003356050.1	325
SHAS2	GAAAAGGCTAACCTACCCTG, TGTTGGACAAGACCAGTTGG	NM_214053.1	218
ACADSB	TCGTGATACCGAGGGCCTCCG, TCCCAGCATCTGTGCCGCAA	XM_001926297.2	196
ACSL5	CTGTGATAAGCCCGAAAAGG, GGCATCAAGCAGGGATAAGA	NM_001195321.1	157
APOA4	AGCCTCACGCCCTATGCGGA, ATGCACGTTCTCGGCCACCG	NM_214388.1	228
CCR5	CTCCCGGCTCTGGCAAAATGGA, CCCACTCGTACCACCCCGA	NM_001001618.1	467
CPT1A	GCATTTGTCCCATCTTTCGT, GCACTGGTCTCTCTGGGATA	AF288789	198
CYCS	CCAGTGCCACACTGTAGAAA, GTGTAAGAGAATCCAGGAGC	NM_001129970.1	102
EGF	GGTGGCAGATGCTGGAATAT, GCCTTCTGTATTGACC	NM_214020.1	208
FABP3	CAACATGACCAAGCCTACCA, CTAGTTCCCGACAACAGCGTT	NM_001099931.1	227
GAPDH	AGGGGCTCTCCAGAACATCATCC, TCGCGTGTCTTGTGGGGTTGG	AF017079.1	446
GLUL	GGAATCGACATGGGAGATCA, TTCAGACCATCTCTCTCG	NM_213909.1	173
GPI	CACGAGCACCGCTCTGACCT, CCACTCCGACACGCTTGCA	NM_214330.1	365
IGF1	ACAAGCCCACAGGTACGGCT, GCCGACTTGGCAGGCTTGAGG	NM_214256.1	133
PC	ATCACGTCCCTGCACGAGGC, GTGGCGCGCTTCTCGATGAA	NM_214349.1	213
SDHA	CTACGCCCCGTCGCAAGG, AGTTTGCCCCCAGGCGGTTG	DQ402993	380
SLC2A2	CGCAACCATTTGGAGTTGGCGC, TGGCAAAACAAACATCCCACTCA	NM_001097417.1	122

2.18 ± 0.27 kg/day; $P < 0.05$; $n = 10$). Feed intake in the lactating group increased continuously from week 1 (4.22 ± 0.26 kg/day), to week 2 (5.91 ± 0.39 kg/day) and week 3 (6.46 ± 0.58 kg/day) ($P < 0.05$; $n = 10$). Feed intake in the non-lactating group did not differ between the three weeks of lactation (week 1: 2.12 ± 0.19 kg/day, week 2: 2.23 ± 0.28 kg/day, week 3: 2.17 ± 0.34 kg/day; $n = 10$).

Sows of both groups lost body weight throughout the experimental period. However, body mass loss during the entire experiment was more pronounced in sows of the lactating group than in those of the non-lactating group (30.3 ± 6.2 vs. 18.8 ± 3.7 kg; $P < 0.05$; $n = 10$). Peak reduction of body weight in the lactating group was in the first and second week and a less severe reduction of body weight was observed in the third week (data not shown). The non-lactating group showed the greatest weight loss in the first week after farrowing followed by the second and the third week (data not shown). According to the greater loss of body weight in the lactating group during the experimental period, final body masses were lower in sows of the lactating group than in those of the non-lactating group (223 ± 18 vs. 241 ± 11 kg; $P < 0.05$; $n = 10$).

Table 2
Quantitative real-time PCR performance data.

Gene	Slope	R ^{2a}	Efficiency ^b
ACADSB	−0.30	0.999	1.99
ACSL5	−0.32	0.999	2.07
APOA4	−0.29	0.999	1.96
ATP5G1	−0.30	0.998	1.99
CPT1A	−0.29	0.999	1.97
CYCS	−0.31	0.996	2.03
EGF	−0.32	0.981	2.09
FABP3	−0.32	0.994	2.08
GAPDH	−0.28	0.999	1.88
GLUL	−0.28	0.992	1.90
GPI	−0.28	0.991	1.92
GSR	−0.29	0.997	1.94
IGF1	−0.30	0.999	2.00
PC	−0.36	0.993	2.28
RPS9	−0.28	0.999	1.91
SDHA	−0.27	0.990	1.86
SLC2A2	−0.31	0.999	2.06

^a Coefficient of determination of the standard curve.

^b The efficiency is determined by $\{10^{-\text{slope}}\}$.

Sows of the lactating group had a negative energy balance during the experimental period, whereas sows of the non-lactating group had a slightly positive one (lactating group: −34.7 ± 1.63 MJ ME/day, non-lactating group: +1.21 ± 1.63 MJ ME/day; $P < 0.05$; $n = 10$).

3.2. Concentration of biochemical parameters in plasma of sows

Plasma concentrations of TAG and β-HBA at day twenty of lactation were lower in the lactating sows than in the non-lactating sows (TAG: 0.27 ± 0.04 mmol/L vs. 0.33 ± 0.05; β-HBA: 6.5 ± 2.6 μmol/L vs. 12.1 ± 4.3; $P < 0.05$; $n = 10$). In contrast, the plasma NEFA concentration was lower in sows of the non-lactating group than in those of the lactating group (295 ± 15 vs. 351 ± 25 μmol/L; $P < 0.05$; $n = 10$).

3.3. Identification of differentially expressed genes in liver tissue of sows

Microarray analysis revealed that 708 probe sets were differentially expressed (fold change ≥ 1.5 and ≤ −1.5; $P < 0.05$). Due to the still relatively poor annotation of the Affymetrix GeneChip the differentially expressed genes were largely annotated using the annotation list created by Tsai et al. (2006), which is based on BLAST comparison of Ensembl human cDNA and genomic sequences and the Affymetrix porcine target sequences, which were extended with porcine sequence information of the *S. scrofa* Gene Index (Institute for Genome Research, TIGR). Analysis by DAVID bioinformatic resource requires conversion of the porcine Affymetrix probe set IDs into the human probe set IDs because DAVID is not compatible with porcine gene information. 632 out of the 708 differentially expressed probe sets that matched to the human RefSeq entries could be converted into the human probe set IDs. 331 of these probe sets were up-regulated and 301 were down-regulated in the liver of lactating compared to non-lactating sows. The 15 strongest up- and down-regulated genes are shown in Table 3.

3.4. Validation of microarray data by qPCR

We randomly selected a total of 15 differentially expressed genes to validate microarray data using qPCR. As shown in the Table 4, the lactation-induced changes in gene expression observed with microarray analysis could be confirmed by qPCR for 12 genes. However, in most cases (11 genes) the fold changes obtained from qPCR analysis

Table 3

The most strongly up- and down-regulated genes in the liver of sows during lactation.

Probe set ID	Gene name (Gene symbol)	Fold change (lact. vs. non-lact.)	P-value ^a
<i>Up-regulated genes</i>			
Ssc.29449.1.A1_at	Histone deacetylase 4 (HDAC4)	5.24 ± 2.15	0.002
Ssc.14503.1.S1_at	Apolipoprotein A-IV (APOA4)	5.05 ± 2.49	0.040
Ssc.4308.1.A1_at	Tetrapeptide repeat domain 21B (Q7Z4L5)	4.87 ± 1.24	0.001
Ssc.9392.2.S1_at	Pro-epidermal growth factor (EGF)	4.46 ± 2.21	0.006
Ssc.20303.1.S1_at	Phosphomannomutase 1 (PMM1)	3.69 ± 2.21	0.011
Ssc.21145.1.S1_at	Beta-defensin 1 (DEFB1)	3.66 ± 3.36	0.027
Ssc.3326.1.S1_at	Cbp/p300-interacting transactivator 1 (CITED1)	3.23 ± 1.38	0.001
Ssc.4328.1.S1_at	vacuolar protein sorting 13D (NP_056193)	3.17 ± 1.29	0.002
Ssc.12475.1.A1_at	L-3-phosphoserine phosphatase (PSPHL)	3.02 ± 2.56	0.027
Ssc.15980.1.S1_at	Lipopolysaccharide-binding protein (LBP)	2.78 ± 2.20	0.013
Ssc.16157.1.S1_at	C-reactive protein (CRP)	2.65 ± 2.22	0.016
Ssc.10837.1.A1_at	Roundabout homolog 1 (ROBO1)	2.55 ± 2.60	0.047
Ssc.27270.1.S1_at	CGI58 protein; comparative gene identification 58 (ABHD5)	2.54 ± 1.28	0.006
Ssc.2516.2.S1_a_at	Sodium-dependent multivitamin transporter (SLC5A6)	2.50 ± 1.40	0.000
Ssc.21113.2.S1_at	Lipid phosphate phosphohydrolase 1 (PPAP2A)	2.45 ± 1.59	0.002
<i>Down-regulated genes</i>			
Ssc.27410.1.S1_at	N-myc proto-oncogene protein (MYCN)	−9.73 ± 1.71	0.001
Ssc.16169.1.S1_x_at	HLA class II histocompatibility antigen (HLA-DRB4)	−3.93 ± 2.79	0.027
Ssc.21543.1.S1_at	18 kDa protein	−2.82 ± 1.21	0.002
Ssc.7570.2.S1_at	Excitatory amino acid transporter 3 (SLC1A1)	−2.72 ± 1.41	0.001
Ssc.15678.1.A1_s_at	Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 6 (CHCHD6)	−2.70 ± 1.14	0.003
Ssc.16434.1.A1_at	Nephroblastoma overexpressed gene protein homolog (NOV)	−2.63 ± 1.27	0.000
Ssc.11048.1.S1_at	Placenta-specific gene 8 protein (PLAC8)	−2.56 ± 2.04	0.020
Ssc.5876.1.A1_at	Carbonic anhydrase-related protein 10 (CA10)	−2.53 ± 1.61	0.006
Ssc.24721.1.A1_at	Fatty acid transporter (SLC27A6)	−2.51 ± 2.14	0.023
Ssc.19224.1.S1_at	Gelsolin precursor, plasma (GSN)	−2.41 ± 1.23	0.001
Ssc.10487.2.A1_at	Retinoic acid receptor responder protein 1 (RARRES1)	−2.41 ± 1.45	0.002
Ssc.3590.1.A1_at	Frizzled-1 (FZD1)	−2.35 ± 1.23	0.001
Ssc.44.1.S1_at	Integrin beta-3 (ITGB3)	−2.34 ± 1.30	0.002
Ssc.26765.1.S1_at	Orphan nuclear receptor (NR6A1)	−2.32 ± 1.30	0.008
Ssc.14368.1.A1_at	Multimerin 1 (MMRN1)	−2.28 ± 1.26	0.024

Values represent mean ± SD for n = 4 gene chips per group.

^a According to unpaired Student's *t*-test (two-tailed distribution and two-sample equal variance).

were higher than those from microarray analysis. Two genes (*EGF*, *PC*) that were shown to be up-regulated by means of microarray analysis were not altered according to qPCR analysis, whereas another gene (*CCR5*) that was down-regulated according to microarray analysis was not changed according to qPCR analysis.

3.5. Identification of overrepresented regulatory pathways

To identify differentially regulated regulatory pathways, DAVID gene-term enrichment analysis was applied on the 632 differentially expressed genes using the KEGG pathway database, which provides insight into molecular interaction networks. Identified pathways were (EASE score < 0.1): glutathione metabolism ($P = 1.6\text{E-}02$), complement and coagulation cascades ($P = 2.2\text{E-}02$), glycine, serine and threonine metabolism ($P = 3.7\text{E-}02$), citrate cycle ($P = 3.7\text{E-}02$),

Table 4

Validation of microarray data analysis using qPCR.

Gene symbol	Gene name	Mean FC (lactating vs. non-lactating)	
		Microarray	qPCR
ACSL5	Long-chain acyl-CoA synthetase 5	1.7*	2.4**
CPT1A	Carnitine O-palmitoyltransferase I, mitochondrial liver isoform	2.5*	4.6**
FABP3	Fatty acid-binding protein, heart	−2.3**	−2.3**
APOA4	Apolipoprotein A-IV	5.1*	16.4***
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, liver	1.5**	3.2***
GPI	Glucose-6-phosphate isomerase	1.6**	5.0***
PC	Pyruvate carboxylase, mitochondrial	1.6*	1.6
SLC2A2	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter, member 2	1.6*	2.5***
ACADSB	Acyl-CoA dehydrogenase, short/branched chain specific, mitochondrial	2.1**	2.7**
GLUL	Glutamine synthetase	2.3**	4.4***
SDHA	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial	1.6**	7.5***
CYCS	Cytochrome c	1.6**	3.4***
EGF	Pro-epidermal growth factor	4.5**	−1.5
IGF1	Insulin-like growth factor IA (somatomedin C)	1.9*	2.8***
CCR5	Chemokine receptor 5	−1.5**	−1.1

FC = fold change. Asterisks denote difference from non-lactating group.

* $P < 0.05$.** $P < 0.01$.*** $P < 0.001$.

glycerophospholipid metabolism ($P = 5.9\text{E-}02$), PPAR signaling pathway ($P = 6.3\text{E-}02$), focal adhesion ($P = 6.9\text{E-}02$), vibrio cholerae infection ($P = 7.9\text{E-}02$), pyruvate metabolism ($P = 8.0\text{E-}02$) and fatty acid metabolism ($P = 8.0\text{E-}02$) (Fig. 1).

3.6. Identification of overrepresented annotation terms

To gain information about biological processes influenced by the differentially expressed genes gene-term enrichment analysis based on the GO category biological process was carried out using the DAVID functional annotation chart tool. According to this, 445 of the 541 differentially expressed genes were assigned to 42 biological processes with a P -value of < 0.01. The 12 most significant biological processes were (first: lowest P -value and last: highest P -value; Fig. 2): response to organic substance ($P = 1.1\text{E-}05$), oxidation reduction ($P = 1.4\text{E-}05$), response to wounding ($P = 6.6\text{E-}05$), serine family amino acid metabolic process ($P = 1.6\text{E-}04$), regulation of apoptosis ($P = 3.1\text{E-}04$), regulation of programmed cell death ($P = 3.9\text{E-}04$), ER to Golgi vesicle-mediated transport ($P = 3.9\text{E-}04$), regulation of cell death ($P = 4.2\text{E-}04$), anti-apoptosis ($P = 4.5\text{E-}04$), immune effector process ($P = 4.6\text{E-}04$), blood vessel development ($P = 4.7\text{E-}04$), and blood vessel morphogenesis ($P = 6.0\text{E-}04$). The numbers of genes belonging to each function and their regulation (up or down) are shown in Fig. 2. Other biological processes not shown in Fig. 2 were dealing with immune response, such as immune effector process, humoral immune response, leukocyte mediated immunity and lymphocyte mediated immunity. The biological processes with the highest fold enrichment score were: response to folic acid (22.8), L-serine metabolic process (15.2), serine family amino acid biosynthetic process (11.1) and serine family amino acid metabolic process (8.2).

To gain information about molecular functions influenced by the differentially expressed genes gene-term enrichment analysis based on the GO category molecular function was carried out using the DAVID functional annotation chart tool. According to this, the following molecular functions with a P -value of < 0.01 could be identified (first: lowest P -value and last: highest P -value; Fig. 2): coenzyme binding ($P = 8.8\text{E-}05$), cofactor binding ($P = 1.9\text{E-}04$), MHC protein

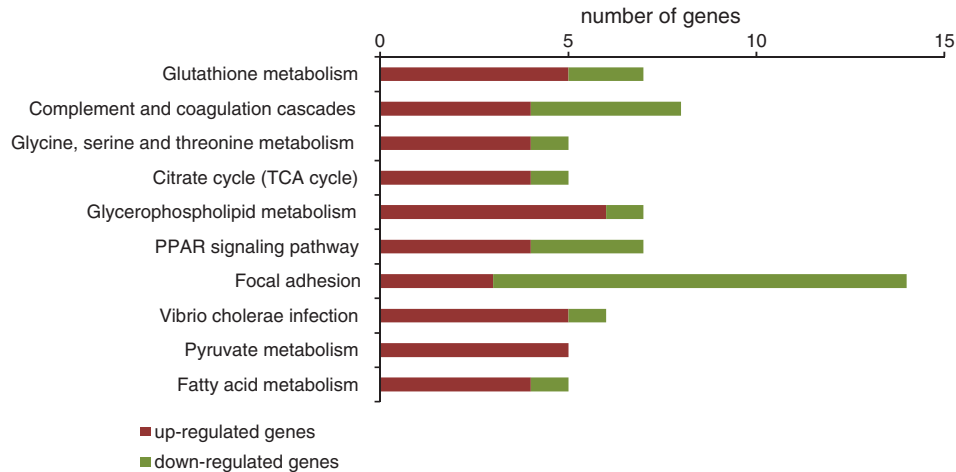


Fig. 1. Identification of overrepresented regulatory pathways. Gene-term enrichment analysis based on KEGG pathway database was carried out on the differentially expressed genes using the DAVID functional annotation chart tool. Only terms with an EASE score < 0.1 are shown.

binding ($P = 1.1E-03$), glycosaminoglycan binding ($P = 2.1E-03$), FAD binding ($P = 2.3E-03$), electron carrier activity ($P = 2.4E-03$), unfolded protein binding ($P = 4.3E-03$), pattern binding ($P = 4.5E-03$), polysaccharide binding ($P = 4.5E-03$), heparin binding ($P = 6.4E-03$) and intramolecular oxidoreductase activity ($P = 7.4E-03$). The numbers of genes belonging to each function and their regulation (up or down) are shown in Fig. 2. The three molecular functions with the highest fold

enrichment score were: MHC protein binding (7.1), intramolecular oxidoreductase activity (5.4) and FAD binding (3.7).

3.7. Identification of clusters of functionally related annotation terms

To identify clusters of functionally related biological processes and molecular functions we used the DAVID functional annotation clustering

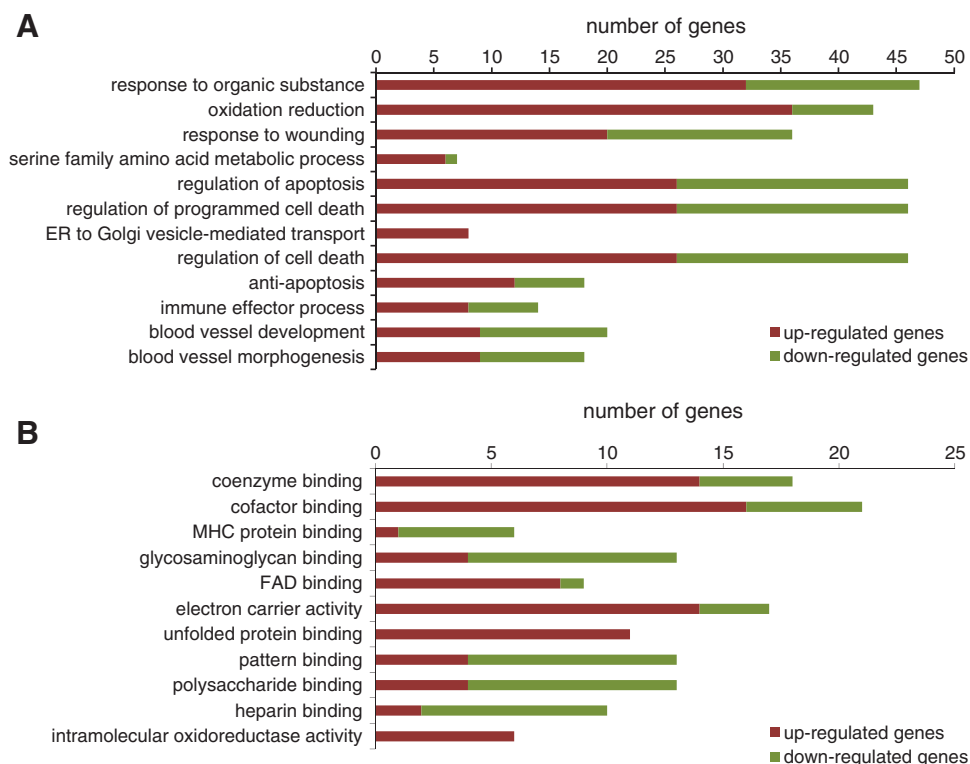


Fig. 2. Identification of overrepresented annotation terms. Gene-term enrichment analysis based on GO categories – biological process and molecular function was carried out on the differentially expressed genes using the DAVID functional annotation chart tool. A. Biological processes with an EASE score < 0.01 (only the 12 top-ranked) are shown. B. Molecular functions with an EASE score < 0.01 are shown.

Table 5

Identification of functionally related annotation groups (GO categories biological process and molecular function).

Cluster	GO term	Count	P-value
1	Regulation of apoptosis	46	3.13E-04
	Regulation of programmed cell death	46	3.87E-04
	Regulation of cell death	46	4.18E-04
	Anti-apoptosis	18	4.53E-04
	Negative regulation of apoptosis	23	3.19E-03
	Negative regulation of programmed cell death	23	3.76E-03
	Negative regulation of cell death	23	3.90E-03
	Apoptosis	26	1.35E-01
	Programmed cell death	26	1.52E-01
	Regulation of body fluid levels	14	7.50E-04
2	Wound healing	16	1.60E-03
	Hemostasis	10	9.08E-03
	Blood coagulation	9	1.89E-02
	Coagulation	9	1.89E-02
3	Glycosaminoglycan binding	13	2.08E-03
	Polysaccharide binding	13	4.54E-03
	Pattern binding	13	4.54E-03
	Heparin binding	10	6.40E-03
	Carbohydrate binding	18	7.18E-02
4	Regulation of apoptosis	46	3.13E-04
	Regulation of programmed cell death	46	3.87E-04
	Regulation of cell death	46	4.18E-04
	Positive regulation of apoptosis	23	2.66E-02
	Positive regulation of programmed cell death	23	2.85E-02
	Positive regulation of cell death	23	2.95E-02
	Induction of apoptosis	15	1.69E-01
5	Induction of programmed cell death	15	1.71E-01
	Cell redox homeostasis	9	1.01E-03
	Intramolecular oxidoreductase activity	6	7.42E-03
	Intramolecular oxidoreductase activity, transposing S-S bonds	3	3.28E-02
	Protein disulfide isomerase activity	3	3.28E-02
	Intramolecular oxidoreductase activity, interconverting keto- and enol-groups	3	4.01E-02
6	Serine family amino acid metabolic process	7	1.59E-04
	L-serine metabolic process	4	1.74E-03
	Serine family amino acid biosynthetic process	4	4.76E-03
	Amine biosynthetic process	7	4.99E-02
	Cellular amino acid biosynthetic process	5	8.57E-02
	Carboxylic acid biosynthetic process	8	2.48E-01
	Organic acid biosynthetic process	8	2.48E-01
7	Leukocyte mediated immunity	9	7.17E-03
	Lymphocyte mediated immunity	8	7.91E-03
	Natural killer cell mediated cytotoxicity	3	2.64E-02
	Natural killer cell mediated immunity	3	2.64E-02
	Leukocyte mediated cytotoxicity	3	4.06E-02
	Cell killing	3	1.85E-01
8	Intracellular transport	34	1.00E-02
	Establishment of protein localization	38	1.26E-02
	Intracellular protein transport	21	2.23E-02
	Protein localization	41	2.33E-02
	Protein transport	36	2.78E-02
	Protein targeting	13	5.14E-02
	Cellular protein localization	21	5.16E-02
	Cellular macromolecule localization	21	5.49E-02

tool. Clusters were ranked according to the enrichment score for each cluster reflecting the geometric mean of all the enrichment P-values (EASE scores) of each annotation term in the cluster. The 8 top-ranked clusters showing the highest enrichment scores are shown in Table 5. Two of those clusters (cluster 1 and 4) allocated GO terms dealing with regulation of apoptosis, one (cluster 2) with wound healing, one (cluster 3) with carbohydrate binding, one (cluster 5) with cell redox homeostasis

and intramolecular oxidoreductase activity, one (cluster 6) with serine family amino acid metabolic process, one (cluster 7) with immune processes such as leukocyte mediated immunity and cell killing and one (cluster 8) with intracellular transport and protein targeting.

3.8. Identification of lactation-induced changes in the expression of genes involved in intermediary metabolism and immune response in the liver

To get a deeper insight into lactation-induced changes in intermediary metabolism, we evaluated changes in the expression of genes involved in specific metabolic pathways such as fatty acid transport and catabolism, glucose metabolism, amino acid metabolism, tricarboxylic acid (TCA) cycle and ATP synthesis-coupled proton transport. Considering all 632 differentially expressed genes, we observed that all genes involved in carbohydrate metabolism (*GAPDH*, *GPI*, *PDHA*, *PDHB*, *PC* and *SLC2A2*) and almost all genes encoding proteins involved in lipid metabolism (*ACSL5*, *CPT1A*, *SLC25A20*, *ACADVL*, *HADHB*, *FADS6*, *PEMT*, *PPAP2A*, *APOA4*, *CYP4A11*, *ABCD3*, and *CYP4A22*), amino acid metabolism (*ACAD8*, *ACADSB*, *HIBCH*, *HADHB*, *GCSH*, *GLUL*, *PHGDH*, and *PSPH*), TCA cycle (*IDH1* and *SDHA*) and ATP synthesis-coupled proton transport (*CYCS*) were increased in the liver of lactating compared to non-lactating sows (Table 6).

3.9. Identification of lactation-induced changes in the expression of genes involved in immune response in the liver

To further identify lactation-induced changes in the immune response, we evaluated changes in the expression of genes involved in cell adhesion, immunoregulatory molecules, acute phase proteins and growth factors. Considering all 632 differentially expressed genes, we found that most of the genes encoding focal adhesion molecules (*COL1A2*, *FN1*, *FYN*, *ITGB3*, *LAMC1*, *MAPK9*, *PARVG*, *PRKCB1*, *RAPGEF1*, *THBS1*) and genes encoding immunoregulatory molecules (*CCR*, *CD55*, *CD8a*, *HLA-DRA*, *HLA-DRB2*, *HLA-DRB4*, *HLA-DQB2*, *MS4A2*, *MYO1F*, *TRAC*) were down-regulated in the liver of lactating compared to non-lactating sows (Table 7). In contrast, most of the genes encoding acute phase proteins (*CRP*, *CFB*, *DEFB1*, *LBP*) and growth factors (*BCL2*, *EGF*, *IGF1*) were up-regulated in the liver of lactating compared to non-lactating sows.

4. Discussion

In the present study, we performed an experiment with 20 sows which were divided into two groups of sows, lactating and non-lactating, 24 h after parturition. In the non-lactating group, litters were removed from all sows 24 h after parturition. Removal of the litters from the sows causes a cessation of milk production because of the lack of suckling stimulus on the mammary gland (Quesnel and Prunier, 1995). In the lactating group, the litter size was standardized to 12 piglets per sow in order to ensure that metabolic performance for milk output is similar between lactating sows. This is necessary because the extent of increase in food intake, mobilization of energy stores and additional metabolic adaptations during lactation is proportional to the milk output, which itself increases with increasing litter size (Pedraza et al., 2001). Liver biopsy samples were taken around peak lactation at day 20 of lactation in order to assess the changes in hepatic gene expression at the time point at which metabolic performance for milk production is greatest (Noblet and Etienne, 1989; Etienne et al., 1998).

4.1. Effect of lactation on energy balance of sows

Evaluation of body weight development of sows throughout the course of lactation revealed that sows of both groups lost body weight during lactation but that body weight loss was greater in lactating than in non-lactating sows despite the fact that lactating sows had a

Table 6

Differentially regulated genes involved in intermediary metabolism in the liver of sows during lactation.

Probe set ID	Symbol	Gene name	Fold change (lact. vs. non-lact.)	P-value ^a
<i>Lipid metabolism</i>				
Ssc.3458.2.S1_at	ACSL5	Long-chain acyl-CoA synthetase 5	1.70 ± 1.21	0.013
Ssc.8974.1.S1_at	CPT1A	Carnitine O-palmitoyltransferase I, mitochondrial liver isoform	2.46 ± 1.95	0.05
Ssc.19212.1.S1_at	SLC25A20	Carnitine/acylcarnitine translocase (CACT)	1.88 ± 1.28	0.002
Ssc.16637.1.S1_at	ACADVL	Acyl-CoA dehydrogenase, very-long-chain specific, mitochondrial	1.68 ± 1.33	0.029
Ssc.23043.1.S1_at	HADHB	Hydroxyacyl-CoA DH/3-ketoacylCoA thiolase/enoyl-CoA hydratase trifunctional enzyme beta subunit, mitochondrial	1.91 ± 1.26	0.004
Ssc.24721.1.A1_at	SLC27A6	Solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 6; very long-chain	− 2.51 ± 2.14	0.023
Ssc.4360.1.A1_at	FABP3	Fatty acid-binding protein, heart	− 2.27 ± 1.69	0.005
Ssc.18215.1.S1_at	PEMT	Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase	1.80 ± 1.09	0.001
Ssc.21113.2.S1_at	PPAP2A	Phosphatidic acid phosphatase 2a	2.45 ± 1.59	0.002
Ssc.14503.1.S1_at	APOA4	Apolipoprotein A-IV	5.05 ± 2.48	0.04
Ssc.15895.1.S1_s_at	CYP4A11	Cytochrome P450 4A11	1.57 ± 1.26	0.007
Ssc.14114.1.A1_at	ABCD3	ATP-binding cassette, sub-family D, member 3	1.74 ± 1.29	0.029
Ssc.190.1.S1_at	CYP4A22	Cytochrome P450, family 4, subfamily A, polypeptide 22	1.83 ± 1.40	0.05
<i>Carbohydrate metabolism</i>				
Ssc.14942.1.S1_s_at	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, liver	1.53 ± 1.15	0.001
Ssc.2375.1.S1_at	GPI	Glucose-6-phosphate isomerase	1.60 ± 1.20	0.004
Ssc.16248.1.S1_at	PDHA	Pyruvate dehydrogenase, alpha subunit, somatic form, mitochondrial	1.54 ± 1.27	0.029
Ssc.4382.1.S1_at	PDHB	Pyruvate dehydrogenase E1 component beta subunit, mitochondrial	1.71 ± 1.20	0.003
Ssc.17347.1.S1_at	PC	Pyruvate carboxylase, mitochondrial	1.64 ± 1.34	0.027
Ssc.23849.1.A1_at	SLC2A2	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter, member 2	1.59 ± 1.52	0.022
<i>Amino acid metabolism</i>				
Ssc.21283.2.S1_at	ACAD8	Acyl-CoA dehydrogenase family member 8, mitochondrial	1.53 ± 1.34	0.046
Ssc.7572.2.S1_at	ACADSB	Acyl-CoA dehydrogenase, short/branched chain specific, mitochondrial	2.08 ± 1.82	0.031
Ssc.25934.1.S1_at	HIBCH	3-Hydroxyisobutyryl-coenzyme A hydrolase	1.72 ± 1.27	0.007
Ssc.23043.1.S1_at	HADHB	Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase/3-ketoacyl-CoA thiolase/enoyl-CoA hydratase (trifunctional protein), beta subunit, mitochondrial	1.91 ± 1.26	0.004
Ssc.28417.1.S1_at	GCSH	Glycine cleavage system H protein, mitochondrial	1.59 ± 1.15	0.001
Ssc.20310.1.S1_at	GPT/ALT	Alanine aminotransferase	− 1.63 ± 1.36	0.008
Ssc.9637.1.S1_at	GLUL	Glutamine synthetase	2.27 ± 1.45	0.007
Ssc.2622.1.S1_at	PHGDH	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	1.57 ± 1.21	0.006
Ssc.12475.1.A1_at	PSPH	L-3-phosphoserine phosphatase	3.02 ± 2.57	0.027
<i>TCA cycle/ATP synthesis-coupled proton transport</i>				
Ssc.3518.1.S1_at	IDH1	Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	1.57 ± 1.27	0.019
Ssc.24988.1.S1_at	SDHA	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial	1.59 ± 1.17	0.008
Ssc.10785.1.A1_at	OGDH	Oxoglutarate dehydrogenase-like	− 1.60 ± 1.38	0.036
Ssc.6694.1.S1_at	CYCS	Cytochrome c	1.62 ± 1.06	0.002

Values represent mean ± SD for n = 4 gene chips per group.

^a According to unpaired Student's *t*-test (two-tailed distribution and two-sample equal variance).

markedly greater feed intake. In line with recent studies (Shields et al., 1985; Noblet et al., 1990; Trottier and Easter, 1995), the change in body weight of the sows during lactation indicated that sows are in a strong negative energy balance during lactation which cannot be fully compensated by an increased feed intake. This assumption could be confirmed by estimating the energy balance of the sows during the experimental period. This estimation revealed a daily energy deficit of 34.7 MJ ME per sow in the lactating group corresponding to a daily energy mobilization from body stores of approximately 1.4 kg body mass per sow. This estimated loss of body weight concurs well with the observed body mass loss of 30.3 kg in the lactating group during the experimental period. The catabolic state of the lactating sows was also evident from the elevated plasma NEFA concentrations a finding that is also in agreement with recent reports (Trottier and Easter, 1995; Pèrè and Etienne, 2007; Quesnel et al.,

2009; Ringseis et al., 2011). The elevation of plasma NEFA concentrations in lactating sows and other species during lactation is explained by an increased hydrolysis of TAG in adipose tissues and subsequent release of the fatty acids into the circulation due to the negative energy balance (Etienne et al., 1985; Vernon, 2005). The NEFA are then taken up from other tissues such as liver, skeletal muscle and mammary gland in order to serve as metabolic substrates. In contrast to NEFA, the concentration of the ketone body β -HBA in plasma was lower in lactating than in non-lactating sows in the present study. This is in contrast to findings in dairy cows which frequently develop ketosis soon after parturition (Bobe et al., 2004). Increased levels of ketone bodies in plasma of cows during early lactation are the consequence of the increased flow of NEFA into the liver and an elevated oxidation of NEFA to acetyl-CoA units which are preferentially used for ketogenesis due to the limited capacity of the TCA cycle. The

Table 7
Differentially regulated genes involved in immune response in the liver of sows during lactation.

Probe set ID	Symbol	Gene name	Fold change (lact. vs. non-lact.)	P-value ^a
<i>Focal adhesion molecules</i>				
Ssc.5580.1.S1_at	FN1	Fibronectin precursor (FN) (cold-insoluble globulin) (CIG)	-1.52 ± 1.25	0.013
Ssc.44.1.S1_at	ITGB3	Integrin beta-3 precursor (platelet membrane glycoprotein IIIa) (CD61 antigen)	-2.34 ± 1.30	0.002
Ssc.9255.1.A1_at	LAMC1	Laminin gamma-1 chain	-1.55 ± 1.38	0.022
Ssc.10710.1.A1_at	PARVG	Gamma-parvin	-1.61 ± 1.12	0.004
Ssc.2714.1.S1_a_at	FYN	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase FYN	-1.52 ± 1.09	0.001
Ssc.3038.1.S1_at	RAPGEF1	Rap guanine nucleotide exchange factor 1	-1.59 ± 1.08	0.001
Ssc.24337.1.S1_at	MAPK9	Mitogen-activated protein kinase 9	-1.62 ± 1.16	0.002
Ssc.10406.1.A1_at	THBS1	Thrombospondin 1	-1.57 ± 1.44	0.049
Ssc.349.1.S1_at	PRKCB1	Protein kinase C, beta	-1.66 ± 1.08	0.001
Ssc.21011.1.S1_at	COL1A2	Collagen alpha 2(I) chain	-1.53 ± 1.18	0.021
<i>Growth factors</i>				
Ssc.9392.2.S1_at	EGF	Pro-epidermal growth factor	4.46 ± 2.22	0.006
Ssc.16231.1.S1_a_at	IGF1	Insulin-like growth factor IA (somatomedin C)	1.85 ± 1.43	0.017
Ssc.20685.1.S1_at	BCL2	Apoptosis regulator Bcl-2	1.55 ± 1.37	0.033
<i>Acute phase proteins</i>				
Ssc.21145.1.S1_at	DEFB1	Beta-defensin 1 precursor	3.66 ± 3.36	0.028
Ssc.16157.1.S1_at	CRP	C-reactive protein	2.65 ± 2.22	0.016
Ssc.10460.2.S1_at	CFB	Complement factor B	1.74 ± 1.49	0.029
Ssc.15980.1.S1_at	LBP	Lipopolysaccharide-binding protein	2.78 ± 2.19	0.013
Ssc.11979.1.A1_at	PLAUR	Urokinase plasminogen activator surface receptor precursor	-1.58 ± 1.03	0.001
Ssc.11074.1.S1_at	CFD	Complement factor D (adipsin)	-1.50 ± 1.11	0.001
<i>Immunoregulatory molecules</i>				
Ssc.272.1.S1_a_at	CD55	CD55 molecule	-1.64 ± 1.11	0.003
Ssc.30759.1.A1_at	MS4A2	Membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 2 (Fc fragment of IgE)	-1.58 ± 1.17	0.001
Ssc.11684.1.A1_at	MYO1F	Myosin IF	-1.53 ± 1.06	0.001
Ssc.427.1.S1_at	TRAC	T cell receptor alpha constant	-1.68 ± 1.48	0.029
Ssc.26328.1.S1_at	CCR5	Chemokine receptor 5	-1.51 ± 1.10	0.010
Ssc.11063.1.S1_at	HLA-DQB2	Major histocompatibility complex, class II, DQ beta 2	-1.59 ± 1.12	0.001
Ssc.222.1.S1_at	HLA-DRA	Major histocompatibility complex, class II, DR alpha	-1.53 ± 1.11	0.001
Ssc.210.2.S1_a_at	HLA-DRB2	Major histocompatibility complex, class II, DR beta 2	-1.62 ± 1.20	0.001
Ssc.16169.1.S1_x_at	HLA-DRB4	Major histocompatibility complex, class II, DR beta 4	-3.93 ± 2.79	0.027
Ssc.23489.1.S1_at	CD8a	T-cell surface glycoprotein CD8 alpha	-1.52 ± 1.23	0.007

Values represent mean $\pm$ SD for $n = 4$ gene chips per group.

^a According to unpaired Student's *t*-test (two-tailed distribution and two-sample equal variance).

difference between sows and dairy cows with respect to β -HBA in plasma cannot be explained from this study. It is possible, however, that in sows ketone bodies are used as fuel by non-hepatic tissues more efficiently than in dairy cows. This however deserves further investigations.

4.2. Effect of lactation on intermediary metabolism as deduced from microarray data

A large set of genes encoding proteins involved in fatty acid catabolism, such as fatty acid activation, fatty acid β -oxidation, fatty acid hydroxylation, and the carnitine shuttle system was up-regulated in the liver of lactating sows, which indicates that fatty acid catabolism is stimulated in the liver of sows during lactation. Similar findings have been made in dairy cows during lactation (Loo et al., 2007; Van Dorland et al., 2009), whereas down-regulation of fatty acid catabolic genes during lactation has been observed in the liver of mice and rats

(Gutgesell et al., 2009a, 2009b). Our findings therefore suggest that the lactation-induced changes in fatty acid metabolism are similar between dairy cows and sows. In addition, microarray analysis revealed that genes involved in fatty acid desaturation, such as *FADS6*, and genes encoding enzymes responsible for catabolism of glycerophospholipid species including the biologically active lysophosphatidic acid (*PEMT*, *PPAP2A*) are also up-regulated in the liver of lactating sows, which suggests that also the synthesis of unsaturated fatty acids and the catabolism of glycerophospholipid species, respectively, in the liver are elevated during lactation. The observed up-regulation of fatty acid catabolic genes in the liver of lactating sows is probably mediated by the activation of hepatic PPAR α , a transcription factor that is known to be activated by NEFA (Kersten et al., 1999; Mandard et al., 2004). In fact, all of the abovementioned genes encoding proteins governing fatty acid activation, fatty acid β -oxidation, fatty acid hydroxylation, the carnitine shuttle system and *APOA4*, which was one of the most strongly up-regulated genes (microarray: 5.1-fold; qPCR: 16.4-fold) in the liver

of lactating sows, are known PPAR α target genes (Mandard et al., 2004). Further support for our assumption is provided from enrichment analysis using the KEGG pathway database in showing that PPAR signaling is one of the regulatory pathways significantly altered in the liver of lactating sows. In dairy cows, activation of hepatic PPAR α during lactation has been also reported (Loor et al., 2005) indicating that activation of this signaling pathway is common for both, lactating cows and lactating sows. Since PPAR α is a central regulator of fatty acid and glycerophospholipid metabolism it is not surprising that both, fatty acid metabolism and glycerophospholipid metabolism could be also identified as significantly altered regulatory pathways by the KEGG pathway-based enrichment analysis. The pig is generally considered a suitable model animal for human physiology because of many metabolic, physiologic and anatomical similarities (Miller and Ullrey, 1987; Luci et al., 2007; Spurlock and Gabler, 2008). However, with respect to lactation physiology, particularly milk yield, contents of nutrients (fat, protein, lactose) and energy in milk, and energy balance during lactation, there are great differences between pigs and humans. Therefore, it is hardly possible to transfer the findings from this study observed in lactating sows to nursing women.

Besides genes involved in lipid metabolism, several genes encoding proteins involved in glucose uptake, glycolysis and gluconeogenesis (*GLUT2/SLC2A2*, *GAPDH*, *GPI*, *PDHA*, *PDHB*, *PC*) were shown to be up-regulated in the liver of lactating sows indicating that glucose and/or pyruvate metabolism are influenced in the liver of sows during lactation. In line with this, pyruvate metabolism could be identified as a significantly enriched pathway in the liver of lactating sows. However, based on the rather small lactation-induced changes in the expression of those genes and the simultaneous elevation of both, glycolytic and gluconeogenic genes, it is difficult to draw firm conclusions with respect to the lactation-induced changes in glucose metabolism in the liver of lactating sows. Studies in dairy cows also provided conflicting results with respect to alterations in the expression of genes involved in glucose metabolism during lactation. Whereas Greenfield et al. (2000) showed an increased expression and enzymatic activity of the gluconeogenic gene *PC* in the liver of dairy cows one day after parturition, van Dorland et al. (2009) reported no effect on expression of *PC* but an increased expression of another gluconeogenic gene, phosphoenolpyruvate carboxykinase (*PEPCK*), in cow liver during lactation. In contrast, in another study a reduced expression of *PEPCK* was observed in the liver of ketotic early lactating cows (Loor et al., 2007). Although from a physiological perspective an increased gluconeogenesis in the liver during lactation would be expected in order to provide glucose for lactose production in the mammary gland, further studies are required to clarify whether or not gluconeogenesis is stimulated in the liver of lactating sows.

With respect to intermediary metabolism, changes were also observed in the expression of genes playing a role in amino acid metabolism, and most of these genes were up-regulated in the liver of lactating sows. With one exception (*GLUL*), all of these genes encode enzymes involved in the synthesis of serine indicating that serine metabolism is stimulated in the liver of sows during lactation. Not only the stimulation of the metabolism of serine but also that of glycine and threonine in the liver of lactating sows was evident from both, gene term and pathway enrichment analysis as well as cluster analysis. In view of the abovementioned discussion on lactation-induced changes in the expression of gluconeogenic genes, it is worth mentioning that serine, threonine and glycine are catabolized to pyruvate wherefore these amino acids are classified as gluconeogenic amino acids. It is therefore possible that gluconeogenesis is indeed stimulated in the liver of lactating sows through increasing the availability of gluconeogenic substrates. By contrast, *GPT* which catalyzes the metabolism of alanine to pyruvate was down-regulated in the liver of lactating sows suggesting that provision of pyruvate for gluconeogenesis, at least from alanine, is reduced during lactation. Albeit speculative, this might be a means of the lactating sow to save alanine in order to provide it to the mammary gland for milk synthesis. In fact, it has long been shown

that amino acid uptake by the mammary gland is increased in sows during lactation (Spincer et al., 1969).

A further pathway identified to be significantly influenced in the liver of lactating sows was the TCA cycle. Indeed, several genes encoding enzymes of the TCA cycle, such as *IDH1* and *SDHA*, were up-regulated suggesting an enhanced flow of metabolites through the TCA cycle and an increased formation of reduction equivalents (NADH/H⁺, FADH₂), which are subsequently used in the respiratory chain for ATP production, in the liver of sows during lactation. In fact, this assumption is supported by the observation that the expression of *CYCS*, which is responsible for ATP synthesis in the respiratory chain, was also elevated in lactating sows and that electron carrier activity, oxidoreductase activity, coenzyme binding, cofactor binding and FAD binding were significantly overrepresented molecular functions associated with the differentially expressed genes. The latter is also in agreement with the abovementioned up-regulation of several other genes encoding FAD or NADH-dependent enzymes with oxidoreductase activity of fatty acid or amino acid catabolic pathways. As described previously there was a decrease in plasma β -HBA in lactating sows. As ketone bodies can serve as substrates for the TCA cycle and consequently of the respiratory chain, the increased metabolism of β -HBA through the TCA cycle may be an explanation for their reduction in plasma of sows during lactation.

4.3. Effect of lactation on inflammation and immune response as deduced from microarray data

The whole liver tissue used in this study contains both, hepatocytes and the resident macrophages, called Kupffer cells or stellate cells, and it is well known that both types of cells are involved in mediating inflammatory and immune responses of the liver in response to inflammatory cytokines and changes in the extracellular environment. Our data show that several positive acute phase proteins, such as *CRP*, *CFB*, *DEFB1*, and *LBP*, were up-regulated in the liver of lactating sows. Positive acute phase proteins, which aim at recognizing, destroying or inhibiting growth of pathogens (Reid and Porter, 1981; Schumann et al., 1990; Zhang et al., 1995; Ulevitch and Tobias, 1999), are synthesized and secreted from hepatocytes in response to inflammatory stimuli and are therefore useful markers of inflammation in both human and veterinary clinical pathologies. A common feature of the abovementioned acute phase proteins is that the encoding genes are regulated by the key regulator of inflammation nuclear factor κ B (NF- κ B) (Reid and Porter, 1981; Nonaka and Huang, 1990; Schumann et al., 1990; Schumann, 1995; Zhang et al., 1995; Ulevitch and Tobias, 1999; Agrawal et al., 2003a, 2003b). Signs for the induction of a proinflammatory state in the liver have been also observed in dairy cows as evidenced from up-regulation of *IL-6*, a cytokine which orchestrates leukocyte recruitment and activation (Rose-John et al., 2007). Thus, our findings in sows indicate that lactation induces an inflammatory response and an adaptation of the immune system to cope with the inflammatory state in the liver. In line with this view, we identified immune effector processes, humoral immune response, leukocyte mediated immunity and lymphocyte mediated immunity as significantly overrepresented biological processes within the differentially expressed genes. A further interesting finding in this study was that a large set of focal adhesion molecules were down-regulated in the liver of lactating sows. Focal adhesions are large protein complexes that contain both structural and signaling components required for the linking of intracellular cytoskeleton components to the extracellular matrix of the surrounding tissue and tend to inhibit cell migration (Yamada and Miyamoto, 1995; Critchley, 2000). In response to liver injury or inflammation, focal adhesions have to be disassembled in order to allow the hepatic stellate cells to migrate to the injured areas for tissue regeneration and wound repair (Melton et al., 2007). The observed down-regulation of focal adhesion molecules, therefore, possibly indicates that hepatic stellate cell chemotaxis, tissue repair and regeneration and blood vessel development are stimulated in the liver of sows during lactation.

Supportive for this assumption is the identification of focal adhesion, response to wound healing, glycosaminoglycan binding, polysaccharide binding, heparin binding and blood vessel development as significantly overrepresented pathways and gene ontology terms, respectively. The latter gene ontology terms were also represented in two different clusters of functionally related annotation terms as evident from clustering analysis. Three genes allocated to focal adhesion which were up-regulated were the growth factors *EGF* and *IGF1* and the anti-apoptotic regulator and NF- κ B target gene *BCL2*. The up-regulation of *BCL2* together with the observation that two clusters of related annotation terms were dealing with regulation of apoptosis suggests that apoptosis is one biological process that is influenced during lactation. *EGF* and *IGF1* are known to promote blood vessel formation, cell proliferation and wound healing, which strengthens our abovementioned assumption. Up-regulation of *IGF1* is in agreement with recent reports demonstrating elevated blood levels of *IGF1* in lactating sows (Govoni et al., 2007; Quesnel et al., 2009), and additionally suggests that at least some of the alterations observed at the transcript level can also be seen at the protein level. Our study moreover shows that the expression of several immunoregulatory molecules was altered in the liver of sows during lactation, and clustering analysis indeed revealed one cluster dealing with immune processes such as leukocyte mediated immunity, leukocyte mediated cytotoxicity and cell killing. Although it is known that the proteins encoded by these genes have functions in the humoral immune response and specific immunity, the biological relevance is hard to predict, particularly because the fold change of most of these genes was rather small. In any case, these alterations in the expression of immunoregulatory genes show that the lactation state is accompanied by an adaptation of the immune system in the liver of sows.

There is evidence from the literature that anesthetic and/or analgesic agents which were required to take liver biopsy samples can cause neurohormonal and metabolic effects. In particular, hyperglycaemic effects, which in part reflect α_2 -adrenoreceptor-dependent changes of glucoregulatory hormones such as insulin, corticosterone, growth hormone and adrenocorticotrophic hormone, were reported to be induced by several anesthetics (Ambrisko et al., 2005; Saha et al., 2005; Zuurbier et al., 2008). In addition, certain anesthetics were shown to induce the secretion of other hormones, e.g. prolactin (Brand et al., 2001), and cardiovascular effects, like hypotension and bradycardia (Mersmann, 1989). Moreover, recent studies revealed an influence of general anesthesia on the immune response as evidenced from enhanced release of interferon- γ and soluble interleukin-2 receptor from stimulated blood cultures after induction of anesthesia (Brand et al., 2001). Although we cannot exclude that such effects induced by anesthetics may have interfered with the effects caused by lactation, we are confident that the microarray data were not strongly biased by the general anesthesia because the anesthetics were administered in both groups of sows.

5. Conclusion

This is the first study exploring genome-wide alterations in gene expression in the liver of sows during lactation. We show that lactation in sows leads to striking changes in the expression of genes involved in both, intermediary metabolism and immune response. Due to the strong negative energy balance observed in sows during lactation it is not unexpected that genes involved in fatty acid catabolism, such as fatty acid activation, fatty acid β -oxidation, fatty acid hydroxylation, and the carnitine shuttle system, were markedly up-regulated in the liver. In line with this, genes involved in the TCA cycle and ATP synthesis in the respiratory chain were up-regulated indicating that energy-generating pathways are stimulated in the liver of lactating sows. Moreover, microarray analysis revealed that genes involved in the metabolism of gluconeogenic amino acids, such as serine, threonine and glycine, into pyruvate were up-regulated in the liver of lactating sows, which suggests that gluconeogenesis is stimulated in the liver of

lactating sows through increasing the availability of gluconeogenic substrates. The alterations of expression of genes encoding proteins involved in immune response suggest that lactation in sows may cause an adaptive immune response which possibly counteracts hepatic inflammation.

Acknowledgments

This study was supported by the German Research Foundation (Deutsche Forschungsgemeinschaft; Grant no. ED 70/9-1).

References

- Agrawal, A., Cha-Molstad, H., Samols, D., Kushner, I., 2003a. Overexpressed nuclear factor- κ B can participate in endogenous C-reactive protein induction, and enhances the effects of C/EBP β and signal transducer and activator of transcription-3. *Immunology* 108, 539–547.
- Agrawal, A., Samols, D., Kushner, I., 2003b. Transcription factor c-Rel enhances C-reactive protein expression by facilitating the binding of C/EBP β to the promoter. *Mol. Immunol.* 40, 373–380.
- Aiello, R.J., Kenna, T.M., Herbein, J.H., 1984. Hepatic gluconeogenic and ketogenic interrelationships in the lactating cow. *J. Dairy Sci.* 67, 1707–1715.
- Ambrisko, T.D., Hikasa, Y., Sato, K., 2005. Influence of medetomidine on stress-related neurohormonal and metabolic effects caused by butorphanol, fentanyl, and ketamine administration in dogs. *Am. J. Vet. Res.* 66, 406–412.
- Ashburner, M., Ball, C.A., Blake, J.A., Botstein, D., Butler, H., et al., 2000. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat. Genet.* 25, 25–29.
- Athipozhy, A., Huang, L., Wooton-Kee, C.R., Zhao, T., Jungsuwadee, P., et al., 2011. Differential gene expression in liver and small intestine from lactating rats compared to age-matched virgin controls detects increased mRNA of cholesterol biosynthetic genes. *BMC Genomics* 12, 95.
- Bionaz, M., Loo, J.J., 2011. Gene networks driving bovine mammary protein synthesis during the lactation cycle. *Bioinf. Biol. Insights* 5, 83–98.
- Bobe, G., Young, J.W., Beitz, D.C., 2004. Invited review: pathology, etiology, prevention, and treatment of fatty liver in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 87, 3105–3124.
- Brand, J.M., Schmucker, P., Breidhardt, T., Kirchner, H., 2001. Upregulation of IFN- γ and soluble interleukin-2 receptor release and altered serum cortisol and prolactin concentration during general anesthesia. *J. Interferon Cytokine Res.* 21, 793–796.
- Collier, R.J., McNamara, J.P., Wallace, C.R., Dehoff, M.H., 1984. A review of endocrine regulation of metabolism during lactation. *J. Anim. Sci.* 59, 498–510.
- Critchley, D.R., 2000. Focal adhesions – the cytoskeletal connection. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12, 133–139.
- Dewey, K.G., 1997. Energy and protein requirements during lactation. *Annu. Rev. Nutr.* 17, 19–36.
- Edgar, R., Domrachev, M., Lash, A.E., 2002. Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Res.* 30, 207–210.
- Etienne, M., Noblet, J., Desmoulin, B., 1985. Mobilization of body stores in the lactating primiparous sow. *Reprod. Nutr. Dev.* 25, 341–343.
- Etienne, M., Dourmad, J.Y., Noblet, J., 1998. The influence of some sow and piglet characteristics and of environmental conditions on milk production. In: Verstegen, M.W.A., Moughan, P.J., Schrama, J.W. (Eds.), *The Lactating Sow*. Wageningen, Wageningen Pers, pp. 285–299.
- Govoni, N., Parmeggiani, A., Galeati, G., Penazzi, P., De lasio, R., et al., 2007. Acyl ghrelin and metabolic hormones in pregnant and lactating sows. *Reprod. Domest. Anim.* 42, 39–43.
- Greenfield, R.B., Cecava, M.J., Donkin, S.S., 2000. Changes in mRNA expression for gluconeogenic enzymes in liver of dairy cattle during the transition to lactation. *J. Dairy Sci.* 83, 1228–1236.
- Grün, D., Reiner, G., Dzapov, V., 1993a. Untersuchungen über Rassenunterschiede in der Milchleistung beim Schwein. I. Mitteilung: Methodik des maschinellen Milchentzuges und Milchmengenleistung. *Reprod. Dom. Anim.* 28, 14–21.
- Grün, D., Reiner, G., Dzapov, V., 1993b. Untersuchungen über Rassenunterschiede in der Milchleistung beim Schwein. II. Mitteilung: Milchinhaltsstoffe und ihr Einfluss auf die Entwicklung der Ferkel in der Säugephase. *Reprod. Dom. Anim.* 28, 22–27.
- Gutgesell, A., Ringseis, R., Brandsch, C., Stangl, G.J., Hirche, F., Eder, K., 2009a. Peroxisome proliferator-activated receptor α and enzymes of carnitine biosynthesis in the liver are down-regulated during lactation in rats. *Metabolism* 58, 226–232.
- Gutgesell, A., Ringseis, R., Schmidt, E., Brandsch, C., Stangl, G.J., Eder, K., 2009b. Downregulation of peroxisome proliferator-activated receptor α and its coactivators in liver and skeletal muscle mediates the metabolic adaptations during lactation in mice. *J. Mol. Endocrinol.* 43, 241–250.
- Huang da, W., Sherman, B.T., Lempicki, R.A., 2009. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat. Protoc.* 4, 44–57.
- Irizarry, R.A., Hobbs, B., Collin, F., Beazer-Barclay, Y.D., Antonellis, K.J., et al., 2003. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* 4, 249–264.
- Keller, J., Ringseis, R., Koc, A., Lukas, I., Kluge, H., Eder, K., 2012. Supplementation with L-carnitine downregulates genes of the ubiquitin proteasome system in the skeletal muscle and liver of piglets. *Animal* 6, 70–78.

- Kersten, S., Seydoux, J., Peters, J.M., Gonzalez, F.J., Desvergne, B., Wahli, W., 1999. Peroxisome proliferator-activated receptor α mediates the adaptive response to fasting. *J. Clin. Invest.* 103, 1489–1498.
- Laspiur, J.P., Burton, J.L., Weber, P.S., Moore, J., Kirkwood, R.N., Trottier, N.L., 2009. Dietary protein intake and stage of lactation differentially modulate amino acid transporter mRNA abundance in porcine mammary tissue. *J. Nutr.* 139, 1677–1684.
- Loor, J.J., Dann, H.M., Everts, R.E., Oliveira, R., Green, C.A., et al., 2005. Temporal gene expression profiling of liver from periparturient dairy cows reveals complex adaptive mechanisms in hepatic function. *Physiol. Genomics* 23, 217–226.
- Loor, J.J., Dann, H.M., Guretzky, N.A., Everts, R.E., Oliveira, R., et al., 2006. Plane of nutrition prepartum alters hepatic gene expression and function in dairy cows as assessed by longitudinal transcript and metabolic profiling. *Physiol. Genomics* 27, 29–41.
- Loor, J.J., Everts, R.E., Bionaz, M., Dann, H.M., Morin, D.E., et al., 2007. Nutrition-induced ketosis alters metabolic and signaling gene networks in liver of periparturient dairy cows. *Physiol. Genomics* 32, 105–116.
- Luci, S., Giemsa, B., Kluge, H., Eder, K., 2007. Clofibrate causes an upregulation of PPAR α target genes but does not alter expression of SREBP target genes in liver and adipose tissue of pigs. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 293, R70–R77.
- Mandard, S., Müller, M., Kersten, S., 2004. Peroxisome proliferator-activated receptor α target genes. *Cell. Mol. Life Sci.* 61, 393–416.
- Melton, A.C., Soon Jr., R.K., Park, J.G., Martinez, L., Dehart, G.W., Yee Jr., H.F., 2007. Focal adhesion disassembly is an essential early event in hepatic stellate cell chemotaxis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 293, 1272–1280.
- Mersmann, H.J., 1989. Influence of infused beta-adrenergic agonists on porcine blood metabolites and catecholamines. *J. Anim. Sci.* 67, 2633–2645.
- Miller, E.R., Ullrey, D.E., 1987. The pig as a model for human nutrition. *Annu. Rev. Nutr.* 7, 361–382.
- National Research Council, 1998. Nutrient Requirement of Swine, 10th rev ed. National Academy Press, Washington.
- Noblet, J., Etienne, M., 1989. Estimation of sow milk nutrient output. *J. Anim. Sci.* 67, 3352–3359.
- Noblet, J., Dourmad, J.Y., Etienne, M., 1990. Energy utilization in pregnant and lactating sows: modeling of energy requirements. *J. Anim. Sci.* 68, 562–572.
- Nonaka, M., Huang, Z.M., 1990. Interleukin-1-mediated enhancement of mouse factor B gene expression via NF κ B-like hepatoma nuclear factor. *Mol. Cell. Biol.* 10, 6283–6289.
- Pedraza, N., Solanes, G., Iglesias, R., Vázquez, M., Giral, M., Villarroja, F., 2001. Differential regulation of expression of genes encoding uncoupling proteins 2 and 3 in brown adipose tissue during lactation in mice. *Biochem. J.* 355, 105–111.
- Père, M.C., Etienne, M., 2007. Insulin sensitivity during pregnancy, lactation, and postweaning in primiparous gilts. *J. Anim. Sci.* 85, 101–110.
- Quesnel, H., Prunier, A., 1995. Endocrine bases of lactational anoestrus in the sow. *Reprod. Nutr. Dev.* 35, 395–414.
- Quesnel, H., Meunier-Salaün, M.C., Hamard, A., Guillemet, R., Etienne, M., Farmer, C., Dourmad, J.Y., Père, M.C., 2009. Dietary fiber for pregnant sows: influence on sow physiology and performance during lactation. *J. Anim. Sci.* 87, 532–543.
- Reid, K.B., Porter, R.R., 1981. The proteolytic activation systems of complement. *Annu. Rev. Biochem.* 50, 433–464.
- Ringseis, R., Heller, K., Kluge, H., Eder, K., 2011. mRNA expression of genes involved in fatty acid utilization in skeletal muscle and white adipose tissues of sows during lactation. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 158, 450–454.
- Rose-John, S., Waetzig, G.H., Scheller, J., Grötzinger, J., Seeger, D., 2007. The IL-6/sIL-6R complex as a novel target for therapeutic approaches. *Expert Opin. Ther. Targets* 11, 613–624.
- Saha, J.K., Xia, J., Grondin, J.M., Engle, S.K., Jakubowski, J.A., 2005. Acute hyperglycemia induced by ketamine/xylazine anesthesia in rats: mechanisms and implications for preclinical models. *Exp. Biol. Med.* (Maywood) 230, 777–784.
- Schumann, R.R., 1995. Mechanisms of transcriptional activation of lipopolysaccharide binding protein (LBP). *Prog. Clin. Biol. Res.* 392, 297–304.
- Schumann, R.R., Leong, S.R., Flaggs, G.W., Gray, P.W., Wright, S.D., Mathison, J.C., et al., 1990. Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science* 249, 1429–1431.
- Shields Jr., R.G., Mahan, D.C., Maxson, P.F., 1985. Effect of dietary gestation and lactation protein levels on reproductive performance and body composition of first-litter female swine. *J. Anim. Sci.* 60, 179–189.
- Smith, M.S., Grove, K.L., 2002. Integration of the regulation of reproductive function and energy balance: lactation as a model. *Front. Neuroendocrinol.* 23, 225–256.
- Spencer, J., Rook, J.A., Towers, K.G., 1969. The uptake of plasma constituents by the mammary gland of the sow. *Biochem. J.* 111, 727–732.
- Spurlock, M.E., Gabler, N.K., 2008. The development of porcine models of obesity and the metabolic syndrome. *J. Nutr.* 138, 397–402.
- Theil, P.K., Labouriau, R., Sejrsen, K., Thomsen, B., Sørensen, M.T., 2005. Expression of genes involved in regulation of cell turnover during milk stasis and lactation rescue in sow mammary glands. *J. Anim. Sci.* 83, 2349–2356.
- Trayhurn, P., Douglas, J.B., McCuckin, M.M., 1982. Brown adipose tissue thermogenesis is 'suppressed' during lactation in mice. *Nature* 298, 59–60.
- Trottier, N.L., Easter, R.A., 1995. Dietary and plasma branched-chain amino acids in relation to tryptophan: effect on voluntary feed intake and lactation metabolism in the primiparous sow. *J. Anim. Sci.* 73, 1086–1092.
- Tsai, S., Cassady, J.P., Freking, B.A., Nonneman, D.J., Rohrer, G.A., Piedrahita, J.A., 2006. Annotation of the Affymetrix porcine genome microarray. *Anim. Genet.* 37, 423–424.
- Ulevitch, R.J., Tobias, P.S., 1999. Recognition of gram-negative bacteria and endotoxin by the innate immune system. *Curr. Opin. Immunol.* 11, 19–22.
- van Dorland, H.A., Richter, S., Morel, I., Doherr, M.G., Castro, N., Bruckmaier, R.M., 2009. Variation in hepatic regulation of metabolism during the dry period and in early lactation in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 92, 1924–1940.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., et al., 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3 (RESEARCH0034).
- Vernon, R.G., 2005. Lipid metabolism during lactation: a review of adipose tissue–liver interactions and the development of fatty liver. *J. Dairy Res.* 72, 460–469.
- Washburn, K.E., Powell, J.G., Maxwell, C.V., Kegley, E.B., Johnson, Z., Fakler, T.M., 2005. A successful method of obtaining percutaneous liver biopsy samples of sufficient quantity for trace mineral analysis in adult swine without the aid of ultrasound. *J. Swine Health Prod.* 13, 126–130.
- Whittemore, C.T., 1996. Nutrition reproduction interactions in primiparous sows. *Livest. Prod. Sci.* 46, 65–83.
- Williamson, D.H., 1986. Regulation of metabolism during lactation in the rat. *Reprod. Nutr. Dev.* 26, 597–603.
- Yamada, K.M., Miyamoto, S., 1995. Integrin transmembrane signaling and cytoskeletal control. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7, 681–689.
- Zhang, D., Jiang, S.L., Rzewnicki, D., Samols, D., Kushner, I., 1995. The effect of interleukin-1 on C-reactive protein expression in Hep3B cells is exerted at the transcriptional level. *Biochem. J.* 310, 143–148.
- Zuurbier, C.J., Keijzers, P.J., Koeman, A., Van Wezel, H.B., Hollmann, M.W., 2008. Anesthesia's effects on plasma glucose and insulin and cardiac hexokinase at similar hemodynamics and without major surgical stress in fed rats. *Anesth. Analg.* 106, 135–142.

BRIEF COMMUNICATION

Open Access

Genes involved in carnitine synthesis and carnitine uptake are up-regulated in the liver of sows during lactation

Susann Rosenbaum^{1†}, Robert Ringseis^{1*†}, Erika Most¹, Sonja Hillen², Sabrina Becker², Georg Erhardt³, Gerald Reiner² and Klaus Eder¹

Abstract

Background: Convincing evidence exist that carnitine synthesis and uptake of carnitine into cells is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α), a transcription factor which is physiologically activated during fasting or energy deprivation. Sows are typically in a negative energy balance during peak lactation. We investigated the hypothesis that genes involved in carnitine synthesis and uptake in the liver of sows are up-regulated during peak lactation.

Findings: Transcript levels of several PPAR α target genes involved in fatty acid uptake (FABP4, SLC25A20), fatty acid oxidation (ACOX1, CYP4A24) and ketogenesis (HMGCS2, FGF21) were elevated in the liver of lactating compared to non-lactating sows ($P < 0.05$). In addition, transcript levels of genes involved in carnitine synthesis (ALDH9A1, TMLHE, BBOX1) and carnitine uptake (SLC22A5) in the liver were greater in lactating than in non-lactating sows ($P < 0.05$). Carnitine concentrations in liver and plasma were about 20% and 50%, respectively, lower in lactating than in non-lactating sows ($P < 0.05$), which is likely due to an increased loss of carnitine via the milk.

Conclusions: The results of the present study show that PPAR α is activated in the liver of sows during lactation which leads to an up-regulation of genes involved in carnitine synthesis and carnitine uptake. The PPAR α mediated up-regulation of genes involved in carnitine synthesis and uptake in the liver of lactating sows may be regarded as an adaptive mechanism to maintain hepatic carnitine levels at a level sufficient to transport excessive amounts of fatty acids into the mitochondrion.

Keywords: Lactation, Sow, Liver, PPAR α pathway, Carnitine

Findings

Lactation is associated with a dramatic increase in the energy and nutrient requirement of the organism for milk production which is usually met by an elevation of food intake, a mobilisation of body's energy stores, and several metabolic adaptations [1,2]. In order to improve the knowledge about metabolic adaptations during lactation in sows we have recently analyzed the changes in the hepatic transcriptome of sows during lactation using a porcine whole-genome microarray [3]. Interestingly, enrichment analysis using the Kyoto Encyclopedia of

Genes and Genomes (KEGG) database revealed that peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) signalling is one of the regulatory pathways which is activated in the liver of sows during lactation [3]. PPAR α is a ligand-activated transcription factor which induces of a large set of genes encoding proteins involved in fatty acid catabolism, such as fatty acid activation, fatty acid β -oxidation, fatty acid hydroxylation, ketogenesis and gluconeogenesis [4,5]. This transcription factor is known to be activated by non-esterified fatty acids (NEFA) [4,5], which are released from adipose tissue during early lactation due to the strong increase in the sow's energy requirement for milk production which cannot be completely covered by an increase of feed intake [3]. Genes involved in fatty acid catabolism are up-regulated

* Correspondence: robert.ringseis@ernaehrung.uni-giessen.de

[†]Equal contributors

¹Institute of Animal Nutrition and Nutritional Physiology, Justus-Liebig-University, Heinrich-Buff-Ring 26-32, Giessen 35392, Germany
Full list of author information is available at the end of the article

by PPAR α because the regulatory regions of these genes contain specific DNA sequences, called peroxisome proliferator response elements (PPRE), which are bound by the activated PPAR α complex and mediate transcription of these genes [4,5]. Studies in mice, rats and pigs indicated that PPAR α is not only a critical regulator of fatty acid catabolic genes but also a key regulator of genes involved in carnitine synthesis and uptake [6]. In pigs, carnitine biosynthesis occurs exclusively in liver and kidney, with liver being quantitatively most important [7]. Convincing evidence for the regulation of genes involved in carnitine synthesis and uptake by PPAR α has been provided from genetic studies in which functional PPRE have been identified in the regulatory regions of the mouse genes encoding the carnitine transporter novel organic cation transporter 2 (OCTN2/SLC22A5) and two enzymes of the carnitine biosynthetic pathway, γ -butyrobetaine dioxygenase (BBOX1) and 4-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase (ALDH9A1) [8–10]. Like in lactating sows, activation of hepatic PPAR α and up-regulation of fatty acid catabolic genes in the liver has been reported in early lactating cows [11–13]. In addition, induction of genes involved in carnitine synthesis and uptake (SLC22A5, BBOX1, ALDH9A1) in the liver and a marked increase in the hepatic carnitine concentration has been observed in cows during lactation [14]. The increase in the hepatic concentration of carnitine in the early lactating cow has been interpreted as a means to supply the liver with sufficient carnitine required for transport of excessive amounts of fatty acids into the mitochondrion. Regarding that PPAR α is activated and genes involved in fatty acid catabolism are up-regulated also in the liver of sows during lactation, we tested the hypothesis that genes involved in carnitine synthesis and uptake are up-regulated in the liver of sows during peak lactation.

The animal study was conducted in accordance with established guidelines for the care and handling of laboratory animals and was approved by the local Animal Welfare Authorities (Regierungspräsidium Giessen; permission no: GI 19/3-No. 29/2010). The experiment included twenty second parity sows (Large White & German Landrace), which were artificially inseminated with semen from boars of the own breed, and kept in single crates until day 21 of pregnancy. From day 21 to 110 of pregnancy the sows were kept in groups in pens that had fully slatted floors, nipple drinkers and feeding stations, and from day 110 of pregnancy until farrowing the sows were housed in single farrowing pens. During pregnancy, all sows received a commercial diet for gestating sows ad libitum. 24 h after farrowing, the sows were randomly assigned into two groups of 10 animals each. In the first group of sows designated as “non-lactating group” (average body weight: 259 ± 17 kg), all piglets were removed from the sow 24 h after farrowing.

In the second group of sows designated as “lactating group” (average body weight: 256 ± 17 kg), litters were standardised to 12 piglets per sow. To ensure an adequate temperature of 35°C for the piglets an infrared heater was placed directly above the site of the newborn piglets. The temperature and the relative humidity in the dry sow accommodation and the farrowing unit were kept at $19 \pm 1^\circ\text{C}$ and 60–80%, respectively, by means of an air conditioning system. In addition, a light:dark cycle of 12-h light and 12-h dark was applied. During lactation until the end of the experiment the sows were given a diet for lactating sows. Until day 6 of lactation, the amount of feed given to the lactating sows was successively increased (1.6 kg/d on day 1; 2.6 kg/d on day 2; 4.1 kg/d on day 3; 5 kg/d on day 4; 5.5 kg/d on day 5 and 6.0 kg/d on day 6), and from day 7 of lactation and thereafter the sows received individual amounts of feed depending on their body weights. In the non-lactating group, each sow was given an amount of food sufficient to cover the individual energy and nutrient requirement for maintenance.

The diet for gestating sows consisted of (in g/kg diet): wheat (160), barley (705), soy bean meal with 43% crude protein (80), soy oil (5) and a mineral supplement (50) (Sano Fasersan Trag[®], Sano-Moderne Tierernährung GmbH, Loiching, Germany) and had a metabolizable energy of 12.2 MJ per kg diet. The diet for lactating sows consisted of (in g/kg diet): wheat (440), barley (350), soy bean meal with 43% crude protein (160), soy oil (15) and a mineral supplement (35) (Sauengold Lac[®], Sano-Moderne Tierernährung GmbH, Loiching, Germany) and had a metabolizable energy of 13.1 MJ per kg diet. Both types of diets (gestation and lactation) were not supplemented with carnitine. The native carnitine concentration of the diets was very low (< 5 mg/kg diet) as determined by tandem mass spectrometry (see below).

On day 20 after farrowing, blood was collected from *V. jugularis* 3 h after feed intake in heparinised polyethylene tubes (Sarstedt, Nürnberg, Germany) and plasma was obtained by centrifugation and stored at -20°C . Liver samples were taken by biopsy which took place in a cleaned and disinfected room in the animal keeping facility. Anesthetization of the sows was carried out as described recently in detail [3]. The liver biopsy samples were taken percutaneously in the left lateral cubency with a 16 G/1.65 mm biopsy needle (length: 160 mm) on a HistoCore[®] system (BIP Biomed. Instrumente & Produkte GmbH, Germany) as described elsewhere [15]. Liver samples were immediately snap-frozen and stored at -80°C until analysis. Total RNA from frozen liver samples was isolated using TrizolTM reagent (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) according to the manufacturer's protocol and purified using the RNeasy Minikit (Qiagen, Hilden, Germany). cDNA synthesis and quantitative real-time PCR (qPCR) analysis

were performed as described recently in detail [16]. Characteristics of primers and primer performance data used for qPCR analysis are shown in Table 1. Concentrations of free carnitine and acetylcarnitine in plasma, liver and diets were determined by tandem mass spectrometry according to Hirche et al. [17]. Statistical analysis was performed by one way analysis of variance. Fisher's multiple range test was used to generate significant F-values of differences with $P < 0.05$.

Like in dairy cows, the transition from pregnancy to lactation in sows is associated with severe metabolic

adaptations. The production of milk causes a strong increase of the sow's energy requirement which however cannot be completely covered by an increase of feed intake. Indeed, the sows of the lactating group exhibited a greater loss of body weight from day 1 to day 20 of lactation than sows of the non-lactating group, despite showing a markedly greater feed intake [3]. In line with this, we found that the sows of the lactating group are in a strong negative energy balance during this period [3]. To compensate the negative energy balance NEFA are typically mobilized from adipose tissue which was

Table 1 Characteristics of primers and primer performance data used for qPCR

Gene symbol	Forward primer (from 5' to 3') Reverse primer (from 5' to 3')	Product size (bp)	NCBI GenBank	Slope	R ² #	Efficiency*	M
<i>Reference genes</i>							
RSP9	GTCGCAAGACTTATGTGACC AGCTTAAAGACCTGGGTCT	325	XM_003356050	-0.28	0.999	1.91	0.053
ATP5G1	CAGTCACCTTGAGCCGGGCGA TAGCGCCCGGTGGTTTGC	94	NM_001025218	-0.30	0.998	1.99	0.054
GSR	AGCGCGATGCTACGTGAGC GGTACGCCGCTGTGGCAAT	175	AY368271	-0.29	0.997	1.94	0.055
ACTB	GACATCCGCAAGGACCTCTA ACATCTGCTGGAAGGTGGAC	205	XM_003124280	-0.32	0.992	2.10	0.064
SHAS2	GAAAAGGCTAACCTACCTG TGTTGGACAAGACCAGTTGG	218	NM_214053	-0.21	0.996	1.65	0.076
<i>Target genes</i>							
ACOX1	CTCGCAGACCCAGATGAAAT TCCAAGCCTCGAAGATGAGT	218	AF185048	-0.28	0.995	1.90	
ALDH9A1	GCTGCTGGCCGAAATCTATA CACACTTCCAGTGAAGGAGA	215	XM_001924860	-0.29	0.999	1.94	
BBOX1	GTGCCGAAAGCTCAAGGAAAAA CTCTGCCGCGGTGAAGTAAC	342	XM_003122909	-0.31	0.985	2.06	
CYP4A24	GGTTTGCTCCTGTTGAATGG GCATCACTTGGACAGACTTG	121	NM_214424	-0.29	0.999	1.96	
FABP4	CACCAGGAAGGTGGCTGGCA CCTGTACCAGGGCGCCTCCA	197	NM_001002817	-0.30	0.999	1.98	
FGF21	GAAGCCAGGGGTCATTCAAA GGTAAACGTTGTAGCCATCC	149	NM_001163410	-0.31	0.999	2.03	
HMGCS2	GGACCAAACAGACCTGGAGA ATGGTCTCAGTGCCCACTTC	198	NM_214380	-0.32	0.994	2.07	
SLC22A5	TGACCATATCAGTGGGCTA AGTAGGGAGACAGGATGCT	384	XM_003123912	-0.30	0.995	2.00	
SLC25A20	GCAAAGCCCATAGCCCTCT GAGCACATCTCTGGGTGT	312	XM_003483178	-0.28	0.998	1.89	
TMLHE	GCACCATACGCCTCAAGT TGGTCTCATCCAGACGAACA	221	XM_003135511	-0.35	0.995	1.79	

#Coefficient of determination of the standard curve. *The efficiency is determined by $[10^{-\text{slope}}]$.

demonstrated in the present study by elevated plasma levels of NEFA in the lactating compared to the non-lactating sows [3]. NEFA are then transported via the circulation to the tissues, mainly the liver, from which they are taken up and where they bind to and activate PPAR α [18]. In agreement with this, we observed in the present study that the negative energy balance in sows of the lactating group was associated with strongly elevated (2 to 10-fold) transcript levels of several PPAR α target genes involved in fatty acid uptake (FABP4, SLC25A20), fatty acid oxidation (ACOX1, CYP4A24) and ketogenesis (HMGCS2, FGF21) ($P < 0.05$, Table 2). Given that the above mentioned genes contain functional PPRE motifs in their regulatory regions [5], the up-regulation of these genes during lactation indicates, at least indirectly, that the PPAR α pathway is indeed activated in the liver of lactating sows. Due to the limited amount of liver tissue obtained from the biopsy sampling procedure additional assays, such as EMSA, providing direct evidence for activation of PPAR α could not be conducted. Due to the same reason protein levels of the PPAR α target genes were not determined. However, several studies clearly showed that increased mRNA levels of PPAR α target genes positively correlate with elevated levels of the encoded proteins [19], and are therefore suitable indicators of PPAR α activation.

In accordance with the hypothesis of this study, we found for the first time that lactation causes an up-regulation of genes involved in carnitine synthesis (ALDH9A1, TMLHE, BBOX1) and carnitine uptake (SLC22A5) in the liver of sows ($P < 0.05$, Table 3). Considering that at least the mouse genes encoding ALDH9A1, BBOX1 and SLC22A5 were shown to be direct PPAR α target genes [8-10], it is very likely that the up-regulation of these genes in the liver of lactating sows was caused by the activation of PPAR α . This assumption

Table 2 Relative transcript levels of classical PPAR α target genes involved in fatty acid uptake, fatty acid oxidation and ketogenesis in the liver of lactating and non-lactating sows on day 20 of lactation

	Non-lactating (n = 10)	Lactating (n = 10)
<i>Fatty acid uptake</i>		
FABP4	1 $\pm$ 0.36	1.88 $\pm$ 0.87*
SLC25A20	1 $\pm$ 0.60	4.63 $\pm$ 1.02*
<i>Fatty acid oxidation</i>		
ACOX1	1 $\pm$ 0.59	2.43 $\pm$ 1.47*
CYP4A24	1 $\pm$ 0.41	2.14 $\pm$ 1.47*
<i>Ketogenesis</i>		
FGF21	1 $\pm$ 0.70	4.86 $\pm$ 2.25*
HMGCS2	1 $\pm$ 1.14	9.63 $\pm$ 6.67*

Values represent mean $\pm$ SD for n = 10 sows per group. *Significantly different from non-lactating group ($P < 0.05$).

Table 3 Relative transcript levels of genes involved in carnitine synthesis and carnitine uptake in the liver of lactating and non-lactating sows on day 20 of lactation

	Non-lactating (n = 10)	Lactating (n = 10)
<i>Carnitine uptake</i>		
SLC22A5	1 $\pm$ 0.24	1.54 $\pm$ 0.51*
<i>Carnitine synthesis</i>		
ALDH9A1	1 $\pm$ 0.55	2.72 $\pm$ 1.04*
TMLHE	1 $\pm$ 0.41	1.54 $\pm$ 0.34*
BBOX1	1 $\pm$ 0.43	2.97 $\pm$ 0.96*

Values represent mean $\pm$ SD for n = 10 sows per group. *Significantly different from non-lactating group ($P < 0.05$).

is strongly supported by the fact that the functional PPRE identified in the mouse SLC22A5 gene is completely identical (100%) and the functional PPRES of mouse ALDH9A1 and BBOX1 show a high similarity between mouse and pig [6]. In addition, treatment with the synthetic PPAR α activator clofibrate [20] and food deprivation [21] was reported to cause a marked up-regulation of SLC22A5 and BBOX1 and an increase in the activity of butyrobetaine dioxygenase (encoded by BBOX1), the rate-limiting enzyme of carnitine synthesis, in the liver of pigs. Moreover, treatment with clofibrate [20] and food deprivation [21] causes a significant increase in the hepatic concentration of carnitine in pigs. In the present study we found that the carnitine concentration in the liver was approximately 20% lower in lactating than in non-lactating sows (Free carnitine: 43.88 $\pm$ 9.13 vs. 56.1 $\pm$ 11.5 nmol/g wet weight, n = 10/group, $P < 0.05$), despite the strong increase in the expression of genes involved in carnitine synthesis and uptake. In addition, the concentration of carnitine in plasma was even about 50% lower in lactating than in non-lactating sows (Free carnitine: 6.71 $\pm$ 0.63 vs. 12.90 $\pm$ 0.98 μ mol/L, Acetylcarnitine: 0.73 $\pm$ 0.16 vs. 1.53 $\pm$ 0.20 μ mol/L, n = 10/group, both $P < 0.001$), which is likely due to loss of carnitine from the body pool via the milk. Notably, milk of sows is rich in carnitine. Carnitine concentrations in sows' milk were reported to be in the range between 120 and 185 μ mol/L, depending on the stage of lactation [22,23]. Thus, production of 8–10 liter of milk per day is associated with a loss of 1 to 2 mmoles of carnitine, an amount which is in great excess of the whole plasma carnitine pool. Thus, mobilisation of carnitine from tissue stores and an increase in carnitine synthesis rate might be important for supplying carnitine for milk. These observations, therefore, suggest that the PPAR α mediated up-regulation of genes involved in carnitine synthesis and uptake in the liver of lactating sows is an adaptive mechanism to maintain hepatic carnitine levels at a level sufficient to transport excessive amounts of fatty acids

into the mitochondrion. However, the lower hepatic carnitine level in the liver of lactating than in non-lactating sows indicates that the increase in carnitine synthesis and uptake in the liver of lactating sows cannot completely compensate the loss of carnitine via the milk.

Previous studies have shown that supplementation of carnitine to sows during pregnancy offers beneficial effects on fetal growth and muscle development, number of piglets born and piglet and litter weights at birth [24-27]. It has been assumed that these effects of carnitine were mediated by influencing the secretion of IGF-1 and insulin and by an increased intrauterine nutrition of fetuses [24,25,28]. In contrast, supplementation of carnitine during lactation had less effects on sow and litter performance [22,24]. Thus, our observation of an increased expression of enzymes of carnitine synthesis in the liver during lactation, indicative of an increased carnitine biosynthesis, could provide an explanation for the opposite effects of carnitine supplementation in pregnancy and lactation.

In conclusion, the results of the present study show that the PPAR α pathway is activated in the liver of sows during lactation which leads to an up-regulation of genes involved in carnitine synthesis and carnitine uptake. The PPAR α mediated up-regulation of genes involved in carnitine synthesis and uptake in the liver of lactating sows may be regarded as an adaptive means to maintain hepatic carnitine levels at a level sufficient to transport excessive amounts of fatty acids into the mitochondrion.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

SR conducted the animal experiment, performed the PCR analyses and the statistical analyses and wrote the manuscript. RR supervised PCR analyses and helped to draft the manuscript. SH and GR established the liver biopsy sampling procedure. SL conducted liver biopsy sampling. GE was responsible for animal keeping. KE conceived of the study, participated in its design and coordination and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This study was supported by the German Research Foundation (Deutsche Forschungsgemeinschaft; Grant no. ED 70/9-1).

Author details

¹Institute of Animal Nutrition and Nutritional Physiology, Justus-Liebig-University, Heinrich-Buff-Ring 26-32, Giessen 35392, Germany.

²Department of Veterinary Clinical Sciences, Swine Diseases, Justus-Liebig-University, Frankfurter Straße 112, Giessen 35392, Germany.

³Institute for Animal Breeding and Genetics, Justus-Liebig-University, Ludwigstraße 21b, Giessen 35390, Germany.

Received: 17 January 2013 Accepted: 7 March 2013

Published: 14 March 2013

References

1. Trayhurn P, Douglas JB, McGuckin MM: Brown adipose tissue thermogenesis is 'suppressed' during lactation in mice. *Nature* 1982, **298**:59-60.

2. Williamson DH: Regulation of metabolism during lactation in the rat. *Reprod Nutr Dev* 1986, **26**:597-603.
3. Rosenbaum S, Ringseis R, Hillen S, Becker S, Erhardt G, Reiner G, Eder K: Genome-wide transcript profiling indicates induction of energy-generating pathways and an adaptive immune response in the liver of sows during lactation. *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics* 2012, **7**:370-381.
4. Kersten S, Seydoux J, Peters JM, Gonzalez FJ, Desvergne B, Wahli W: Peroxisome proliferator-activated receptor α mediates the adaptive response to fasting. *J Clin Invest* 1999, **103**:1489-1498.
5. Mandard S, Müller M, Kersten S: Peroxisome proliferator receptor α a target genes. *Cell Mol Life Sci* 2004, **61**:393-416.
6. Ringseis R, Wen G, Eder K: Regulation of genes involved in carnitine homeostasis by PPAR α across different species (rat, mouse, pig, cattle, chicken, and human). *PPAR Res* 2012, **2012**:868317.
7. Fischer M, Keller J, Hirche F, Kluge H, Ringseis R, Eder K: Activities of gamma-butyrobetaine dioxygenase and concentrations of carnitine in tissues of pigs. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2009, **153**:324-331.
8. Wen G, Ringseis R, Eder K: Mouse OCTN2 is directly regulated by peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) via a PPRE located in the first intron. *Biochem Pharmacol* 2010, **79**:768-776.
9. Wen G, Kühne H, Rauer C, Ringseis R, Eder K: Mouse γ -butyrobetaine dioxygenase is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor α through a PPRE located in the proximal promoter. *Biochem Pharmacol* 2011, **82**:175-183.
10. Wen G, Ringseis R, Rauer C, Eder K: The mouse gene encoding the carnitine biosynthetic enzyme 4-N-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor α . *Biochim Biophys Acta* 1819, **2012**:357-365.
11. Looor JJ, Dann HM, Everts RE, Oliveira R, Green CA, Janovick Guretzky NA, Rodriguez-Zas SL, Lewin HA, Drackley JK: Temporal gene expression profiling of liver from periparturient dairy cows reveals complex adaptive mechanisms in hepatic function. *Physiol Genomics* 2005, **23**:217-226.
12. Looor JJ, Everts RE, Bionaz M, Dann HM, Morin DE, Oliveira R, Rodriguez-Zas SL, Drackley JK, Lewin HA: Nutrition-induced ketosis alters metabolic and signaling gene networks in liver of periparturient dairy cows. *Physiol Genomics* 2007, **32**:105-116.
13. van Dorland HA, Richter S, Morel I, Doherr MG, Castro N, Bruckmaier RM: Variation in hepatic regulation of metabolism during the dry period and in early lactation in dairy cows. *J Dairy Sci* 2009, **92**:1924-1940.
14. Schlegel G, Keller J, Hirche F, Geißler S, Schwarz FJ, Ringseis R, Stangl GI, Eder K: Expression of genes involved in hepatic carnitine synthesis and uptake in dairy cows in the transition period and at different stages of lactation. *BMC Vet Res* 2012, **8**:28.
15. Washburn KE, Powell JG, Maxwell CV, Kegley EB, Johnson Z, Fakler TM: A successful method of obtaining percutaneous liver biopsy samples of sufficient quantity for trace mineral analysis in adult swine without the aid of ultrasound. *J Swine Health Prod* 2005, **13**:126-130.
16. Keller J, Ringseis R, Koc A, Lukas I, Kluge H, Eder K: Supplementation with L-carnitine downregulates genes of the ubiquitin proteasome system in the skeletal muscle and liver of piglets. *Animal* 2012, **6**:70-78.
17. Hirche F, Fischer M, Keller J, Eder K: Determination of carnitine, its short chain acyl esters and metabolic precursors trimethyllysine and γ -butyrobetaine by quasi-solid phase extraction and MS/MS detection. *J Chromatogr B* 2009, **877**:2158-2162.
18. Kroetz DL, Yook P, Costet P, Bianchi P, Pineau T: Peroxisome proliferator-activated receptor α controls the hepatic CYP4A induction adaptive response to starvation and diabetes. *J Biol Chem* 1998, **273**:31581-31589.
19. Goto T, Takahashi N, Kato S, Egawa K, Ebisu S, Moriyama T, Fushiki T, Kawada T: Phytol directly activates peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) and regulates gene expression involved in lipid metabolism in PPAR α -expressing HepG2 hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2005, **337**:440-445.
20. Ringseis R, Luci S, Spielmann J, Kluge H, Fischer M, Geissler S, Wen G, Hirche F, Eder K: Clofibrate treatment up-regulates novel organic cation transporter (OCTN)-2 in tissues of pigs as a model of non-proliferating species. *Eur J Pharmacol* 2008, **583**:11-17.
21. Ringseis R, Wege N, Wen G, Rauer C, Hirche F, Kluge H, Eder K: Carnitine synthesis and uptake into cells are stimulated by fasting in pigs as a model of nonproliferating species. *J Nutr Biochem* 2009, **20**:840-847.

22. Musser RE, Goodband RD, Tokach MD, Owen KQ, Nelssen JL, Blum SA, Campbell RG, Smits R, Dritz SS, Civis CA: **Effects of L-carnitine fed during lactation on sow and litter performance.** *J Anim Sci* 1999, **77**:3296–3303.
23. Birkenfeld C, Doberenz J, Kluge H, Eder K: **Effect of L-carnitine supplementation of sows on L-carnitine status, body composition and concentrations of lipids in liver and plasma of their piglets at birth and during the suckling period.** *Anim Feed Sci Technol* 2006, **129**:23–28.
24. Musser RE, Goodband RD, Tokach MD, Owen KQ, Nelssen JL, Blum SA, Dritz SS, Civis CA: **Effects of L-carnitine fed during gestation and lactation on sow and litter performance.** *J Anim Sci* 1999, **77**:3289–3295.
25. Musser RE, Dritz SS, Davis DL, Tokach MD, Nelssen JL, Goodband RD, Owen KQ: **Effects of L-carnitine in the gestating sow diet on fetal muscle development and carcass characteristics of the offspring.** *J Appl Anim Res* 2007, **31**:105–111.
26. Brown KR, Goodband RD, Tokach MD, Dritz SS, Nelssen JL, Minton JE, Higgins JJ, Woodworth JC, Johnson BJ: **Growth characteristics, blood metabolites, and insulin-like growth factor system components in maternal tissues of gilts fed L-carnitine through day seventy of gestation.** *J Anim Sci* 2007, **85**:1687–1694.
27. Ramanau A, Kluge H, Spilke J, Eder K: **Effects of supplementation of L-carnitine on the reproductive performance of sows in stock production.** *Livest Sci* 2008, **113**:34–42.
28. Eder K: **Influence of L-carnitine on metabolism and performance of sows.** *Br J Nutr* 2009, **102**:645–654.

doi:10.1186/1751-0147-55-24

Cite this article as: Rosenbaum *et al.*: Genes involved in carnitine synthesis and carnitine uptake are up-regulated in the liver of sows during lactation. *Acta Veterinaria Scandinavica* 2013 **55**:24.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



BRIEF COMMUNICATION

Open Access

The stress signalling pathway nuclear factor E2-related factor 2 is activated in the liver of sows during lactation

Susann Rosenbaum^{1†}, Robert Ringseis^{1†}, Sonja Hillen², Sabrina Becker², Georg Erhardt³, Gerald Reiner² and Klaus Eder^{1*}

Abstract

Background: It has recently been shown that the lactation-induced inflammatory state in the liver of dairy cows is accompanied by activation of the nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2) pathway, which regulates the expression of antioxidant and cytoprotective genes and thereby protects tissues from inflammatory mediators and reactive oxygen species (ROS). The present study aimed to study whether the Nrf2 pathway is activated also in the liver of lactating sows.

Findings: Transcript levels of known Nrf2 target genes, *UGT1A1* (encoding glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A1), *HO-1* (encoding heme oxygenase 1), *NQO1* (encoding NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1), *GPX1* (encoding glutathione peroxidase), *PRDX6* (encoding peroxiredoxin 6), *TXNRD1* (encoding thioredoxin reductase 1), and *SOD* (encoding superoxide dismutase), in the liver are significantly elevated (between 1.7 and 3.1 fold) in lactating sows compared to non-lactating sows. The inflammatory state in the liver was evidenced by the finding that transcript levels of genes encoding acute phase proteins, namely haptoglobin (HP), fibrinogen γ (FGG), complement factor B (CFB), C-reactive protein (CRP) and lipopolysaccharide-binding protein (LBP), were significantly higher (2 to 8.7 fold) in lactating compared to non-lactating sows.

Conclusions: The results of the present study indicate that the Nrf2 pathway in the liver of sows is activated during lactation. The activation of Nrf2 pathway during lactation in sows might be interpreted as a physiologic means to counteract the inflammatory process and to protect the liver against damage induced by inflammatory signals and ROS.

Keywords: Sow, Liver, Lactation, Inflammation, Nrf2 pathway, Acute phase proteins

Findings

Typical characteristics for the lactation phase are dramatic increases in the energy and nutrient requirement of the organism, which are usually met by an elevation of food intake and a mobilisation of body's energy stores [1,2]. In dairy cows, lactation was also shown to induce immune and inflammatory responses in the liver [3,4]. In contrast to extensive research in rodents and cows on the mechanisms underlying the lactation-induced metabolic and immunologic adaptations [3-6], only limited information is available in sows in this regard [7,8]. In

an attempt to improve the knowledge about metabolic and immunologic adaptations during lactation in sows we have recently analyzed the changes in the hepatic transcriptome of sows during lactation on a genome-wide level [9]. Besides the expected induction of energy-generating pathways in the liver during lactation, we found that lactation causes an induction of an inflammatory state as evidenced from the marked induction of several acute phase proteins in the liver of lactating sows [9]. Acute phase proteins are secreted from hepatocytes in response to inflammatory stimuli and are therefore established markers of inflammation in both human and veterinary clinical pathologies, which indicates that lactation induces an inflammatory state in the liver of sows, like in dairy cows [3,4]. Interestingly, we have recently

* Correspondence: klaus.eder@ernaehrung.uni-giessen.de

†Equal contributors

¹Institute of Animal Nutrition and Nutritional Physiology, Justus-Liebig-University, Heinrich-Buff-Ring 26-32, Giessen 35392, Germany
Full list of author information is available at the end of the article

reported that the inflammatory state in the liver of dairy cows during lactation is accompanied by activation of the nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2) stress signalling pathway (unpublished observations). Nrf2 is a

redox-sensitive transcription factor which upon activation by inflammatory stimuli but also reactive oxygen species (ROS), xenobiotics or electrophiles [10] induces the transcription of a large set of genes encoding various

Table 1 Characteristics of primers and primer performance data used for qPCR

Gene symbol	Forward primer (from 5' to 3') Reverse primer (from 5' to 3')	Product size (bp)	NCBI GenBank	Slope	R ²	Efficiency*	M
<i>Reference genes</i>							
RSP9	GTCGAAGACTTATGTGACC AGCTTAAAGACCTGGGTCT	325	XM_003356050	-0.28	0.999	1.91	0.053
ATP5G1	CAGTCACCTTGAGCCGGGCA TAGCGCCCCGGTGGTTTGC	94	NM_001025218	-0.30	0.998	1.99	0.054
GSR	AGCGCATGCTACGTGAGC GGTACGCCCTGTGGCAAT	175	AY368271	-0.29	0.997	1.94	0.055
ACTB	GACATCCGAAGGACCTCTA ACATCTGCTGGAAGGTGGAC	205	XM_003124280	-0.32	0.992	2.1	0.064
SHAS2	GAAAAGGCTAACCTACCCTG TGTTGGACAAGACCAGTTGG	218	NM_214053	-0.21	0.996	1.65	0.076
<i>Target genes</i>							
HP	ACAGATGACAGTGCCCAAA CCGCACACTGCTTCACATTC	188	NM_214000	-0.30	0.997	1.99	
FGG	GACATCTGTCTCTACTGGA CATGACACTGTTCATCCAC	375	NM_001244524	-0.29	0.999	1.95	
CFB	CTCAACGCAAAGACCGCAA AAATGGGCTGATGGTCTGG	106	NM_001101824	-0.29	0.998	1.96	
CRP	CCTTTGTCTTCCCAAGAG CACCTCGCCACTCATTTTCAT	563	NM_213844	-0.28	0.999	1.91	
LBP	ACCGCTCCCCAGTTGGCTTC AGCGCGGCGGACACATTAGT	406	NM_001128435	-0.29	0.999	1.96	
NQO1	CCAGCAGCCCGGCAATCTG AGGTCCGACACGGCGACCTC	160	NM_001159613	-0.28	0.997	1.89	
TXNRD1	CTTTACCTTATTGCCGGGT GTTACCGATTGTTGGCC	162	NM_214154	-0.30	0.999	1.98	
UGT1A1	GATCCTTTCTGCAACGCAT GGAAGGTCATGTGATCTGAG	313	XM_003483776	-0.28	0.996	1.91	
HO-1	AGCTGTTTCTGAGCTCCAA CAAGACGGAAACACGAGACA	130	NM_001004027	-0.30	0.998	1.98	
PRDX6	GGCCGCATCCGTTCCACGA ACTGGATGGCAAGTCCCGACT	280	NM_214408	-0.29	0.998	1.95	
SOD	TCCATGTCCATCAGTTTGA CTGCCCAAGTCATCTGGTTT	250	NM_001190422	-0.27	0.998	1.88	
GPX1	GGCACAACGGTGCGGGACTA AGGCGAAGAGCGGGTGAGCA	235	NM_214201	-0.29	0.998	1.96	

*Coefficient of determination of the standard curve. *The efficiency is determined by $[10^{-\text{slope}}]$.

Abbreviations: *RSP9* 40S ribosomal protein S9-like, *ATP5G1* ATP synthase, H⁺ transporting, mitochondrial Fo complex, subunit C1 (subunit 9), *GSR* glutathione reductase, *ACTB* actin, beta, *SHAS2* hyaluronan synthase 2, *HP* haptoglobin, *FGG* fibrinogen γ , *CFB* complement factor B, *CRP* C-reactive protein, *LBP* lipopolysaccharide-binding protein, *NQO1* NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1, *TXNRD1* thioredoxin reductase 1, *UGT1A1* glucuronosyltransferase 1 family, and polypeptide A1; *HO-1* heme oxygenase 1, *PRDX6* peroxiredoxin 6, *SOD* superoxide dismutase, *GPX1* glutathione peroxidase 1.

antioxidative proteins such as glutathione peroxidase 1 (encoded by *GPX1*), superoxide dismutase (encoded by *SOD*) and cytoprotective proteins [heme oxygenase 1 (encoded by *HO-1*), NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1 (encoded by *NQO1*), peroxiredoxin 6 (encoded by *PRDX6*), thioredoxin reductase 1 (encoded by *TXNRD1*), glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A1 (encoded by *UGT1A1*)] and thereby protects tissues from inflammatory damage and neutralizes ROS produced under pro-inflammatory conditions [11]. In light of the observation that the lactation-induced inflammatory state in the liver of dairy cows is accompanied by activation of the Nrf2 pathway and in order to further improve knowledge about the mechanisms underlying the lactation-induced adaptations during lactation in sows, the present study aimed to investigate whether the Nrf2 pathway is activated in the liver of lactating sows.

The animal study was carried out in accordance with established guidelines for the care and handling of laboratory animals and was approved by the local Animal Welfare Authorities (Regierungspräsidium Giessen; permission no: GI 19/3-No. 29/2010). As described recently in more detail [9], the experiment was performed with twenty second parity sows (Large White & German Landrace), which were artificially inseminated with semen from boars of the own breed, and kept in single crates until day 21 of pregnancy. From day 21 to 110 of pregnancy, the sows were kept in groups in pens that had fully slatted floors, nipple drinkers and feeding stations. On day 110 of pregnancy, they were moved to the farrowing accommodation where they were housed in single farrowing pens. Throughout pregnancy, sows of both groups were fed a commercial diet for gestating sows *ad libitum*. After farrowing, the sows were randomly assigned into two groups of 10 animals each. In the first group of sows, all piglets were removed from the sow ("non-lactating group") 24 h after parturition. This group served as the non-lactating control. In the second group, litters were standardised to 12 piglets per sow ("lactating group"). Throughout lactation until the end of the experiment the sows received a diet for lactating sows. Until day 6 after farrowing, the amount of feed given to the lactating sows was successively increased, and from day 7 after farrowing and thereafter the sows were fed individual amounts of feed depending on their body weights. In the non-lactating group, each sow received an amount of food sufficient to cover the individual energy and nutrient requirement for maintenance. On day 20 after farrowing, liver tissue was taken by biopsy and blood was collected from *Vena jugularis*. A full description of the housing condition, diet composition, feeding regime and sample collection including biopsy sample procedure can be found in our recent publication [9]. RNA isolation from frozen liver biopsies and

quantitative real-time PCR (qPCR) analysis were performed as described recently in detail by Keller *et al.* [12]. Characteristics of primers and primer performance data used for qPCR analysis are shown in Table 1. Plasma levels of TBARS were measured in plasma using a modified version of the TBARS assay [13]. Statistical analysis was performed by one way analysis of variance. Fisher's multiple range test was used to generate significant F-values of differences with $P < 0.05$.

As expected, evaluation of body weight development of sows throughout lactation revealed that sows of both groups lost body weight but that body weight loss was greater in lactating than in non-lactating sows despite the fact that lactating sows had a markedly greater feed intake [9]. Estimation of the energy balance of the sows revealed that lactating sows are in a strong negative energy balance during lactation indicating that the increased feed intake was not sufficient to fully compensate the body weight loss. In order to evaluate activation of Nrf2 pathway in the liver of sows we determined transcript levels of several known Nrf2 target genes in the liver samples. The results of the present study clearly show that the transcript levels of known Nrf2 target genes, *UGT1A1*, *HO-1*, *NQO1*, *GPX1*, *PRDX6*, *TXNRD1*, and *SOD*, in the liver are markedly elevated (between 1.7 and 3.1 fold) in lactating sows compared to non-lactating sows ($P < 0.05$, Table 2). Given that the above mentioned genes contain functional antioxidant response elements (ARE), which are the DNA binding motifs for Nrf2, in their regulatory regions [14], the up-regulation of these genes during lactation indicates, at least indirectly, that the Nrf2 pathway is indeed activated in the liver of lactating sows. This is in line with recent observations in dairy cows in which the Nrf2 pathway was shown to be strongly activated in liver (unpublished observations) and spleen [15] in early lactation compared to late pregnancy. Due to the limited amount of

Table 2 Relative transcript levels of Nrf2 target genes in the liver of lactating and non-lactating sows on day 20 of lactation

	Non-lactating (n = 10)	Lactating (n = 10)	P value
UGT1A1	1 ± 0.52	1.79 ± 0.59*	0.013
HO-1	1 ± 0.48	1.71 ± 0.42*	0.007
NQO1	1 ± 0.49	2.91 ± 1.54*	0.007
GPX1	1 ± 0.56	3.11 ± 1.19*	0.001
PRDX6	1 ± 0.56	2.12 ± 0.78*	0.008
TXNRD1	1 ± 0.28	2.99 ± 2.45*	0.029
SOD	1 ± 0.65	2.28 ± 1.01*	0.007
MT1A	1 ± 0.37	1.64 ± 1.26	0.190

Values represent mean ± SD for n = 10 sows per group. *Significantly different from non-lactating group ($P < 0.05$).

Table 3 Relative transcript levels of genes encoding acute phase proteins in the liver of lactating and non-lactating sows on day 20 of lactation

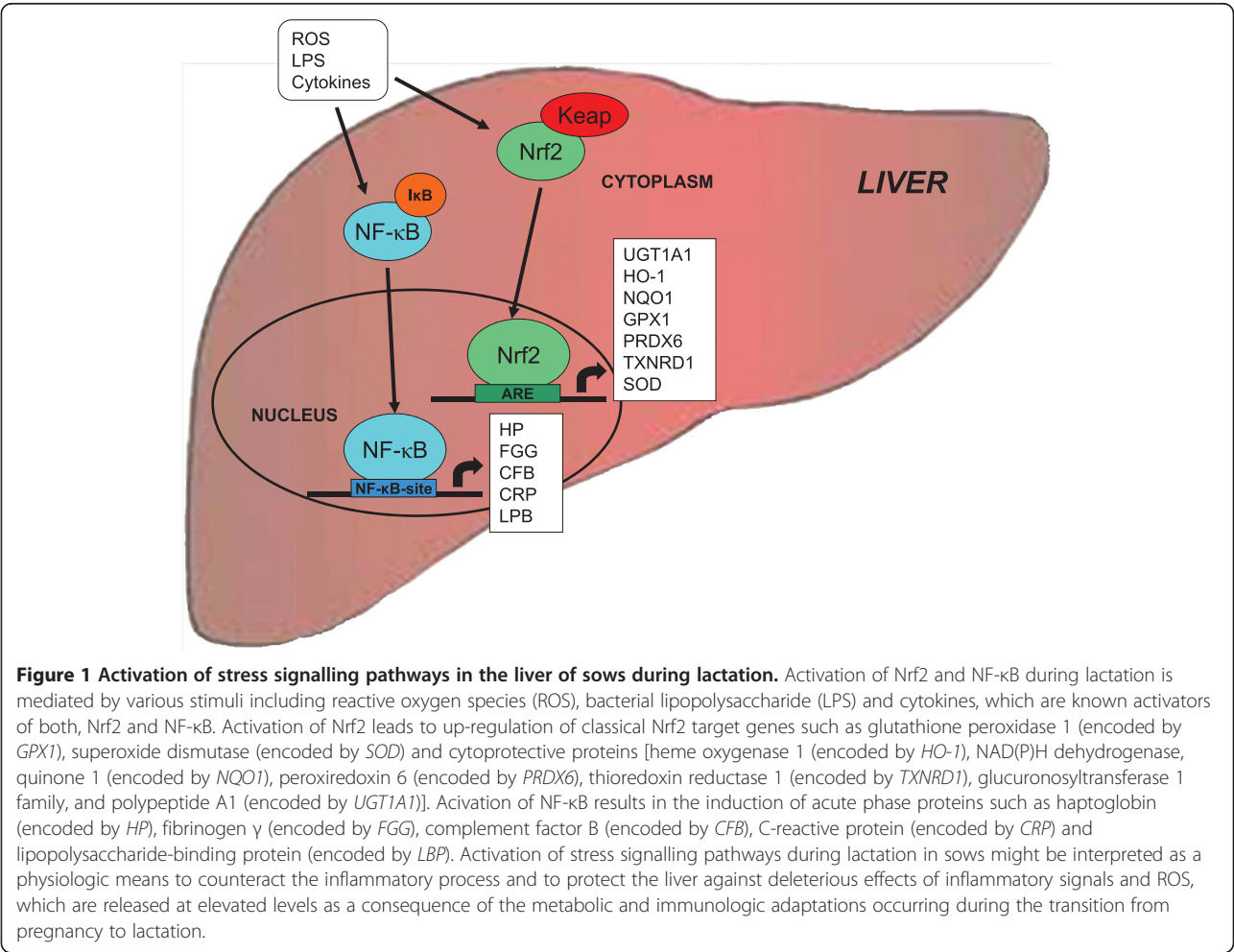
	Non-lactating (n = 10)	Lactating (n = 10)	P value
HP	1 ± 0.89	2.58 ± 1.08*	0.005
FGG	1 ± 0.55	2.90 ± 0.66*	0.001
CFB	1 ± 0.52	2.01 ± 0.36*	0.001
CRP	1 ± 0.68	8.68 ± 4.20*	0.001
LBP	1 ± 0.71	5.82 ± 1.94*	0.001

Values represent mean ± SD for n = 10 sows per group. *Significantly different from non-lactating group (P < 0.05).

liver tissue obtained from the biopsy sampling procedure additional assays, such as gel-shift assays providing direct evidence for activation of Nrf2 through determining of binding of Nrf2 to the ARE motif of Nrf2 target genes, could not be conducted. Due to the same reason protein levels of the Nrf2 target genes were not determined. However, several studies clearly showed that increased mRNA levels of Nrf2 target genes positively

correlate with elevated levels of the encoded proteins [16,17], suggesting that elevated Nrf2 target gene levels are suitable indicators of Nrf2 activation.

With regard to the mechanism underlying the activation of Nrf2 during lactation, it may be speculated that ROS, which are known activators of Nrf2 [10] and generated during an inflammatory process and an elevated energy production through the respiratory chain, are the stimuli triggering the activation of Nrf2 in the liver during lactation. Transcript levels of genes encoding acute phase proteins, such as haptoglobin (encoded by *HP*), fibrinogen γ (encoded by *FGG*), complement factor B (encoded by *CFB*), C-reactive protein (encoded by *CRP*) and lipopolysaccharide-binding protein (encoded by *LBP*), were clearly higher (2 to 8.7 fold) in lactating compared to non-lactating sows (P < 0.05, Table 3) providing at least indirect evidence for an inflammatory state occurring in the liver of lactating sows. In addition, the recently observed induction of energy-generating pathways (fatty acid catabolism, tricarboxylic acid cycle, respiratory chain) in livers of lactating sows [9] is supportive for an



elevated energy production during lactation. The unaltered plasma levels of TBARS, which were used as markers of oxidative stress, between lactating and non-lactating sows in the present study (7.03 ± 1.54 vs. 7.02 ± 2.25 nmol/ μ mol triacylglycerols, $n = 10$ /group, $P > 0.05$) suggests at first glance that ROS production was not elevated in sows during lactation. However, the lack of an increase in TBARS levels may be simply explained by the up-regulation of antioxidant genes which likely improved the capacity of the liver to cope with the increased levels of ROS and to prevent oxidative stress.

In conclusion, the results of the present study indicate that the Nrf2 pathway in the liver of sows is activated during lactation. The activation of Nrf2 pathway during lactation in sows might be interpreted as a physiologic means to counteract the inflammatory process and to protect the liver against damage induced by inflammatory signals and ROS, which are released at elevated levels as a consequence of the metabolic and immunologic adaptations occurring during the transition from pregnancy to lactation (Figure 1). Since Nrf2 is also expressed in the mammary gland, which is particularly susceptible for the induction of an inflammatory state caused by bacterial invasion via the mammary gland [18], it is likely that activation of this pathway during lactation might provide protection against bacterial derived inflammatory stimuli also in non-hepatic tissues.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

SR conducted the animal experiment, performed the PCR analyses and the statistical analyses and wrote the manuscript. RR supervised PCR analyses and helped to draft the manuscript. SH and GR established and supervised the liver biopsy sampling procedure. SB conducted liver biopsy sampling. GE was responsible for animal keeping. KE conceived of the study, participated in its design and coordination and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This study was supported by the German Research Foundation (Deutsche Forschungsgemeinschaft; Grant no. ED 70/9-1).

Author details

¹Institute of Animal Nutrition and Nutritional Physiology, Justus-Liebig-University, Heinrich-Buff-Ring 26-32, Giessen 35392, Germany.

²Department of Veterinary Clinical Sciences, Swine Diseases, Justus-Liebig-University, Frankfurter Straße 112, Giessen 35392, Germany.

³Institute for Animal Breeding and Genetics, Justus-Liebig-University, Ludwigstraße 21b, Giessen 35390, Germany.

Received: 11 September 2012 Accepted: 2 October 2012

Published: 5 October 2012

References

1. Trayhurn P, Douglas JB, McGuckin MM: Brown adipose tissue thermogenesis is 'suppressed' during lactation in mice. *Nature* 1982, **298**:59–60.
2. Williamson DH: Regulation of metabolism during lactation in the rat. *Reprod Nutr Dev* 1986, **26**:597–603.

3. Looor JJ, Dann HM, Everts RE, Oliveira R, Green CA, Guretzky NA, Rodriguez-Zas SL, Lewin HA, Drackley JK: Temporal gene expression profiling of liver from periparturient dairy cows reveals complex adaptive mechanisms in hepatic function. *Physiol Genomics* 2005, **23**:217–226.
4. Looor JJ, Dann HM, Guretzky NA, Everts RE, Oliveira R, Green CA, Litherland NB, Rodriguez-Zas SL, Lewin HA, Drackley JK: Plane of nutrition prepartum alters hepatic gene expression and function in dairy cows as assessed by longitudinal transcript and metabolic profiling. *Physiol Genomics* 2006, **27**:29–41.
5. Gutgesell A, Ringseis R, Schmidt E, Brandsch C, Stangl GI, Eder K: Downregulation of peroxisome proliferator-activated receptor α and its coactivators in liver and skeletal muscle mediates the metabolic adaptations during lactation in mice. *J Mol Endocrinol* 2009, **43**:241–250.
6. Bionaz M, Looor JJ: Gene networks driving bovine mammary protein synthesis during the lactation cycle. *Bioinform Biol Insights* 2011, **5**:83–98.
7. Ringseis R, Heller K, Kluge H, Eder K: mRNA expression of genes involved in fatty acid utilization in skeletal muscle and white adipose tissues of sows during lactation. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2011, **158**:450–454.
8. Theil PK, Labouriau R, Sejrnsen K, Thomsen B, Sørensen MT: Expression of genes involved in regulation of cell turnover during milk stasis and lactation rescue in sow mammary glands. *J Anim Sci* 2005, **83**:2349–2356.
9. Rosenbaum S, Ringseis R, Hillen S, Lange S, Erhardt G, Reiner G, Eder K: Genome-wide transcript profiling indicates induction of energy-generating pathways and an adaptive immune response in the liver of sows during lactation. *Comp Biochem Physiol D Genomics Prot* 2012. doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.cbd.2012.09.001.
10. Kaspar JW, Nitire SK, Jaiswal AK: Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2009, **47**:1304–1309.
11. Kim J, Cha YN, Surh YJ: A protective role of nuclear factor-erythroid 2-related factor-2 (Nrf2) in inflammatory disorders. *Mutat Res* 2010, **690**:12–23.
12. Keller J, Ringseis R, Koc A, Lukas I, Kluge H, Eder K: Supplementation with L-carnitine downregulates genes of the ubiquitin proteasome system in the skeletal muscle and liver of piglets. *Animal* 2012, **6**:70–78.
13. Sidwell CG, Salwin H, Benca M, Mitchell JH Jr: The use of thiobarbituric acid as a measure of fat oxidation. *J Am Oil Chem Soc* 1954, **31**:603–606.
14. Jung KA, Kwak MK: The Nrf2 system as a potential target for the development of indirect antioxidants. *Molecules* 2010, **15**:7266–7291.
15. Morris DG, Waters SM, McCarthy SD, Patton J, Earley B, Fitzpatrick R, Murphy JJ, Diskin MG, Kenny DA, Brass A, Wathes DC: Pleiotropic effects of negative energy balance in the postpartum dairy cow on splenic gene expression: repercussions for innate and adaptive immunity. *Physiol Genomics* 2009, **39**:28–37.
16. Wagner AE, Ernst I, Iori R, Desel C, Rimbach G: Sulforaphane but not ascorbigen, indole-3-carbinol and ascorbic acid activates the transcription factor Nrf2 and induces phase-2 and antioxidant enzymes in human keratinocytes in culture. *Exp Dermatol* 2009, **19**:137–144.
17. Ernst IM, Wagner AE, Schuermann C, Storm N, Höppner W, Döring F, Stocker A, Rimbach G: Allyl-, butyl- and phenylethyl-isothiocyanate activate Nrf2 in cultured fibroblasts. *Pharmacol Res* 2011, **63**:233–240.
18. Elmore RG, Martin CE, Berg JN: Absorption of Escherichia coli endotoxin from the mammary glands and uteri of early post-partum sows and gilts. *Theriogenology* 1978, **10**:439–445.

doi:10.1186/1751-0147-54-59

Cite this article as: Rosenbaum et al.: The stress signalling pathway nuclear factor E2-related factor 2 is activated in the liver of sows during lactation. *Acta Veterinaria Scandinavica* 2012 **54**:59.

4 Diskussion

Während der Laktation wird der gesamte Stoffwechsel darauf ausgerichtet Energie und Substrate für die Milchsynthese zur Verfügung zu stellen und damit die Ernährung/Aufzucht der Nachkommen zu gewährleisten. Neben dem Fettgewebe und der Muskulatur stellt die Leber ein bedeutendes Organ für die Bereitstellung von Substraten für die Milchsynthese in der Milchdrüse dar. Sie ist aufgrund ihrer metabolischen Aktivität von entscheidender Bedeutung für die Nährstoffhomöostase und -bereitstellung für den Organismus. Sowohl bei Milchkühen als auch beim Modelltier Nager existieren bereits zahlreiche Studien über Veränderungen der Genexpression in der Leber während der Laktation. In der Leber von laktierenden Sauen stehen vergleichbare Analysen aus. Die dieser Arbeit zugrundeliegenden Untersuchungen sollten dazu dienen, erstmals umfangreiche Erkenntnisse über laktationsbedingte Veränderungen der Genexpression in der Leber von Sauen zu generieren.

Unter Anwendung der *microarray*-Technologie konnten in der Leber von laktierenden Sauen verglichen mit nicht laktierenden Tieren 632 signifikant unterschiedlich exprimierte Gene identifiziert werden. Dabei waren 331 Gene in ihrer Expression gesteigert ($FC \geq 1,5$) und 301 Gene in ihrer Expression vermindert ($FC \leq -1,5$). Zur Interpretation der generierten Daten wurde die *database of annotation visualisation and integrated discovery* (DAVID) herangezogen. Diese Datenbank stellt bioinformatische *tools* zur Verfügung, welche es ermöglichen, die differentiell regulierten Gene verschiedenen Signalwegen, biologischen und molekularen Prozessen und funktionellen Clustern zuzuordnen. Die mithilfe der *microarray*-Technologie ermittelten Daten und deren Interpretation stellen den Inhalt der ersten Originalarbeit dar (**Studie 1**). Die Auswertung des *porcinen* Affymetrix GeneChip gab Hinweise auf eine PPAR α -Aktivierung in der Leber laktierender Sauen. Die Bestimmung der Expression bekannter PPAR α -Zielgene sollte folglich Grundlage einer weiteren Originalarbeit sein (**Studie 2**). Zum Nachweis einer in der Leber von laktierenden Sauen bestehenden Inflammation und einer Aktivierung des Nrf2 wurden des Weiteren die Expressionen verschiedener Akute-Phase-Proteine und bekannter Nrf2-Zielgene bestimmt. Diese Ergebnisse wurden im Rahmen der 3. Originalarbeit (**Studie 3**) beschrieben und diskutiert. Wichtig für die Interpretation der generierten Daten ist, dass sich Genexpressionsanalysen ausschließlich auf die mRNA-Konzentrationen von Zielgenen im untersuchten Gewebe beschränken. Sie lassen nur bedingt Aussagen über die Wirkungen auf Proteinebene und entsprechende Aktivitäten von Enzymen zu, da diese zusätzlichen Veränderungen durch posttranslationale Modifikationen unterliegen können. Die Ergebnisse der Studien 1-3 sollen

folgend diskutiert werden. Dabei werden deren Inhalte den Themenschwerpunkten Veränderungen im Intermediärstoffwechsel und Veränderungen des Abwehrsystems während der Laktation bei der Sau zugeordnet und getrennt diskutiert.

4.1 Veränderungen im Intermediärstoffwechsel während der Laktation bei der Sau

In der vorliegenden Studie zeigten Sauen im Verlauf der Laktation einen starken Anstieg der Futteraufnahme auf (**Studie 1**). Diese ist unter anderem abhängig von der Wurfgröße und damit der Milchmenge, der Parität und dem Energiegehalt des Futters (O'Grady *et al.*, 1985). Durch eine gesteigerte Futteraufnahme versucht der laktierende Organismus den Mehrbedarf an Energie und Nährstoffen sicherzustellen (Trottier und Easter, 1995; Loores *et al.*, 2007; Quesnel *et al.*, 2007; Gutgesell *et al.*, 2009b). Allerdings sind laktierende Sauen ähnlich wie Kühe in der frühen postpartalen Phase nicht in der Lage, diesen Mehrbedarf durch eine adäquate Steigerung der Nahrungsaufnahme zu decken (Noblet *et al.*, 1990). In der Literatur gibt es Hinweise, dass eine gesteigerte neuronale Verfügbarkeit an Fettsäuren beim Nager ein Sättigungssignal bedingen kann (Coccurello *et al.*, 2010). Untersuchungen an laktierenden Sauen zeigten verminderte Futteraufnahmen bei gleichzeitig hohen NEFA-Konzentrationen im Plasma (**Studie 1**; Weldon *et al.*, 1994; Le Cozler *et al.*, 1998; Revell *et al.*, 1998). Damit kann in Betracht gezogen werden, dass die während der Übergangsphase von der Trächtigkeit zur Laktation vermehrt aus dem Fettgewebe freigesetzten NEFA auch beim Schwein über eine gesteigerte neuronale Verfügbarkeit einen negativen Einfluss auf die Nahrungsaufnahme haben. Im Verlauf der Laktation ist bei laktierenden Sauen zudem sowohl eine Zunahme der Organgewichte des Gastrointestinaltraktes (GIT) als auch eine Verbesserung der Verdauungsfunktion und damit eine Adaptation der GIT zu beobachten (Pelletier *et al.*, 1983; Pelletier *et al.*, 1987). Demzufolge kann die zunächst eingeschränkte Kapazität des Verdauungstraktes ebenfalls als Ursache für die geringe Futteraufnahme in der frühen postpartalen Phase diskutiert werden. Die unzureichende Futteraufnahme führte bei den laktierenden Sauen der vorliegenden Arbeit zur Entwicklung einer negativen Energiebilanz und zu deutlichen Gewichtsverlusten (**Studie 1**). Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigten des Weiteren, dass sich die spätere Phase der Laktation durch einen kontinuierlichen Anstieg der Futteraufnahme und deutlich geringere Gewichtsverluste auszeichnet (**Studie 1**). Während der Laktation reduzierte Leptinkonzentrationen im Plasma von Sauen (nicht veröffentlichte Ergebnisse) könnten dies bedingen, indem sie hormonell eine Appetitsteigerung und damit einen Anstieg der Futteraufnahme bedingen (Smith und Grove,

2002; Vernon *et al.*, 2002). Quesnel *et al.* (2009) zeigten dabei eine negative Korrelation von Leptinkonzentrationen im Plasma und der Futteraufnahme bei laktierenden Sauen. Die Gewichtsverluste während der Laktation resultieren in Abhängigkeit von der Körperzusammensetzung und vom Protein- und Energiegehalt der Ration sowohl aus der Mobilisierung von Fettgewebe als auch aus der Degradation von Muskelgewebe und inneren Organen (Etienne *et al.*, 1985; Noblet und Etienne, 1987; Brendemuhl *et al.*, 1989; Sauber *et al.*, 1998; Clowes *et al.*, 2003; Quesnel *et al.*, 2007). Im Vergleich zu Sauen zeichnen sich Nager durch eine positive Gewichtsentwicklung in der Laktation aus (Gutgesell *et al.*, 2009b). Diese ist durch eine ausgeprägte Hyperphagie dieser Spezies begründet. Es ist denkbar, dass Nager in der frühen postpartalen Phase ebenfalls eine negative Energiebilanz aufweisen.

4.1.1 Veränderungen der Expression von Genen des Lipid- und Carnitinmetabolismus

Befindet sich der Organismus in einer negativen Energiebilanz, werden für die Energiegewinnung notwendige Substrate aus peripheren Speichern wie dem Fettgewebe mobilisiert. Dies wird, wie bereits in der Literatur beschrieben, auch bei den Sauen des vorliegenden Versuches durch gesteigerte Plasmaspiegel an NEFA während der Laktation deutlich (**Studie 1**; Trottier und Easter, 1995; Revell *et al.*, 1998; Loores *et al.*, 2005, 2006; Quesnel *et al.*, 2009; Ringseis *et al.*, 2011; Schlegel *et al.*, 2012a). Diese gesteigerten Plasmaspiegel resultieren aus einer verstärkten Hydrolyse von Triglyceriden (TAG) aus dem Fettgewebe, welche wie im Fastenzustand durch eine gesteigerte Expression und Aktivität der hormonsensitiven Lipase vermittelt wird (Smith und McNamara, 1990; McNamara, 1994; Liu *et al.*, 1995). Die mobilisierten Fettsäuren dienen als metabolische Substrate für andere Organe wie Milchdrüse, Leber und Skelettmuskulatur (Spencer *et al.*, 1969; Bell und Bauman, 1997; Shennan und Peaker, 2000; Reynolds *et al.*, 2003; Ringseis *et al.*, 2011). Hierbei können die in die Leber mittels Fettsäuretransporter aufgenommenen NEFA als potente Aktivatoren des PPAR α fungieren (Berger und Moller, 2002; Mandard *et al.*, 2004). In der Literatur ist umfangreich beschrieben, dass sowohl die Expression von Genen des Fettsäuretransportes, der Fettsäureaktivierung, der peroxisomalen und mitochondrialen β -Oxidation, der Carnitinsynthese und des Carnitintransports als auch der Ketogenese durch PPAR α reguliert werden (Mandard *et al.*, 2004; Inagaki *et al.*, 2007; Wen *et al.*, 2010, 2011, 2012). Die gesteigerte Expression verschiedener Zielgene des Transkriptionsfaktors kann daher als indirekter Nachweis einer Aktivierung herangezogen werden. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass bei laktierenden Sauen, welche

gesteigerte Plasmakonzentrationen an NEFA aufweisen, eine gesteigerte Expression einer Vielzahl von Genen des Fettsäurekatabolismus zu beobachten ist (**Studie 1 und 2**). Die Fettsäuren müssen zunächst aus dem Blutstrom in die Zelle aufgenommen werden. Dies wird mittels Fettsäuretransporter realisiert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit kann durch eine gesteigerte Genexpression des FABP4 auf eine erhöhte Aufnahme von Fettsäuren in die Leber von Sauen während der Laktation geschlossen werden. Fettsäuren gelten als sehr reaktionsträge Substanzen und müssen nach dem Übertritt in die Zelle zunächst aktiviert werden. Dies erfolgt durch die Bildung von Thioestern mit dem Coenzym A, eine durch Ligasen vermittelte Reaktion. Die Lebern laktierender Sauen der vorliegenden Studie wiesen eine gesteigerte Expression der ACSL5 auf (**Studie 1**), was eine gesteigerte Aktivierung von NEFA vermuten lässt. Langkettige Fettsäuren erfahren mittels der peroximalen β -Oxidation zunächst eine Reduktion ihrer Kettenlänge. Die dieser Arbeit zugrundeliegenden Untersuchungen zeigten während der Laktation bei Sauen gesteigerte Expressionen der Gene ABCD3 und ACOX1 auf (**Studie 1 und 2**). Diese vermitteln zum einen den Transport der langkettigen Fettsäuren in das Peroxisom und zum anderen die sich anschließende β -Oxidation. Nachfolgend wird die verkürzte Fettsäure mittels des Carnitin-Shuttle-Systems in die Mitochondrienmatrix transportiert, wo die mitochondriale β -Oxidation zur Energiegewinnung erfolgt. Hier war ein Anstieg der Transkription der Gene CPT1A und SLC25A20 (CACT; Carnitin/Acylcarnitin-Translokase) als wichtige Komponenten des Systems zu beobachten (**Studie 1 und 2**). Die CPT1A vermittelt dabei den limitierenden Schritt der mitochondrialen β -Oxidation, die Konversion von Acyl-CoA in Carnitinester, und die CACT ist verantwortlich für den Transport des Acyl-Carnitins in die Mitochondrienmatrix. Nach erfolgreichem Transport der aktivierten Fettsäuren in das Mitochondrium erfolgt die β -Oxidation. Hier konnten in der vorliegenden Studie gesteigerte Expressionen der Gene ACADVL und HADHB aufgezeigt werden. Diese codieren für membranständige Proteine, die den ersten bzw. die letzten Schritte der mitochondrialen β -Oxidation katalysieren. Zudem wiesen die Lebern der Sauen gesteigerte mRNA-Konzentrationen von Genen der ω -Hydroxylierung (CYP4A11, CYP4A22 und CYP4A24), welche ebenfalls in den Katabolismus von Fettsäuren involviert sind, auf. Zusammenfassend lassen die Beobachtungen vermuten, dass während der Laktation in der Leber von Sauen eine gesteigerte Verstoffwechselung von NEFA zur Energiegewinnung stattfindet.

Das Carnitin-Shuttle-System und damit die mitochondriale β -Oxidation sind unabdingbar auf das Vorhandensein von Carnitin (L-3-hydroxy-4-*N,N,N*-trimethylaminobutyrat) angewiesen

(McGarry und Brown, 1997). Damit benötigen Gewebe, die Fettsäuren zur Energiegewinnung nutzen, Carnitin. Dessen Bereitstellung kann sowohl durch die Ernährung als auch durch eine endogene Synthese erfolgen (Rebouche und Seim, 1998). Die Ausgangsverbindung für die endogene Synthese des Carnitins stellt das 6-*N*-Trimethyl-Lysin (TML), welches dem Proteinabbau entstammt, dar. Die Untersuchungen der Genexpression im Rahmen der vorliegenden Arbeit ergaben gesteigerte Expressionen der Gene *trimethyllysine hydroxylase*, *epsilon* (TMLHE) und ALDH9A1. Diese vermitteln zunächst die Synthese des γ -Butyrobetain (BB) aus TML (Vaz und Wanders, 2002; Strijbis *et al.*, 2010). Das Endprodukt, das L-Carnitin, wird während der letzten Reaktion der Carnitinsynthese gebildet. Diese wird durch die γ -Butyrobetain-Dioxygenase (BBD/BBOX1) katalysiert (Vaz und Wanders, 2002; Strijbis *et al.*, 2010). Die BBD wies in der Leber laktierender Sauen der vorliegenden Studie ebenfalls eine gesteigerte mRNA-Konzentration auf. Wie aus Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe bekannt, sind signifikante Enzymaktivitäten der BBD beim Schwein nur in der Leber und der Niere vorzufinden (Fischer *et al.*, 2009), wobei die Leber den quantitativ wichtigsten Synthesort des L-Carnitins beim Schwein darstellt. Die intrazelluläre Homöostase und die Verteilung von Carnitin im Körper werden über plasmamembranäre Transporter, die *novel organic cation transporter* (OCTN), realisiert (Vaz und Wanders, 2002). Diese Transporter gehören der *solute carrier family 22A* (SLC22A) an. Der OCTN2 (SLC22A5), welcher eine hohe Bindungsaffinität zum Carnitin aufweist und im Körper ubiquitär exprimiert wird, stellt den wichtigsten Transporter dieser Familie dar (Tamai *et al.*, 1998). In der vorliegenden Arbeit konnte während der Laktation bei Sauen in der Leber eine gesteigerte Expression des SLC22A5, des für den OCTN2 codierenden Gens beobachtet werden (**Studie 2**). Eine große Bedeutung kommt dem OCTN2 vor allem bei der Absorption von Carnitin im Dünndarm, der Verteilung zwischen den Geweben und der renalen Reabsorption zu (Rebouche und Seim, 1998; Lahjouji *et al.*, 2001). Die gesteigerte Expression des OCTN2 in der Leber könnte einer verbesserten Versorgung des Organs mit Carnitin dienen und damit die gesteigerte β -Oxidation sicherstellen.

Interessanterweise wiesen die Sauen in der vorliegenden Studie am Tag 20 der Laktation trotz einer gesteigerten Expression von Genen der Carnitinsynthese verminderte Konzentrationen von L-Carnitin sowohl in der Leber als auch im Plasma auf (**Studie 2**). Die Plasmakonzentrationen an Carnitinstern, welche die Transportform des Carnitins darstellen, waren ebenfalls vermindert (**Studie 2**). Kerner *et al.* (1984) beobachteten im Blut von laktierenden Sauen zum Geburtszeitpunkt verglichen mit nicht laktierenden Tieren gesteigerte Carnitinkonzentrationen vorrangig an freiem Carnitin. Dies lässt eine gesteigerte

Carnitinsynthese bereits während der Trächtigkeit bei Sauen vermuten. Untersuchungen von Ringseis *et al.* (2011) zeigten bei laktierenden Sauen im Vergleich zu nicht laktierenden Sauen am Tag 7 und 17 eine geringfügige, aber nicht signifikante Verminderung der Carnitinkonzentration im Plasma auf, wobei die Reduktion zum späteren Zeitpunkt etwas deutlicher ausfiel. Dies deutet auf eine Reduktion der Carnitinkonzentrationen in Leber und Plasma im Verlauf der Laktation bei der Sau hin. Laktierende Kühe, welche ebenfalls eine gesteigerte Expression von Genen der Carnitinsynthese aufweisen, zeigen zunächst gesteigerte Konzentrationen an Carnitin in der Leber. Allerdings waren, wie auch bei Sauen der vorliegenden Studie zu beobachten, die Konzentrationen zu späteren Zeitpunkten der Laktation sowohl in der Leber als auch im Plasma deutlich verringert (Grum *et al.*, 1996; Schlegel *et al.*, 2012a). Es ist denkbar, dass die bei laktierenden Sauen beobachteten verminderten Konzentrationen an Carnitin in Leber und Plasma (**Studie 1**) durch eine gesteigerte Aufnahme von Carnitin in die Milchdrüse und Inkorporation in das Kolostrum oder die Milch bedingt sind. Kerner *et al.* (1984) beschrieben in diesem Zusammenhang hohe Konzentrationen an Carnitin in Kolostrum und Milch von Sauen. Untersuchungen an Mäusen zeigten gesteigerte Expressionen der für die OCTN codierenden Gene in der Milchdrüse während der Laktation (Lamhonwah *et al.*, 2011). Dies deutet ebenfalls eine gesteigerte Aufnahme von Carnitin in die Milchdrüse an. Denkbar ist, dass somit die Versorgung der Ferkel mit Carnitin zur Sicherstellung einer schnellen postnatalen Steigerung der β -Oxidation über die Milch gewährleistet wird, da Ferkel zum Zeitpunkt der Geburt einen ungünstigen Carnitinstatus aufweisen (Kerner *et al.*, 1984; Penn *et al.*, 1997; Heo *et al.*, 2000; Fischer *et al.*, 2009). Die Reduktion der Carnitinkonzentration in der Leber deutet jedoch darauf hin, dass die im Rahmen der vorliegenden Arbeit zu beobachtende Steigerung der Carnitinsynthese in der Leber nicht ausreicht, um entsprechende Verluste über die Milch komplett auszugleichen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie deuten des Weiteren eine deutlich gesteigerte Ketogenese während der Laktation an (**Studie 2**). Dies kann aufgrund der gesteigerten Expression der HMGCS2 vermutet werden (**Studie 2**). Zudem war eine gesteigerte Expression des FGF21 in der Leber laktierender Sauen zu beobachten. Der FGF21 ist ein hormoneller Faktor, welcher einen stimulierenden Effekt auf die Ketogenese ausübt. Damit hat er eine große Bedeutung für die Bereitstellung von energetischen Substraten während kataboler Stoffwechsellagen (Badman *et al.*, 2007). Interessanterweise waren in der vorliegenden Arbeit bei laktierenden Sauen im Vergleich zu nicht laktierenden Kontrolltieren trotz einer gesteigerten Expression der HMGCS2 und des FGF21 verminderte

Konzentrationen an Ketonkörpern im Plasma zu beobachten (**Studie 1**). Ketonkörper stellen für den Citratzyklus verwertbare Substrate dar. Damit könnten während des katabolen Status Ketonkörper als Energiequelle für periphere Organe dienen und folglich trotz der gesteigten Expression von Genen der Ketogenese in der Leber die verminderten Konzentrationen an Ketonkörpern im Plasma bedingen. Die in der vorliegenden Arbeit beobachteten Ketonkörperkonzentrationen im Plasma waren vergleichbar mit von Revell *et al.* (1998) beschriebenen Konzentrationen bei laktierenden Sauen. In beiden Studien gaben diese keine Hinweise auf das Bestehen einer Ketose (**Studie 1**). Damit entwickeln Sauen während der Laktation keine Ketose, wie sie häufig bei Kühen nach dem Kalben beobachtet wird (Goff und Horst, 1997; Duffield, 2000; van Dorland *et al.*, 2009).

Neben den in der vorliegenden Studie beobachteten gesteigten Expressionen von PPAR α -Zielgenen in der Leber von laktierenden Sauen existieren bereits Untersuchungen bezüglich einer Induktion des PPAR α in der Skelettmuskulatur und dem Fettgewebe. In der Skelettmuskulatur konnten während der Laktation gesteigerte Expressionen von Genen des Katabolismus von Fettsäuren bei Sauen beobachtet werden (Ringseis *et al.*, 2011). Dies deutet auch in der Muskulatur eine gesteigerte Energieproduktion aus der Metabolisierung von Fettsäuren während der Laktation an. Daneben zeigten die Ergebnisse von Ringseis *et al.* (2011) in der frühen postpartalen Phase eine verminderte Expression von Genen der Fettsäureoxidation im Fettgewebe. Dies könnte der Einsparung von Energie und Fettsäuren für die Milchsynthese dienen. Eine gesteigerte Aufnahme der vom Fettgewebe mobilisierten Fettsäuren durch die Milchdrüse deuten die gesteigten Expressionen der Gene der Lipoproteinlipase und der *fatty acid translocase*, dem bedeutendsten Fettsäuretransporter in der Milchdrüse während der Laktation an (Ringseis *et al.*, 2011). Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit beobachtete Reduktion der TAG im Plasma laktierender Sauen kann somit durch eine erhöhte Aufnahme von NEFA aus TAG-reichen Lipoproteinen aus dem Blut, welche anschließend im Rahmen der β -Oxidation in Leber (**Studie 1 und 2**) und Skelettmuskulatur (Ringseis *et al.*, 2011) metabolisiert werden, bedingt sein (**Studie 1**).

Ebenso wie bei laktierenden Sauen dieser Studie geht auch die Laktation bei Kühen mit gesteigten Expressionen von PPAR α -Zielgenen des Fettsäuretransports, der -aktivierung, der peroxisomalen und mitochondrialen β -Oxidation, der Carnitinsynthese und des Carnitintransports als auch der Ketogenese in der Leber einher. Damit zeichnen sich für Sauen und Kühe vergleichbare adaptive Mechanismen der Genexpression in der Leber während der Laktation ab (Loor *et al.*, 2005, 2006; McCarthy *et al.*, 2010; Schlegel *et al.*, 2012a, b).

Im Kontrast zu Sauen und Kühen zeigen Nager während der Laktation eine Hemmung des PPAR α in Leber, Skelettmuskulatur und braunem Fettgewebe (Pedraza *et al.*, 2000, 2001; Gutgesell *et al.*, 2009a, b). Die verminderte Aktivierung des PPAR α wird beim Nager anhand reduzierter mRNA-Konzentrationen des *uncoupling proteins 3* in der Skelettmuskulatur und dem braunen Fettgewebe von laktierenden Mäusen deutlich (Pedraza *et al.*, 2000, 2001). Des Weiteren weisen laktierende Mäuse eine verminderte Expression von Genen der Aufnahme, des Transports und der β -Oxidation von Fettsäuren in der Skelettmuskulatur auf (Xiao *et al.*, 2004; Gutgesell *et al.*, 2009b). Die verminderte Expression des PPAR α in Leber und Muskel könnte dem Nager zur Einsparung von Fettsäuren und Energie für die TAG-Synthese in der Milchdrüse dienen (Trayhurn *et al.*, 1982; Pedraza *et al.*, 2000, 2001; Gutgesell *et al.*, 2009b). Ratten zeigen während der gesamten Laktation verminderte Konzentrationen an Carnitin in Leber und Plasma. Diese Beobachtung könnte einer reduzierten Eigensynthese entsprechen, welche aus der verminderten Expression des PPAR α und damit von Genen der Carnitinsynthese beim Nager resultieren könnte (Gutgesell *et al.*, 2009a). Allerdings scheint bei Ratten die PPAR α -vermittelte Regulation der Expression von Genen der Carnitinsynthese von untergeordneter Bedeutung zu sein (Ringseis *et al.*, 2012). Dies lässt sich aufgrund des fehlenden Anstiegs der Transkriptkonzentrationen der Gene ALDH9A1 und BBOX1 nach Fibrat-induzierter PPAR α -Aktivierung schlussfolgern (Luci *et al.*, 2006; Ringseis *et al.*, 2007).

Zusammenfassend kann bei laktierenden Sauen aufgrund der gesteigerten Expression einer Vielzahl von PPAR α -Zielgenen auf eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors während der Laktation in der Leber geschlossen werden. Dies lässt sich anhand gesteigerter Expressionen von Genen der Carnitinsynthese, des Carnitrintransports, des Fettsäuretransports, der Fettsäureaktivierung, des Carnitin-Shuttle-Systems, der peroxisomalen und mitochondrialen β -Oxidation und der Ketogenese vermuten (**Studie 1 und 2**). Die gesteigerte β -Oxidation dient dabei vermutlich vorrangig der Gewinnung von Energie für metabolische Prozesse der Leber. Energieeinsparende Effekte zugunsten der Substratbereitstellung in der Milchdrüse können bei laktierenden Sauen in der frühen Laktation durch verminderte Expressionen von Genen der β -Oxidation im Fettgewebe vermutet werden (Ringseis *et al.*, 2011).

4.1.2 Veränderungen der Expression von Genen des Kohlenhydratstoffwechsels

Die vorliegende Studie zeigte des Weiteren Veränderungen im Kohlenhydratstoffwechsel in der Leber von Sauen während der Laktation auf. Genexpressionsanalysen ergaben eine signifikant gesteigerte Expression von Genen der Glukoneogenese, Glykolyse und des Pyruvatmetabolismus. Eine gesteigerte Expression der Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und der Glukose-6-Phosphat-Isomerase (GPI) deuten ein vermehrtes Ablaufen der Glykolyse während der Laktation an. Allerdings fungiert die GPI ebenfalls als Enzym der Glukoneogenese, weshalb dies bei einer gleichzeitig gesteigerten Expression der Pyruvatcarboxylase (PC) zusätzlich Hinweis auf eine vermehrt ablaufende Glukoneogenese gibt. Glukose gilt als Grundbaustein von Laktose als wichtiges Substrat für die Milchsynthese. Demzufolge scheint eine Steigerung der Glukoneogenese als potentieller Mechanismus zur Bereitstellung von Glukose für die Milchsynthese sinnvoll (Bauman und Currie, 1980; Bell und Bauman, 1997). Von Milchkühen und laktierenden Nagern ist bekannt, dass die Laktation mit einer gesteigerten Expression von Glukosetransportern in der Milchdrüse einhergeht (Burnol *et al.*, 1990; Shennan und Peaker, 2000; Mattmiller *et al.*, 2011). Zudem konnten bei laktierenden Kühen Proteine von Enzymen der Laktosesynthese in der Milchdrüse nachgewiesen werden (Rawson *et al.*, 2012). Die im Rahmen der vorliegenden Studie beobachtete gesteigerte Expression des insulinunabhängigen Glukosetransporters 2 (GLUT2/SLC2A2) (**Studie 1**) in der Leber laktierender Sauen deutet einen erhöhten Transport von Glukose an. Dies könnte einen potentiellen Mechanismus zur Sicherstellung der Glukosebereitstellung für die Milchdrüse und damit einer adäquaten Milchsynthese unabhängig von einer bestehenden Insulinresistenz darstellen (Père und Etienne, 2007). Die in der Literatur beschriebenen Veränderungen des Glukosestoffwechsels in der Leber laktierender Kühe liefern ebenfalls keine einheitlichen Ergebnisse. Untersuchungen bezüglich der Veränderungen der Genexpression ließen sowohl gesteigerte als auch verminderte Expressionen glukoneogenetischer Gene erkennen (Greenfield *et al.*, 2000; Loor *et al.*, 2006, 2007; van Dorland *et al.*, 2009). Die Arbeitsgruppe Greenfield *et al.* (2000) beschrieb eine in der Leber von Kühen in der Übergangsphase von der Gestation zur Laktation gesteigerte Expression der PC. Die Expression der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEPCK) war erst in späteren Phasen der Laktation gesteigert (Greenfield *et al.*, 2000). Eine ebenfalls erhöhte Expression von glukoneogenetischen Genen, speziell der PEPCK, zeigten Ergebnisse einer Studie von van Dorland *et al.* (2009), wobei hier keine Änderungen der Genexpression der PC zu beobachten waren. Loor *et al.* (2006) demonstrierten Veränderungen der Genexpression der PC in Abhängigkeit von der Fütterung.

Während der gesamten reproduktiven Periode restriktiv gefütterte Tiere zeigten eine stärkere Induktion der Genexpression der PC-mRNA verglichen mit *ad libitum* gefütterten Tieren. Dies könnte der Adaptation an einen gesteigerten Glukosebedarf zur Erhaltung der Blutglukose-Konzentration dienen (Loor *et al.*, 2006). Laktierende Kühe mit induzierter Ketose zeigten unter Verwendung der realtime RT-PCR-Methode eine verminderte Expression der PEPCK in der Leber (Loor *et al.*, 2007). Allerdings war simultan eine gesteigerte Expression der Fruktose-1,6-Bisphosphatase 1 (FBP1) zu erkennen. Kühe mit nur geringfügig während der Laktation gesteigerten β -Hydroxybutyrat-Konzentrationen im Plasma ließen hingegen keine Veränderungen der Expression von in die Glukoneogenese involvierten Genen erkennen (van Dorland *et al.*, 2009). Somit deuten sich bei laktierenden Sauen und Kühen vergleichbare Veränderungen des Kohlenhydratstoffwechsels während der Laktation an. Untersuchungen auf Proteinebene lassen aufgrund gesteigerter Proteinkonzentrationen der PEPCK, PC und FBP1 eine deutlich erhöhte Rate der Glukoneogenese in der Leber laktierender Kühe vermuten (Rawson *et al.*, 2012). Dies deutet ebenfalls die gesteigerte Aktivität der PC in der Leber von Kühen in der peripartalen Phase an (Greenfield *et al.*, 2000). Aufgrund der in den Lebern von laktierenden Ratten und Kühen zu beobachtenden gesteigerten Aufnahmekapazität bzw. Retention glukoneogenetischer Substrate kann eine bedeutende Rolle der Glukoneogenese in der Leber während der Laktation vermutet werden (Casado *et al.*, 1987; Reynolds *et al.*, 2003). Die gesteigerte β -Oxidation und eine damit im Rahmen der Atmungskette vermehrte Synthese von ATP könnten der Energiebereitstellung für eine bei der Sau gesteigerte Glukoneogenese während der Laktation dienen. Zudem waren während der Laktation in der Leber von Sauen der vorliegenden Arbeit Veränderungen im Pyruvatmetabolismus zu erkennen. Diese lassen sich aufgrund einer gesteigerten Expression der für die Pyruvat-Dehydrogenase alpha (PDHA) und Pyruvat-Dehydrogenase beta (PDHB) codierenden Gene, welche den Abbau von Pyruvat zu Acetyl-CoA katalysieren, vermuten. Ein vermehrter Abbau dieser Verbindung deutet darauf hin, dass Pyruvat zur Energiegewinnung verstoffwechselt wird, da Acetyl-CoA nicht als glukoneogenetisches Substrat dienen kann.

4.1.3 Veränderungen der Expression von Genen des Aminosäurestoffwechsels

Aminosäuren und Proteine werden während der Laktation neben dem Futter auch aus dem Katabolismus von Muskelgewebe zur Verfügung gestellt (Clowes *et al.*, 2003, 2005). Zu den möglichen Faktoren, welche das Ausmaß dieser Degradation beeinflussen, zählen unter

anderem die Körperzusammensetzung, die Wurfgröße und der Proteingehalt der Ration. Schlanke Tiere, wie in der modernen Züchtung bevorzugt, mobilisieren prozentual mehr Körperprotein als Körperfett (Sauber *et al.*, 1998). Des Weiteren resultiert mit einer zunehmenden Wurfgröße eine gesteigerte Mobilisierung von Proteinen aus dem Schlachtkörper, dem Reproduktionstrakt, dem GIT und der Leber (Kim und Easter, 2001). Geringe Proteingehalte in der Ration zeigen ebenfalls einen negativen Einfluss auf die Proteingehalte des Schlachtkörpers und der inneren Organe, wie Leber und Herz (Brendemuhl *et al.*, 1989; Clowes *et al.*, 2003). Aminosäuren dienen dem Hepatozyten in Abhängigkeit der Stoffwechsellaage unter anderem als Energiequelle, als glukoneogenetische Substrate und zur Synthese von Proteinen. Des Weiteren stellen sie wichtige Präkursoren für die Milchproteinsynthese beim laktierenden Organismus dar. Dies wird anhand der Aufnahme von Aminosäuren durch die Milchdrüse deutlich (Spencer *et al.*, 1968; Shennan und Peaker, 2000). Im Rahmen dieser Arbeit konnten unter Einsatz der *microarray*-Technologie signifikante Veränderungen der Genexpression einer Reihe von Genen des Aminosäure-Metabolismus aufgezeigt werden. Dabei waren gesteigerte Expressionen der Phosphoglycerat-Dehydrogenase (PHGDH) und der Phosphoserin-Phosphatase (PSPH), Genen des Serin-Metabolismus, zu beobachten. Dies wurde auch aus signifikant regulierten biologischen Prozessen und Signalwegen deutlich, welche aus der Auswertung der GeneChip Analyse mittels DAVID-*tool* hervorgingen. Serin stellt eine proteinogene Aminosäure mit mannigfaltigen Funktionen im Stoffwechsel dar. Als Bestandteil von Phosphatidylserin ist sie am Aufbau von Zellmembranen und der intrazellulären Signaltransduktion beteiligt und hat über die Bildung O-glykosidischer Bindungen in Glykoproteinen der Plasmamembran eine wichtige Bedeutung für die interzelluläre Kommunikation. Des Weiteren ist Serin durch die Übertragung von Phosphatgruppen an die OH-Gruppe des Serins innerhalb von Peptidketten an Interkonvertierungsprozessen von Enzymen beteiligt. Durch die Bereitstellung von C1-Resten ist es ebenfalls in den Tetrahydrofolsäure-Stoffwechsel involviert und liefert daneben Bausteine für die Synthese von Purinen, Bausteinen der DNA und RNA. Des Weiteren konnten im Zuge der Auswertung der GeneChip Analyse mittels DAVID neben dem Serin-Metabolismus eine signifikant gesteigerte Expression von Genen des Glycin- und Threonin-Metabolismus beobachtet werden. Dabei war unter anderem eine gesteigerte Genexpression des in den Glycin-Katabolismus involvierten GCSH zu beobachten. Diese Aminosäuren gehören der Gruppe der glukoplastischen Aminosäuren an und können über ihr gemeinsames Abbauprodukt Pyruvat der Glukoneogenese dienen. Damit ist es denkbar, dass eine Metabolisierung von Aminosäuren im Rahmen der Glukoneogenese während der

Laktation bei der Sau der Bereitstellung von Glukose für den Organismus bzw. die Milchsynthese dient. Eine verminderte Expression der Alanin-Aminotransferase (ALT/GPT) in den Lebern der laktierenden Sauen der vorliegenden Studie lässt darüber hinaus vermuten, dass Alanin nicht als glukoneogenetisches Substrat während der Laktation fungiert. Aus der verminderten Expression der ALT könnte eine Konservierung und Bereitstellung von Alanin für die Milchsynthese resultieren. In der Literatur gibt es Hinweise auf eine zum Höhepunkt der Laktation gesteigerte Expression des Alanin/Serin/Cystein/Threonin Transporter 1 bei der Sau (Laspiur *et al.*, 2009). Dies könnte einen Anstieg der Aufnahme der spezifisch von diesem Transporter transportierten Aminosäuren in die Milchdrüse bedingen. Die in der vorliegenden Arbeit während der Laktation bei Sauen beobachteten Veränderungen im Metabolismus von Serin, Glycin und Threonin als auch der Hinweis auf eine Konservierung von Alanin könnten entsprechend ebenfalls auf eine Ausrichtung des Metabolismus zugunsten der Milchsynthese hindeuten. Weiterhin gaben die Untersuchungen Hinweise auf einen, wie bei laktierenden Kühen beobachtet, verstärkten Abbau von verzweigtkettigen Aminosäuren in der Leber (*branched chain amino acids/BCAA*) (**Studie 1**; McCarthy *et al.*; 2010). Dies lässt sich aufgrund der gesteigerten Expression der ACADSB, ACAD8 und HIBCH vermuten (**Studie 1**). Der Abbau der BCAAs Leucin und Isoleucin kann dabei über Acetyl-CoA in die Synthese von Ketonkörpern münden. Isoleucin dient daneben wie Valin als Substrat für den Citratzyklus, in welchen beide Aminosäuren über eine Umwandlung zu Succinyl-CoA eingeschleust werden.

Zusammenfassend ist zu vermuten, dass der Stoffwechsel der Aminosäuren während der Laktation in der Leber von Sauen zugunsten der Energiebereitstellung für metabolische Prozesse ausgerichtet ist. Des Weiteren scheint eine Bereitstellung von Substraten für eine gesteigerte Synthese von Glukose als auch die Einsparung von Alanin als Substrat für die Milchsynthese denkbar.

4.1.4 Veränderungen der Expression von Genen des Citratzyklus und der Atmungskette

Die in der vorliegenden Studie zu beobachtenden signifikant gesteigerten Expressionen von Genen des Citratzyklus und der Atmungskette deuten neben der gesteigerten β -Oxidation von Fettsäuren ebenfalls auf eine während der Laktation bei der Sau gesteigerte Energieproduktion in der Leber hin. Die Aktivität der Enzyme IDH1 und SDHA, deren Expressionen während der Laktation bei der Sau erhöht waren (**Studie 1**), sind mit einer

gesteigerten Synthese der Reduktionsäquivalente NADH/H^+ und FADH_2 assoziiert. Diese dienen im Rahmen der Atmungskette der Synthese von ATP. Die dieser Arbeit zugrundeliegende Studie zeigte zudem eine gesteigerte Expression des CYCS in den Lebern von Sauen während der Laktation. Dieses Gen codiert für ein Elektronentransportprotein, welches im Rahmen der Atmungskette wirksam ist. Mehr als 70% der Gene, welche das DAVID-tool jeweils den molekularen Funktionen *coenzyme binding*, *cofactor binding*, *FAD binding* und *electron carrier activity* zuordnete, waren ebenfalls in ihrer Expression gesteigert. Dies liefert zusätzliche Hinweise auf ein vermehrtes Ablaufen des Citratzyklus und der Atmungskette. Des Weiteren könnten Substrate aus dem Abbau von Fettsäuren, Aminosäuren und Pyruvat in den Citratzyklus eingeschleust werden, welche folgend ebenfalls der Energiegewinnung dienen.

Zusammenfassend deuten die Veränderungen der Genexpressionen auf eine Umschaltung des Metabolismus in der Leber zugunsten der Bereitstellung von Energie und Substraten hin. Die gesteigerten Expressionen von Genen des Fettsäurekatabolismus, Aminosäurenmetabolismus, Pyruvatmetabolismus und Citratzyklus geben Hinweis auf energiegenerierende Prozesse. Die auf diesem Weg gebildeten Reduktionsäquivalente können folgend im Rahmen der Atmungskette zu ATP umgesetzt werden. Die hier beobachteten Veränderungen der Genexpression lassen nur bedingt Aussagen über eine Ausrichtung des Kohlenhydratstoffwechsels in Richtung Glykolyse bzw. Glukoneogenese zu. Eine gesteigerte Glykolyse könnte ebenfalls der Energiebereitstellung während der Laktation dienen. Eine gesteigerte Glukoneogenese hingegen könnte physiologischer Weise der Bereitstellung von Glukose für die Milchsäure dienen. Die Metabolisierung glukogener Aminosäuren deutet eine Umstellung in Richtung Glukoneogenese an. Untersuchungen bezüglich Veränderungen von Enzymkonzentrationen und Enzymaktivitäten könnten genauere Hinweise über das tatsächliche Wirksamwerden der auf Ebene der Genexpression gewonnenen Erkenntnisse liefern.

4.2 Veränderungen des Abwehrsystems während der Laktation bei der Sau

Interessanterweise konnten im Rahmen dieser Arbeit neben den umfassenden Veränderungen im Intermediärstoffwechsel auch Veränderungen inflammatorischer und immunologischer Faktoren in der Leber laktierender Sauen beobachtet werden. Lebergewebe besteht neben den Hepatozyten, die den Hauptbestandteil des Gewebes ausmachen, ebenfalls aus den in der

Leber residierenden Makrophagen, den sogenannten Kupffer-Zellen, und infiltrierten Immunzellen. Diese Zelltypen haben eine große Bedeutung sowohl für die Vermittlung inflammatorischer Prozesse als auch die Immunantwort, indem sie auf inflammatorische Stimuli und eine sich ändernde zelluläre Umgebung reagieren. Folgend beziehen sich die in der vorliegenden Studie durchgeführten Untersuchungen bezüglich Veränderungen der Genexpression des gesamten Lebergewebes auf sämtliche hier enthaltene Zelltypen und lassen eine zelltypspezifische Zuordnung nur bedingt zu.

4.2.1 Veränderungen der Expression von Genen immunregulatorischer Moleküle des angeborenen Immunsystems

Das Immunsystem kann prinzipiell in zwei große Kategorien unterteilt werden: das angeborene (unspezifische) Immunsystem und das adaptive (erworbene) Immunsystem. Das angeborene, auch als unspezifisches Immunsystem bezeichnet, stellt dabei die erste Abwehr gegen Pathogene dar und kann umgehend nach einer Infektion aktiviert werden. Ein wichtiger Mechanismus der angeborenen Immunität stellt die APR dar. Der APR-Signalweg ist das schnelle Wirksamwerden von verschiedenen oftmals glykosylierten Plasmaproteinen, um Gewebeschädigungen vorzubeugen und Reparaturmechanismen zu aktivieren. Zu den Akute-Phase-Proteinen zählen dabei alle Serumproteine, deren Plasmakonzentrationen sich infolge von Infektionen, Inflammationen oder Traumata um 25% reduzieren (negative APP) oder steigern (positive APP) (Kushner, 1982; Baumann und Gauldie, 1994; Gruys *et al.*, 2005). Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass die Laktation bei der Sau mit einer 2- bis 9-fach gesteigerten Expression der Gene der positiven APP: CRP, LBP, HP, FGG, DEFB1 und CFB in der Leber einhergeht. Dabei konnten ebenfalls gesteigerte Plasmakonzentrationen des HP (nicht veröffentlichte Ergebnisse) beobachtet werden, welche positiv mit den gesteigerten Transkriptkonzentrationen korrelierten (**Studie 1 und 3**). APP dienen in der Veterinärmedizin als anerkannte diagnostische Marker für eine existierende Inflammation (Petersen *et al.*, 2004). Das Ausmaß des Krankheitsgeschehens steht dabei in direktem Zusammenhang mit den Plasmakonzentrationen an APP. Während einer akuten Inflammation können die Plasmakonzentrationen der APP beträchtlich ansteigen. FGG und HP können um das 4-fache und das CRP bis auf das mehr als 100-fache erhöht sein (Kushner, 1982). Die Genexpressionsanalysen deuten somit auf einen moderaten Entzündungsprozess während der Laktation hin. Als Masterregulator inflammatorischer Zustände erlangt der Transkriptionsfaktor *Nuclear Factor kappaB* (NF-κB) eine große Bedeutung. Bei Mensch,

Ratte und Maus ist der NF- κ B in die Regulation der Genexpression von APP involviert (Nonaka und Huang, 1990; Schumann, 1995; Zhang *et al.*, 1995; Huang *et al.*, 2002; Agrawal *et al.*, 2003a, b; Albrecht *et al.*, 2007; Uskokovic *et al.*, 2012). Der NF- κ B stellt einen ubiquitär vorkommenden nuklearen Transkriptionsfaktor dar, welcher aufgrund seiner schnellen Aktivierung durch eine Vielzahl pathogener Stimuli eine ausschlaggebende Bedeutung für Zellen des Immunsystems hat (Baeuerle und Henkel, 1994). In seiner inaktiven Form liegt der NF- κ B als Heterodimer gebunden an sein Inhibitormolekül *inhibitor- κ B* (I κ B) im Zytoplasma der Zelle vor. Nach Phosphorylierung, Ubiquitinierung und Proteolyse des I κ B, welcher somit vom NF- κ B dissoziiert, wird der Transkriptionsfaktor aktiviert und wandert in den Nukleus. Hier reguliert der NF- κ B durch die Bindung an κ B-sites in der Promotorregion von Zielgenen die Expression einer Vielzahl von Genen, wozu unter anderem inflammatorische Zytokine, Chemokine, Immunrezeptoren und APP zählen (Baeuerle und Henkel, 1994; Barnes, 1997; Pahl, 1999). Die APR wird von Zytokinen vermittelt. Diese dienen als Mediatoren zwischen dem betroffenen Gewebe und dem Hepatozyten, dem Hauptsyntheseort der APP (Gruys *et al.*, 2005). Das Interleukin-1, Interleukin-6 und der *tumor necrosis factor α* (TNF α), ebenfalls NF- κ B-Zielgene (Collart *et al.*, 1990; Libermann und Baltimore, 1990; Shimizu *et al.*, 1990; Cogswell *et al.*, 1994), stellen für die Vermittlung der APR bedeutende Zytokine dar. Diese werden über verschiedene Rezeptoren in der Hepatozytenmembran wirksam und induzieren die Synthese der APP (Suffredini *et al.*, 1999). Es ist bekannt, dass die während der Laktation bei Sauen in der vorliegenden Studie in ihrer Genexpression gesteigerten APP antiinflammatorische, antioxidative, bakteriostatische und immunregulatorische Effekte vermitteln. Diese Mechanismen werden insbesondere durch eine Verstärkung der Zytokinantwort, die Aktivierung des Komplementsystems, die Bindung von Hämoglobin und durch die Rekrutierung von Immunzellen realisiert. Daneben sind das Erkennen, Binden und der Transport von bakteriellen Zellwandkomponenten, die Steigerung der Phagozytoseaktivität und die Regulation von B-Zell-Proliferation und Chemotaxis von Makrophagen bedeutende Effektormechanismen (Bianco *et al.*, 1979; Peters *et al.*, 1988; Schumann *et al.*, 1990; Black *et al.*, 2004; Theilgaard-Mönch *et al.*, 2006; Menendez und Finlay, 2007).

In der Literatur wurden bereits gesteigerte Plasma- bzw. Serumkonzentrationen an APP bei laktierenden Sauen dargelegt (Sorrells *et al.*, 2007; Hiss-Pesch *et al.*, 2011). Dem postpartalen Konzentrationsanstieg der APP im Serum folgte bis zum Tag 28 der Laktation eine Reduktion der Plasmakonzentrationen. Diese waren vergleichbar mit den zum Zeitpunkt präpartum beobachteten Konzentrationen an APP (Hiss-Pesch *et al.*, 2011). Die höchsten

Serumkonzentrationen an APP werden unabhängig von der Parität am Tag 7 der Laktation beschrieben (Verheyen *et al.*, 2006, Hiss-Pesch *et al.*, 2011). Untersuchungen von Sorrells *et al.* (2007) lassen zudem einen positiven Zusammenhang zwischen einer gesteigerten Expression von Zytokinen in mononuklearen Zellen des Blutes mit den Plasmakonzentrationen von APP erkennen. Eine mögliche Ursache für die während der frühen Laktation in der Leber gesteigerte APP-Synthese könnten unter anderem aus dem Geburtsvorgang resultierende Gewebeschädigungen und inflammatorische Zustände sein, welche mit einer gesteigerten Expression von proinflammatorischen Zytokinen einhergehen (Verheyen *et al.*, 2006; Wathes *et al.*, 2007). Die in der vorliegenden Studie zu beobachtenden gesteigerten Expressionen an APP in der Leber korrelierten positiv mit den gesteigerten Plasmakonzentrationen an NEFA. Dies konnte ebenfalls bei laktierenden Kühen aufgezeigt werden (Loor *et al.*, 2005, 2007; Gessner *et al.*, 2013; Trevisi *et al.*, 2012). Es kann vermutet werden, dass, wie bereits in der Literatur beschrieben, NEFA auch während der Laktation Risikofaktoren für die Entwicklung bzw. für das Voranschreiten inflammatorischer Zustände darstellen (Tripathy *et al.*, 2003; Boden, 2006; Zhang *et al.*, 2006). Zudem ist bekannt, dass die APR mit einem gesteigerten Abbau von Muskelprotein einhergeht (Reeds *et al.*, 1994). Die Laktation ist ebenfalls mit einer Degradation von Muskelgewebe verbunden (Clowes *et al.*, 2005). Es ist damit denkbar, dass die bei den Sauen der vorliegenden Arbeit gesteigerte Expression von APP auch einen Beitrag zur laktationsbedingten Muskeldegradation leistet. Des Weiteren zeigten sich im Rahmen der vorliegenden Arbeit Veränderungen des Glycin-, Serin- und Threonin-Metabolismus in der Leber von laktierenden Sauen (**Studie 1**). Aminosäuren haben eine große Bedeutung für die APP-Synthese (Grimble, 1990) und stellen zudem wichtige Substrate für die Milchsynthese dar (Spencer *et al.*, 1969). Damit ist zu vermuten, dass eine gesteigerte APP-Synthese in der Leber laktierender Sauen in einem negativen Zusammenhang mit der Milchsyntheseleistung steht. Eine zusätzliche Aktivierung des Immunsystems kann nach Injektion von Lipopolysacchariden sowohl bei laktierenden Sauen als auch bei Milchkühen beobachtet werden. Dies wurde anhand einer gesteigerten Expression von APP in der Leber von Milchkühen (Jiang *et al.*, 2008; Vels *et al.*, 2009) und gesteigerten Plasmakonzentrationen an APP bei laktierenden Kühen und Sauen deutlich (Sauber *et al.*, 1999; Vels *et al.*, 2009). Gleichzeitig waren eine Reduktion der Milchmenge bei Kühen und Sauen und verminderte Wurfzunahmen bei Sauen zu verzeichnen (Sauber *et al.*, 1999; Vels *et al.*, 2009). Die reduzierten Milchmengen könnten dabei durch die gesteigerte Synthese von positiven APP und der damit reduzierten Verfügbarkeit von Aminosäuren für die Synthese von Milchproteinen verbunden sein.

4.2.2 *Veränderungen der Expression von Genen immunregulatorischer Moleküle des adaptiven Immunsystems*

Neben dem angeborenen Immunsystem existiert das adaptive Immunsystem, das dem Organismus die Abwehr gegen spezifische Pathogene ermöglicht. Die adaptive Immunantwort ist antigenspezifisch und setzt das selektive Erkennen von fremdem Antigen voraus, was durch den Prozess der Antigenpräsentation realisiert wird. In der vorliegenden Studie konnten interessanter Weise mittels *microarray*-Technologie verminderte Expressionen der für den *major histocompatibility complex* (MHC) II und den TRAC (T-Zell-Rezeptor, TCR) codierenden Gene in der Leber von laktierenden Sauen beobachtet werden. Diese auf der B-Zelloberfläche bzw. auf der T-Zelloberfläche lokalisierten Oberflächenrezeptoren sind von entscheidender Bedeutung für die humorale Immunantwort (**Studie 1**). Sie vermitteln den Kontakt zwischen diesen Zelltypen. Die aktivierte B-Zelle präsentiert mit Hilfe der MHC-II-Moleküle Antigenfragmente auf ihrer Oberfläche. Diese Antigene erkennt die T-Zelle, speziell der T-Helfer-Zelle (CD4+) mittels des auf ihrer Oberfläche lokalisierten TCR. Die aktivierte CD4+-Zelle ist nun in der Lage, kaskadenartig Zytokine freizusetzen, welche die endgültige Aktivierung der B-Zelle und deren Reifung zur Antikörper-produzierenden Plasmazelle nach sich zieht. Kühe mit einer stark negativen Energiebilanz zeigten während der Laktation ebenfalls eine überwiegend verminderte Expression von Genen der Antigen-Antikörper-Reaktion in der Leber (Loor *et al.*, 2007). Eine reduzierte Expression von MHC-II-Molekülen und der TCR (**Studie 1**) könnte eine verminderte Interaktion von B- und T-Zellen nach sich ziehen. Die unzureichende Aktivierung der B-Zellen würde folglich die Bildung von Antikörpern gegen originäre Antigene verringern.

Des Weiteren zeigten die Ergebnisse der vorliegenden Studie in der Leber von laktierenden Sauen eine verminderte Expression des CD8a, ein von den zytotoxischen T-Zellen (CD8+) exprimiertes Oberflächenmolekül (**Studie 1**). CD8+-Zellen sind in die zelluläre Immunantwort involviert. Sie sind in der Lage Pathogene, wie Viren und intrazytoplasmatische Bakterien, welche im Zytosol von antigen-präsentierenden Zellen zu kurzen Peptiden prozessiert wurden und gebunden an das MHC-I-Molekül präsentiert werden, durch Lyse oder Apoptose der Zelle zu beseitigen (Berke, 1995). Dies erfolgt nach Interaktion mit ihren TCR, welche spezifisch für pathogene Antigene sind (Harty *et al.*, 2000). Eine verminderte Expression des CD8a und des TCR lassen eine verminderte

Wirksamkeit dieser Effektormechanismen und damit eine reduzierte Immunfunktion in der Leber von Sauen während der Laktation vermuten.

In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass Sauen im Verlauf ihrer Reproduktionsphase während der Laktation im Vergleich zur späten Gestation bzw. zum Geburtszeitpunkt eine verschlechterte Immunantwort aufweisen (Mitre *et al.*, 2005; Farmer *et al.*, 2010). Dies wurde aufgrund einer reduzierten Antikörperreaktion, einer verminderten Lymphozytenproliferation und einer Abnahme der Sekretion von Interferon γ durch Lymphozyten *in vitro* deutlich. In der späteren Phase der Laktation konnte *in vitro* eine Verbesserung des Immunstatus beobachtet werden (Farmer *et al.*, 2010). Bei Milchkühen waren nach dem Kalben im Blut signifikant verminderte B-Zellen und MHC-II-positive Populationen zu verzeichnen (Van Kampen und Mallard, 1997). Im Vergleich zu nicht laktierenden Kontrolltieren deutete sich eine Verminderung von MHC-II Molekülen drei Wochen postpartum an (Van Kampen und Mallard, 1997). Laktierende Kühe mit stark negativer Energiebilanz zeigten darüber hinaus eine verminderte Anzahl an weißen Blutzellen, wobei auch selektiv die Lymphozytenzahl gesenkt war (Morris *et al.*, 2009). Sowohl die bei Sauen beeinträchtigte Antigen-Antikörper-Reaktion als auch die bei Milchkühen beobachtete verminderte Zahl an Immunzellen im Blut deuten eine Suppression des adaptiven Immunsystems an. Eine gesteigerte Infiltration von Immunzellen in den reproduktiven Trakt könnte dies bedingen (Gunnink, 1984, Jiwakanon *et al.*, 2006). Ein suppressiver Effekt auf das Immunsystem während der Laktation kann zudem aufgrund von Genexpressionsanalysen in der Milz laktierender Kühe vermutet werden. Die Milz ist als sekundär lymphatisches Organ von großer Bedeutung für die antigeninduzierte Differenzierung und Vermehrung von Lymphozyten, die Formation von Antikörpern und den Abbau ausgedienter roter Blutzellen (Mebius und Kraal, 2005). Morris *et al.* (2009) vermuten aufgrund einer verminderten Expression von Interleukin-15, einem Zytokin, welches wie auch Interleukin-2 ein potenter Stimulator der Proliferation von inflammatorischen T-Zellen, T-Helferzellen, zytotoxischen T-Zellen und natürlichen Killerzellen ist, eine zytokinvermittelte Immunsuppression in diesem Organ während der Laktation. Untersuchungen von Knochenmark, Thymus und Darmgewebe beim laktierenden Nager geben ebenfalls Hinweise auf eine während der Laktation bestehende Immunsuppression (Sulila und Mattsson, 1990; Medina *et al.*, 1993; Medina und Kincade, 1994; Athippozhy *et al.*, 2011). Dies wird anhand einer Reduktion von Genen des TCR-Signalweges im Darm und einer verminderten Produktion von B-Lymphozyten im Knochenmark deutlich. Daneben konnten verminderte Thymusgewichte und eine verschlechterte Funktion des Thymus, dem

wichtigsten Organ für die T-Lymphozyten-Reifung, beobachtet werden. Auch die bereits diskutierte Aktivierung des APR-Signalweges wird mit einer Suppression des spezifischen Immunsystems in Zusammenhang gebracht. Hier können durch eine Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenachse gesteigerte Glukokortikoidkonzentrationen die Apoptose von Thymusgewebe bedingen (Haeryfar und Berczi, 2001). Es ist denkbar, dass die Suppression des Immunsystems dazu dient, den Organismus vor adversen Immunreaktionen zu schützen.

4.2.3 Veränderungen der Expression von Genen fokaler Adhäsionsmoleküle

Interessanterweise zeigte die vorliegende Studie eine verminderte Expression von Genen fokaler Adhäsionsmoleküle in der Leber laktierender Sauen. Bedeutende in diesem Versuch signifikant in ihrer Expression verminderte Gene stellen das ITGB3 und das FN1 dar. Fokale Adhäsionsmoleküle sind subzelluläre makromolekulare Komplexe, welche durch die Kopplung von Integrinen (ITG) an das kontraktile Aktin-Zytoskelett die Zellverankerung an die Extrazellulärmatrix vermitteln (Sastry und Burridge, 2000). Daneben fungieren sie als biochemische Signalüberträger für viele regulatorische Signalwege. Die Regulation ihrer Aggregation und Destruktion ist dabei ein wichtiger Mechanismus zur Kontrolle der Zellfunktion (Schwartz und Ginsberg, 2002). Die Leukozyten-Transmigration über endotheliale und extrazelluläre Matrixbarrieren verlangt sowohl adhäsive Ereignisse, vermittelt durch Adhäsionsmoleküle auf der Leukozytenoberfläche, als auch eine Degradation von fokalen Adhäsionen (Coito, 2011). Der Interaktion von ITG und Fibronektin (FN) wird eine wichtige Bedeutung bei der Gewebeeinfiltration von T-Lymphozyten und Neutrophilen zugeschrieben (Thompson *et al.*, 2000; Amersi *et al.*, 2003). Es ist bekannt, dass die Passage von Leukozyten über das vaskuläre Endothel eine strenge Anhaftung an die Gefäßwand voraussetzt (Diamond und Springer, 1994). Diese Anhaftung wird primär durch ITG vermittelt. ITG sind $\alpha\beta$ -transmembranäre Adhäsionsrezeptoren, welche auf der Zelloberfläche von Leukozyten exprimiert werden (Hynes, 2002). Diese Rezeptoren können innerhalb weniger Minuten nach Erhalt eines inflammatorischen Stimulus an Zelloberflächen und extrazelluläre Liganden binden (Diamond und Springer, 1994). Die vaskuläre Expression des Adhäsionsmoleküls FN, eines der bedeutendsten extrazellulären Matrixproteine, vermittelt darüber hinaus die Rekrutierung von Leukozyten (Amersi *et al.*, 2003). Somit ist zu vermuten, dass die verminderte Expression der fokalen Adhäsionsmoleküle ITG und FN in der Leber laktierender Sauen die Einwanderung von Leukozyten in das Gewebe reduziert. Es

existieren Untersuchungen, die belegen, dass die Blockade von Adhäsionsmolekülen, besonders von Integrinen, die Passage von Leukozyten verhindert und inflammatorische Zustände hemmt (Fiorino *et al.*, 2010). Dies könnte durch eine daraus resultierende verminderte Expression von proinflammatorischen Zytokinen dem Schutz des Lebergewebes laktierender Sauen dienen (Amersi *et al.*, 2003). In der Literatur wird ein selektives *trafficking* von verschiedenen Immunzellen während der Laktation diskutiert. Beim Menschen und bei der Kuh wurden Veränderungen der Lymphozytenkonzentration im Blut beschrieben. Das Blut wies vergleichbar hohe Konzentrationen an B-Lymphozyten und geringe Konzentrationen an T-Lymphozyten auf. Die Konzentrationen in der Milch zeigten eine Anreicherung zugunsten der T-Lymphozyten (Wirt *et al.*, 1992; Taylor *et al.*, 1994a; Van Kampen und Mallard, 1997). Untersuchungen zur Lokalisation der verschiedenen T-Lymphozytenpopulationen bei Wiederkäuern und Sauen zeigten eine hohe Konzentration an CD8+(zytotoxische) -Zellen in der Milch bzw. dem Kolostrum und niedrige Konzentrationen im peripheren Blut (Le Jan, 1994; Taylor *et al.*, 1994a; Van Kampen und Mallard, 1997; Persson-Waller und Colditz, 1998). Für CD4+-Zellen war bei Wiederkäuern ein inverser Effekt mit hohen Konzentrationen im Blut und geringen Konzentrationen in der Milch zu beobachten (Taylor *et al.*, 1994a; Persson-Waller und Colditz, 1998). Dies könnte durch ein selektives *trafficking* von CD8+T-Zellen in die Milchdrüse oder eine Retention der CD8+-Zellen in der Milchdrüse erklärt werden (Persson-Waller und Colditz, 1998). Eine stärkere Expression von speziellen Adhäsionsmolekülen durch die T-Lymphozyten im Vergleich zu anderen Immunzelltypen könnte dies bedingen (Taylor *et al.*, 1994b; Persson-Waller und Colditz, 1998). Zusätzlich zeigen Kühe postpartum kurzfristig eine reduzierte Expression des L-Selektins auf Neutrophilen (Lee und Kehrli, 1998). Dies ist ein für die Anhaftung der Neutrophilen an das Endothel und eine erfolgreich ablaufende Gewebeeinfiltration unerlässliches Adhäsionsmolekül (Spertini *et al.*, 1991; Wada *et al.*, 1996). Die bei laktierenden Sauen der vorliegenden Arbeit beobachtete reduzierte Expression von Genen fokaler Adhäsionsmoleküle in der Leber könnte für das selektive *trafficking* von Immunzellen ebenfalls von entscheidender Bedeutung sein und somit eine Umverteilung der Immunzellen zugunsten anderer Organe bewirken. Untersuchungen am Menschen und bei Kühen zeigten, dass die in der Milch enthaltenen T-Zellen vorrangig T-Gedächtniszellen sind. Dies zeigt sich anhand einer unterschiedlich starken Expression von Oberflächenrezeptoren mit hohen Konzentrationen an CD2 und geringen Konzentrationen an CD45R (Bertotto *et al.*, 1990; Taylor *et al.*, 1994a). CD8+-Gedächtniszellen sind bei erneuten Infektionen in der Lage schnell und mit hoher Effektivität wirksam zu werden und haben möglicherweise eine

entscheidende Bedeutung für den Schutz der Milchdrüse. Diese Eigenschaft wird diesem Zelltyp auch im Darmepithel zum Erhalt der Integrität der Mukosa zugeschrieben (Belyakov *et al.*, 1998). Darüber hinaus könnte dies einen Mechanismus darstellen, der zur Verbesserung des Immunstatus der säugenden Nachkommen dient (Bertotto *et al.*, 1990). Die Nachkommen könnten somit vom „immunologischen Gedächtnis“ des Muttertieres profitieren.

Zusammenfassend ist in Betracht zu ziehen, dass durch die verminderte Expression von fokalen Adhäsionsmolekülen die Möglichkeit zur Migration von immunkompetenten Zellen in das Lebergewebe gestört ist. Die verringerte Infiltration dieser Zellen lässt vermuten, dass die Leber selbst nicht der zentrale Ort für das inflammatorische Geschehen während der Laktation ist. Es ist denkbar, dass die während der Laktation in der Leber gesteigerte Expression von Genen der APR von aus der Peripherie stammenden Zytokinen initiiert wurde. Als mögliche Quelle der Zytokine könnte die Milchdrüse oder der Reproduktionstrakt diskutiert werden. Zudem ist ein effektiv wirksames Immunsystem auf die Interaktion und Balance zwischen verschiedenen Zelltypen, insbesondere verschiedenen Subtypen von Lymphozyten, angewiesen. Die während der Laktation zu beobachtende verminderte Expression von Genen der humoralen und zellulären Immunantwort in der Leber könnte durch die verminderte Expression von Adhäsionsmolekülen und eine mögliche verminderte Infiltration von Immunzellen in dieses Gewebe bedingt sein, da auf der Oberfläche von Leukozyten eine Vielzahl von immunregulatorischen Molekülen lokalisiert ist (Piriou-Guzylack und Salmon, 2008). Die Beobachtungen der vorliegenden Studie beschränken sich jedoch auf Untersuchungen zu Veränderungen der Genexpression in der Leber. Die Leber als tertiär lymphatisches Organ leistet keinen direkten Beitrag zur Ausbildung der humoralen Immunantwort. Entsprechend können Aussagen, inwieweit die Veränderungen immunologischer Parameter in der Leber ebenfalls systemisch wirksam sind, anhand der vorliegenden Untersuchungen an laktierenden Sauen nicht getroffen werden.

4.2.4 Veränderungen des Nuclear factor erythroid-2(E2)-related factor 2-Signalweges

Des Weiteren wurden zur Aufklärung einer möglichen Aktivierung der Nrf2-abhängigen Genexpression in der Leber laktierender Sauen im Rahmen dieser Arbeit die Expressionen verschiedener Nrf2-Zielgene mittels *realtime* RT-PCR analysiert. Dabei konnte eine signifikant gesteigerte Expression der antioxidativ wirksamen Gene GPX1 und SOD und der zytoprotektiv wirksamen und in den Phase II-Metabolismus involvierten Gene HO-1, NQO1, PRDX6, TXNRD1 und UGT1A1 beobachtet werden (**Studie 3**). Aufgrund der gesteigerten

Expression dieser Gene könnte durch eine Neutralisation und Verminderung von ROS, welche unter proinflammatorischen Bedingungen vermehrt gebildet werden, ein Schutz des Gewebes vor inflammatorischen Schäden realisiert werden (Kim *et al.*, 2010).

Eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors kann durch oxidativen Stress und die damit verbundene Generierung von ROS erfolgen (Kaspar *et al.*, 2009). Eine gesteigerte ROS-Produktion wird als eine mögliche Folge von Endoplasmatischem Retikulum (ER)-Stress diskutiert (Santos *et al.*, 2009). In der Leber laktierender Sauen ergaben sich unter Anwendung der DAVID-Analyse signifikant gesteigerte Expressionen von Genen der *Gene Ontology* (GO)-Kategorie molekulare Funktionen, speziell die Funktion *unfolded protein binding* und der GO-Kategorie biologische Prozesse, speziell *ER to Golgi vesikel mediated transport* (**Studie 1**). Diese Beobachtungen deuten auf eine Aktivierung des *unfolded protein response* (UPR)-Signalweges während der Laktation bei Sauen hin. Die Aktivierung des Signalweges erfolgt als Antwort auf bestehenden ER-Stress. Übersteigt der Influx von ungefalteten Polypeptiden die Kapazität des ER zur Faltung von Proteinen, wird die Funktion des ER gestört und folgend der UPR-Signalweg aktiviert, um den physiologischen Status des ER wieder herzustellen (Schröder und Kaufman, 2005). Sauen scheinen somit während der Laktation ER-Stress zu entwickeln. In der Literatur wurde beschrieben, dass in der Milz laktierender Kühe ER-Stress beobachtet wurde (Morris *et al.*, 2009). Weiterhin zeigen Kühe in der peripartalen Phase eine gesteigerte Lipid- und Proteinperoxidation im Plasma (Bernabucci *et al.*, 2005; Castillo *et al.*, 2005; Albera und Kankofer, 2011). Morris *et al.* (2009) vermuten, dass die gesteigerte Lipidperoxidation resultierend aus ER-Stress zu einer gesteigerten ROS-Produktion und folgend zu einer Aktivierung der Genexpression von Nrf2-Zielgenen führt. Dies wird infolge von ER-Stress durch die Phosphorylierung und damit die Aktivierung und Translokation des Nrf2 in den Nukleus realisiert (Cullinan *et al.*, 2003). Die Bedeutung des Nrf2 als Schutzmechanismus gegen bestehenden ER-Stress wird nach Exposition von ER-Stress zu Nrf2^{-/-}-Zellen deutlich. Hier war eine gesteigerte Letalität der Zellen zu beobachten (Cullinan *et al.*, 2003).

Daneben ist es denkbar, dass der aufgrund der gesteigerten Expression von APP bestehende inflammatorische Status durch vermehrt anfallende ROS während der Laktation bei Sauen der vorliegenden Studie ebenfalls zur Aktivierung des Nrf2 beiträgt (**Studie 1**; Ma, 2011; Chung *et al.*, 2013). Zudem ist eine erhöhte Energieproduktion, welche aus einem Anstieg der Expression von Genen der peroxisomalen und mitochondrialen β -Oxidation, des Citratzyklus und der Atmungskette resultiert, mit einer gesteigerten Synthese von ROS assoziiert (**Studie 1**; Ma, 2010; Quinlan *et al.*, 2012).

Zusammenfassend sind ROS als mögliche Folge von ER-Stress, inflammatorischen Geschehen und Energieproduktion als Aktivatoren des Nrf2 während der Laktation in Betracht zu ziehen. Eine Aktivierung des Nrf2 ermöglicht es dem Organismus gezielt die ROS-Konzentration und damit oxidative Schäden zu steuern und entsprechend zu vermindern (schematisch zusammengefasst in Abb. 3) (Bishayee *et al.*, 2010; Charoensuk *et al.*, 2011; Das *et al.*, 2012; Marcolin *et al.*, 2012).

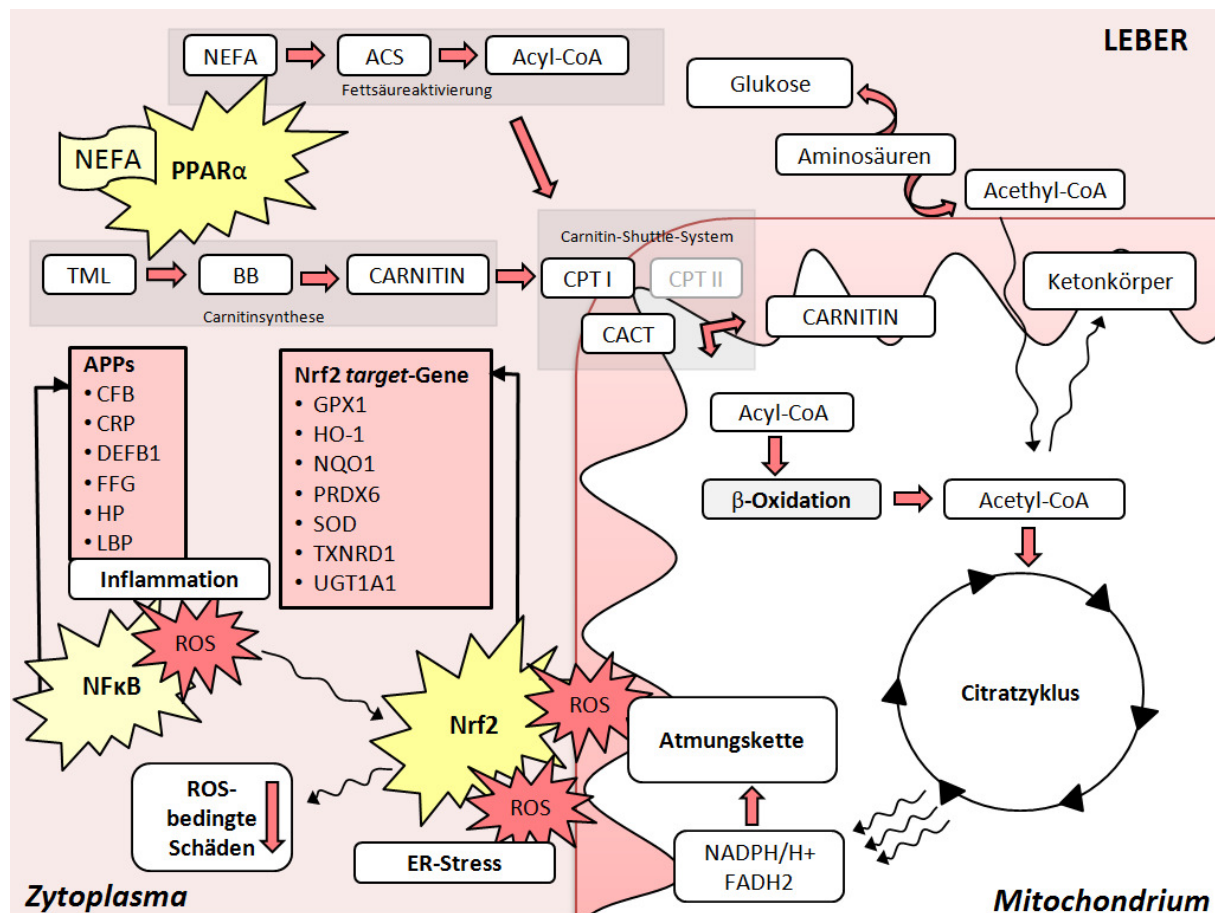


Abb. 3 Modell zu den metabolischen Veränderungen in der Leber von Sauen während der Laktation.

Als zentrales Stoffwechselorgan nimmt die Leber während der Laktation eine Schlüsselfunktion ein. Die Anpassung des Intermediärstoffwechsels zugunsten der Energieproduktion und der Substratbereitstellung für die Milchsäure in der Milchdrüse stellen die wohl wichtigsten Funktionen dar. Eine durch gesteigerte Plasmakonzentrationen an freien Fettsäuren (NEFA) initiierte Aktivierung des nuklearen Transkriptionsfaktors *peroxisome proliferator-activated receptor alpha* (PPARα) resultiert in einer gesteigerten Expression von PPARα-Zielgenen. Diese codieren u.a. für Enzyme der Fettsäureaktivierung, der Carnitinsynthese des Carnitin-Shuttle-Systems und der β-Oxidation. Im Rahmen des Fettsäurekatabolismus werden die aktivierten Acyl-CoA mittels des Carnitin-Shuttle-Systems über die Mitochondrienmembran in die Mitochondrienmatrix transportiert und anschließend über die β-Oxidation zu Acetyl-CoA metabolisiert. Zudem scheint der Abbau von Aminosäuren einen Beitrag zum Acetyl-CoA-Pool der Zelle zu leisten. Die Acetyl-CoA werden durch den Citratzyklus über die Bildung von Reduktionsäquivalenten der ATP-Synthase in der Atmungskette zugeführt. Daneben könnte über eine gesteigerte Metabolisierung von glukogenen Aminosäuren eine gesteigerte Glukosesynthese vermutet werden.

Des Weiteren zeigen laktierende Sauen eine gesteigerte Expression von Zielgenen des *Nuclear factor erythroid-2(E2)-related factor 2* (Nrf2). Die Aktivierung des Nrf2 kann u.a. durch vermehrt anfallende reaktive Sauerstoffspezies/reactive oxygen species (ROS) bedingt sein. Eine Erhöhung der Synthese an ROS könnte während der Laktation aus der gesteigert ablaufenden β-Oxidation, dem Citratzyklus und der Atmungskette resultieren. Daneben könnte in der Leber laktierender Sauen eine gesteigerte Expression von Akute-Phase-Proteinen (APP) beobachtet werden. Diese stellen Marker für bestehende inflammatorische Zustände dar. Inflammatorische Geschehen bedingen ebenfalls ein gehäuftes Anfallen von ROS und könnten folgend gleichermaßen die Aktivierung des Nrf2 initiieren. Daneben stellt ER(Endoplasmatisches Retikulum)-Stress eine Quelle für ROS dar. Der durch die Aktivierung des Nrf2 resultierende Expressionsanstieg von antioxidativ und zytoprotektiv wirksamen Enzymen ist folglich mit einer erfolgreichen Prävention der Akkumulation von ROS in der Zelle verbunden und verhindert ROS-bedingte Schäden.

ACS, acyl-CoA-Synthase; BB, γ-Butyrobetain; CACT, Carnitin/Acylcarnitin-Translokase; CFB, Komplement Faktor B; CPT1, Carnitin Palmitoyltransferase 1; CPT2, Carnitin Palmitoyltransferase 2; CRP, C-reaktives Protein; DEFB1, β-Defensin 1; FGG, Fibrinogen γ; GPX1, glutathione peroxidase; HP, Haptoglobin; HO-1, heme oxygenase 1; LBP, lipopolysaccharid binding protein; NFκB, Nuclear Factor kappaB; NQO1, NAD(P)H dehydrogenase quinone 1; PRDX6, peroxiredoxin 6; SOD, superoxide dismutase; TML, 6-N-Trimethyl-Lysin; TXNRD1, thioredoxin reductase 1; UGT1A1, glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A1.

Das Wirkspektrum des Nrf2 bietet eine Reihe von Erklärungsansätzen für die während der Laktation bei Sauen beobachteten Veränderungen inflammatorischer und immunologischer Parameter. In der Literatur wird eine Beeinflussung der NF- κ B-vermittelten Genexpression durch den Nrf2 beschrieben (Nair *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2010). Nach Aktivierung des Nrf2 ist eine Reduktion der Expression von proinflammatorischen Zytokinen wie beispielsweise des TNF α , welche zu den NF- κ B-Zielgenen zählen, zu beobachten (Pahl, 1999; Charoensuk *et al.*, 2011; Das *et al.*, 2012). Nrf2-defiziente Mäuse zeigen hingegen eine gesteigerte Expression dieser Gene (Khor *et al.*, 2006; Ichihara *et al.*, 2010). Eine Hemmung der Phosphorylierung des I κ B und damit die Suppression des NF- κ B kann nach Aktivierung des Nrf2 durch Mangiferin, eine zu den Polyphenolen zählende Substanz, aufgezeigt werden (Das *et al.*, 2012). Der Nrf2 ist damit in der Lage, der durch den NF- κ B gesteigerten Expression von Genen proinflammatorischer Zytokine entgegenzuwirken und folgend das Entzündungsgeschehen einzudämmen. Die Aktivierung des Nrf2 in der Leber laktierender Sauen könnte demzufolge eine verminderte Synthese von proinflammatorischen Zytokinen nach sich ziehen. Dies lässt entsprechend vermuten, dass die in der Leber während der Laktation induzierte APR vorrangig von Zytokinen, welche die Leber aus der Peripherie erreichen, initiiert wird. Inflammatorische Ereignisse im reproduktiven Trakt nach der Geburt und mögliche durch das Säugen der Nachkommen induzierte Verletzungen der Milchdrüse könnten als Quellen für Zytokine in der Peripherie diskutiert werden. Es existieren Hinweise, dass Kühe mit stark negativer Energiebilanz nach dem Kalben im Uterus eine Inflammation in Reaktion auf Bakterien aus der Umwelt entwickeln (Wathes *et al.*, 2007). Diese könnte auch bei Sauen eine Quelle für proinflammatorische Zytokine, welche die Leber aus der Peripherie erreichen, darstellen. Kim *et al.* (2010) beschreiben zudem umfassende Einflüsse einer Nrf2-Aktivierung auf die Expression von Adhäsionsmolekülen, die durch die Beeinflussung der Aktivität des NF- κ B vermittelt werden. Neben der Suppression der proinflammatorischen Zytokine ist der Nrf2 fähig, einer durch den NF- κ B gesteigerten Expression von Genen, welche für Adhäsionsmoleküle codieren, entgegenzuwirken (Ichihara *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2010; Hwang *et al.*, 2012;). Nach Aktivierung des Nrf2 ist in humanen Endothelzellen und *in vivo* bei Mäusen unter anderem eine verminderte Expression der als NF- κ B-Zielgene bekannten Adhäsionsmoleküle *vascular cell adhesion molecule 1*, *intercellular adhesion molecule 1* und E-Selektin zu beobachten (Pahl, 1999; Lee *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2010; Hwang *et al.*, 2012). Dies könnte eine verringerte Adhäsion und Migration von Monozyten und Leukozyten zu inflammatorischen Lokalisationen nach sich ziehen. Hinweise aus verschiedenen *in vitro* Beobachtungen an *bovinen*, *porcinen* und

humanen Endothelzelllinien lassen vermuten, dass die gesteigerte Expression der HO-1 als Folge einer Nrf2-Aktivierung über eine Suppression der TNF α -Expression eine Reduktion der Aktivität des NF- κ B bewirkt und schließlich die verminderte Expression von Adhäsionsmolekülen bedingt (Banning und Brigelius-Flohe, 2005; Pae *et al.*, 2006; Ichihara *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2010; Hwang *et al.*, 2012). Die verminderte Expression von Adhäsionsmolekülen ist in Einklang mit der bei laktierenden Sauen beobachteten Reduktion der Expression von fokalen Adhäsionsmolekülen (**Studie 1**), welche ebenfalls eine verminderte Infiltration von Immunzellen in die Leber vermuten lassen (Amersi *et al.*, 2003; Forino *et al.*, 2010). Die verminderte Akkumulation von Leukozyten könnte folgend zur Reduktion von oxidativem Stress und proinflammatorischen Zytokinen führen und eine Verminderung von Gewebeschädigungen bedingen.

In der vorliegenden Arbeit zeigen laktierende Sauen (**Studie 1 und 3**) jedoch eine simultane Aktivierung des NF- κ B- und des Nrf2-Signalweges. Dies wird aus der gleichzeitig gesteigerten Expression von Nrf2-Zielgenen und der Expression von APP, NF- κ B-regulierten Genen, deutlich. Eine Reduktion der Transkription und Translation des Genes, welches für das I κ B-Protein codiert, vermittelt durch ER-Stress, ist hier als Mechanismus denkbar (Pahl und Baeuerle, 1995; Wu *et al.*, 2004). Welche Bedeutung diesem *Crosstalk* zwischen NF- κ B und Nrf2 während der Laktation zukommt und welche Veränderungen für inflammatorische und immunologische Parameter daraus resultieren, gilt es in der Zukunft weiter zu erforschen.

Die aufgrund der gesteigerten Expression von Nrf2-Zielgenen in der Leber von laktierenden Sauen zu vermutende Aktivierung des Nrf2 könnte als ein adaptiver Mechanismus auf die bestehenden Veränderungen im Stoffwechsel und das Immunsystem angesehen werden. Die positiven Effekte, die aus der gesteigerten Expression einer großen Vielfalt an antioxidativen und zytoprotektiven Genen als auch Genen des Fremdstoffmetabolismus resultieren, dienen der Zelle zum Schutz gegen ROS-bedingte Schädigung durch deren zielgerichtete Beseitigung.

5 Zusammenfassung

Während der Laktation ist der Metabolismus des weiblichen Organismus durch eine tiefgreifende Umstellung zugunsten der Milchsynthese charakterisiert. In der Literatur wird auf Basis zahlreicher Untersuchungen an laktierenden Kühen und bei Nagern bereits über umfangreiche Veränderungen der Genexpression in verschiedenen Geweben berichtet. Dabei zeichnen sich vor allem im Intermediärstoffwechsel deutliche speziesspezifische Unterschiede ab. Laktierende Nager lassen energieeinsparende Mechanismen in Leber, Skelettmuskulatur und braunem Fettgewebe erkennen. Diese Veränderungen sind assoziiert mit einer verminderten Genexpression von Enzymen der β -Oxidation, der Carnitinsynthese und der zitterfreien Thermogenese in den untersuchten Geweben. Bei laktierenden Kühen hingegen deutet sich eine im Rahmen der β -Oxidation gesteigerte Nutzung von Fettsäuren zur Energiegewinnung an. Damit zeichnen sich für den *peroxisome proliferator-activated receptor alpha* (PPAR α), einem Transkriptionsfaktor und wichtigen Regulator dieser Stoffwechselwege, deutliche speziesspezifische Unterschiede während der Laktation ab. Neben den Veränderungen im Intermediärstoffwechsel sind beim Nager und der Milchkuh deutliche Veränderungen der Genexpression von inflammatorisch und immunologisch wirksamen Molekülen in Leber, Milz und Darm beschrieben. Studien an Milchkühen zeigten des Weiteren eine Aktivierung der Expression von Genen antioxidativ und zytoprotektiv wirksamer Proteine in der Leber und der Milz auf. Eine Vielzahl dieser sind bekannte Zielgene des *Nuclear factor erythroid-2(E2)-related factor 2* (Nrf2) und deuten damit auf eine Aktivierung des Nrf2-Signalweges während der Laktation in dieser Spezies hin. Bei Sauen fehlen vergleichbare Untersuchungen zu Veränderungen der Genexpression, vor allem in der Leber, dem zentralen Stoffwechselorgan. Deshalb sollte im Rahmen dieser Arbeit eine Übersicht über Veränderungen im Genexpressionsprofil in der Leber laktierender Sauen generiert werden. Zur Versuchsdurchführung wurden 20 trächtige Sauen herangezogen. Postpartal erfolgte eine Aufteilung zu je 10 Tieren auf eine laktierende und eine nicht laktierende Gruppe. Die Würfe der laktierenden Gruppe wurden auf 12 Ferkel standardisiert. Den Sauen der nicht laktierenden Gruppe wurden die Ferkel entzogen, um ein Einstellen der Milchsynthese zu bewirken. Die Durchführung von Biopsien zur Gewinnung der Leberproben erfolgte am Tag 20 der Laktation, dem Zeitpunkt der maximalen Milchsynthese. Diese wurden anschließend unter Anwendung der *microarray*-Technologie analysiert. Auf Basis bereits existierender Untersuchungen an anderen Spezies und der mittels *microarray*-Analyse generierten Daten folgten vertiefende Untersuchungen bezüglich einer möglichen Aktivierung

des PPAR α - und Nrf2-Signalweges. Die *realtime* RT-PCR-Analyse diente dabei der Bestimmung der relativen Transkripte bekannter Zielgene der Transkriptionsfaktoren.

Zusammenfassend waren in der Leber laktierender Sauen umfangreiche Veränderungen des intermediären Stoffwechsels zu beobachten. Dabei konnte eine gesteigerte Expression von PPAR α -regulierten Genen involviert in die Carnitinsynthese, den Fettsäurekatabolismus und die Ketogenese aufgezeigt werden. Daneben ergaben die Untersuchungen Veränderungen des Glukosestoffwechsels und des Aminosäurenstoffwechsels. Den Glukosestoffwechsel betreffend waren sowohl Gene der Glukoneogenese als auch der Glykolyse in ihrer Expression gesteigert. Im Aminosäurenstoffwechsel konnten gesteigerte Expressionen von Genen, welche in den Metabolismus von Serin, Threonin und Glycin involviert sind, beobachtet werden. Daneben zeigte sich eine verminderte Expression der Alanin-Aminotransferase (ALT/GPT), eines in den Abbau von Alanin involvierten Enzymes. Des Weiteren war eine gesteigerte Expression von Genen des Citratzyklus und der Atmungskette zu verzeichnen. Neben den Veränderungen im Intermediärstoffwechsel konnten auch in der Leber laktierender Sauen umfangreiche Einflüsse des Laktationsgeschehens auf die Genexpression von inflammatorisch und immunologisch wirksamen Proteinen nachgewiesen werden. Dabei waren gesteigerte Expressionen von Genen der Akute-Phase-Reaktion zu erkennen. Des Weiteren konnte eine deutliche Reduktion der Expression von immunologisch wirksamen Strukturen des adaptiven Immunsystems und von fokalen Adhäsionsmolekülen beobachtet werden. Untersuchungen bezüglich einer Aktivierung des Nrf2-Signalweges zeigten bei laktierenden Sauen eine deutlich gesteigerte Expression von Zielgenen des Transkriptionsfaktors auf.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie lassen auf eine Aktivierung des PPAR α in der Leber laktierender Sauen schließen. Dies kann aufgrund der gesteigerten Expression von Zielgenen des Transkriptionsfaktors vermutet werden. Die hierbei anhand der Genexpressionsanalysen zu beobachtende Steigerung der Carnitinsynthese, des Carnitintransports und des Fettsäurekatabolismus deutet auf eine gesteigerte Energiegewinnung aus Fettsäuren während der Laktation hin. Veränderungen im Kohlenhydratstoffwechsel zeigten gleichermaßen gesteigerte Expressionen von Genen der Glukoneogenese und der Glykolyse. Dies lässt nur bedingt Aussagen bezüglich einer Umstellung des Metabolismus in Richtung Glukosesynthese bzw. Glukoseverstoffwechselung zu. Aufgrund der gesteigerten Expression von Genen, welche in die Verstoffwechselung von glukogenen Aminosäuren involviert sind, und aus physiologischer Sicht scheint eine gesteigerte Glukoneogenese sinnvoll. Diese könnte der Bereitstellung von Glukose für die Milchsynthese dienen. Die verminderte Expression der

ALT deutet eine mögliche Konservierung des Alanins an. Es ist damit eine Einsparung des Alanins und dessen Bereitstellung für die Milchsynthese in der Milchdrüse denkbar. Zudem deuten die gesteigerten Expressionen von Genen des Citratzyklus und der Atmungskette eine erhöhte Energieproduktion in der Leber während der Laktation bei der Sau an.

Anhand der gesteigerten Genexpression von Akute-Phase-Proteinen (APP) in der Leber lässt sich ein inflammatorischer Status während der Laktation bei der Sau vermuten. Die verminderten Expressionen von Genen immunologisch wirksamer Strukturen des adaptiven Immunsystems deuten einen immunsuppressiven Effekt während der Laktation an. Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass die Leber den tertiär lymphatischen Organen zuzuordnen ist und damit nicht direkt zur Differenzierung und Vermehrung von Lymphozyten beiträgt. Folgend sind die Genexpressionsdaten in der Leber nur begrenzt auf den Gesamtorganismus übertragbar. Es ist anzunehmen, dass die verminderte Expression von Genen von fokalen Adhäsionsmolekülen die Infiltration von Immunzellen in die Leber hemmt. Somit ist es denkbar, dass die Leber nicht zentraler Ort der Inflammation während der Laktation ist. Die gesteigerte Expression von antiinflammatorisch und zytoprotektiv wirksamen Enzymen sowie Enzymen des Phase-II-Metabolismus deutet eine Aktivierung des Nrf2 an. Dies lässt eine Adaptation des Stoffwechsels zur Prävention von oxidativen Ereignissen und einer damit assoziierten ROS-Produktion vermuten.

Die Ergebnisse dieser Studien geben zum ersten Mal einen Überblick über globale Veränderungen der Genexpression in der Leber laktierender Sauen. Über eine gezielte Beeinflussung vor allem der Signalwege des PPAR α und des Nrf2 könnte in der Zukunft eine günstige Beeinflussung des Fettsäuremetabolismus und des Inflammationsgeschehens bei der laktierenden Sau erfolgen.

6 Summary

Lactation is a physiological state which is characterized by profound changes in the maternal metabolism towards milk synthesis in the mammary gland. Present studies on dairy cows and rodents show remarkable adaptations of gene expression in different tissues. In this context species specific differences especially regarding the intermediary metabolism were described. In rodents a decreased expression of genes involved in β -oxidation, carnitine synthesis and thermogenesis indicate energy-saving effects during lactation. In contrast, investigations in dairy cows show an elevated β -oxidation and therefore an increased utilization of fatty acids during lactation. Thus, fatty acids released from adipose tissue in the course of the conversion from an anabolic to the catabolic state may be used for energy production by the liver. *Peroxisome proliferator-activated receptor alpha* (PPAR α) is an important transcription factor involved in the transcriptional regulation of genes in these pathways. Accordingly, the observations show considerable species specific differences of the activation of PPAR α during lactation. In addition, lactating cows and rodents show changes in the expression of genes involved in the inflammation and immune response in liver, spleen and intestine. Moreover, research in dairy cows revealed an elevated expression of genes with antioxidative and cytoprotective properties in both liver and spleen. Most of these genes are known *nuclear factor erythroid-2(E2)-related factor 2* (Nrf2)-target genes and therefore indicate an activation of the Nrf2 during lactation in this species. Studies investigating such mechanisms in lactating sows are rare. To improve the understanding of metabolic and immunological adaptations in the liver of sows during lactation we conducted this study. Hence we performed an experiment with 20 lactating sows. Postpartum the sows were divided into two groups a lactating and a non-lactating one. In the first group, the litter size was standardized to a number of 12 piglets per sow and the second group got their litters removed to prevent milk synthesis. We implemented the study at day 20 of lactation in order to get better understanding of the modulation of the gene expression at the point of peak milk production. A genome-wide transcription profiling in the liver of these sows was performed. On the background of present studies and the results of the *microarray*-analysis from this experiment we implemented further analysis in gene expression towards an activation of the transcription factors PPAR α and Nrf2 using *realtime* RT-PCR.

The results showed substantial impact on the intermediary metabolism in the liver of sows during lactation. Elevated transcript levels of PPAR α regulated genes involved in carnitine synthesis, fatty acid catabolism and ketogenesis could be observed. Moreover changes in

glucose and amino acid metabolism could be detected. Both, genes of gluconeogenesis and glycolysis were increased in their expression. Changes in amino acid metabolism showed elevated expressions of genes involved in serine, threonine and glycine metabolism and a reduction of the gene expression of alanine aminotransferase (ALT/GPT). Additionally, the results displayed elevated transcript levels of genes involved in the citric acid cycle and the respiratory chain. Concerning inflammatory and immunological parameters the analysis showed elevated levels of several acute phase proteins and reduced expressions of genes involved in immune response and focal adhesion. Moreover the investigations demonstrated an increased expression of antioxidant and cytoprotective genes, known Nrf2-target genes.

In summary, the results of the present study indicate an activation of the transcription factor PPAR α . This conclusion can be drawn from the elevated expression of known PPAR α -target genes. The enhanced expression of genes involved in carnitine synthesis and fatty acid catabolism indicates an increased energy production from fatty acids in the liver of sows during lactation. Due to simultaneously elevated expressions of gluconeogenetic and glycolytic enzymes it is hard to interpret the adaptation of the glucose metabolism. Based on the increased expression of genes involved in the metabolism of gluconeogenetic amino acids and regarding the physiology an adaptation towards gluconeogenesis seems to be meaningful. This mechanism may ensure glucose availability for milk synthesis. The reduced expression of ALT may serve as a mechanism to conserve alanine as a substrate for milk synthesis, too. Moreover, the elevated expression of genes involved in the citric acid cycle and the respiratory chain indicate an elevated energy production in the liver of lactating sows. Furthermore the increased expression of genes of APP suggests an inflammatory status in the sows liver during lactation. However the reduced expression of genes encoding the immunological structures display an immunosuppressive effect. Nevertheless, one should consider, that the liver merely counts as a tertiary lymphatic organ and does therefore not directly contribute to the immunological response. Subsequently, gene expression data of the liver cannot be transferred to the whole organism. One might suppose that the decreased expression of genes encoding focal adhesion molecules counteracts the infiltration of cells of the immune system into the liver. In consequence it is possible that the liver is not the central spot of inflammatory events during lactation. Moreover the elevated expression of Nrf2-target genes suggests an activation of the transcription factor. These genes encode enzymes with antioxidative and cytoprotective properties and enzymes of metabolism phase II. One may suppose an adaptation of the metabolism to prevent oxidative events and the associated ROS-production.

For the first time the results of the present study give an overview of global changes in genome expression of the liver of sows during lactation. Targeting the signaling pathways of the transcription factors PPAR α and Nrf2 may deliver new perspectives to advantageously influence the fatty acid metabolism and inflammatory events in the liver of sows during lactation.

7 Literaturverzeichnis

- Agrawal A**, Cha-Molstad H, Samols D, Kushner I (2003a) Overexpressed nuclear factor kappaB can participate in endogenous C-reactive protein induction, and enhances the effects of C/EBPbeta and signal transducer and activator of transcription-3. *Immunology* **108**: 539-47
- Agrawal A**, Samols D, Kushner I (2003b) Transcription factor c-Rel enhances C-reactive protein expression by facilitating the binding of C/EBPbeta to the promoter. *Mol. Immunol.* **40**: 373-80.
- Albera E**, Kankofer M (2011) The comparison of antioxidative/oxidative profile in blood, colostrum and milk of early post-partum cows and their newborns. *Reprod. Domest. Anim.* **46**: 763-9.
- Albrecht U**, Yang X, Asselta R, Keitel V, Tenchini ML, Ludwig S, Heinrich PC, Häussinger D, Schaper F, Bode JG (2007) Activation of NF-kappaB by IL-1beta blocks IL-6-induced sustained STAT3 activation and STAT3-dependent gene expression of the human gamma-fibrinogen gene. *Cell Signal.* **19**: 1866-78.
- Amersi F**, Shen XD, Moore C, Melinek J, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW, Coito AJ (2003) Fibronectin-alpha 4 beta 1 integrin-mediated blockade protects genetically fat Zucker rat livers from ischemia/reperfusion injury. *Am. J. Pathol.* **162**: 1229-39.
- Ammerschlaeger M**, Beigel J, Klein KU, Mueller SO (2004) Characterization of the species-specificity of peroxisome proliferators in rat and human hepatocytes. *Toxicol. Sci.* **78**: 229-40.
- Athippozhy A**, Huang L, Wooton-Kee CR, Zhao T, Jungsuwadee P, Stromberg AJ, Vore M (2011) Differential gene expression in liver and small intestine from lactating rats compared to age-matched virgin controls detects increased mRNA of cholesterol biosynthetic genes. *BMC Genomics* **12**: 95.
- Badman MK**, Pissios P, Kennedy AR, Koukos G, Flier JS, Maratos-Flier E (2007) Hepatic fibroblast growth factor 21 is regulated by PPARalpha and is a key mediator of hepatic lipid metabolism in ketotic states. *Cell Metab.* **5**: 426-37.

- Baeuerle PA**, Henkel T (1994) Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* **12**: 141-79.
- Baird L**, Dinkova-Kostova AT (2011) The cytoprotective role of the Keap1-Nrf2 pathway. *Arch. Toxicol.* **85**: 241-72.
- Banning A**, Brigelius-Flohé R (2005) NF-kappaB, Nrf2, and HO-1 interplay in redox-regulated VCAM-1 expression. *Antioxid. Redox Signal.* **7**: 889-99.
- Barnes PJ** (1997) Nuclear factor-kappa B. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **29**: 867-70.
- Bauman DE**, Currie WB (1980) Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: a review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis. *J. Dairy Sci.* **63**: 1514-29.
- Baumann H**, Gauldie J (1994) The acute phase response. *Immunol. Today* **15**: 74-80.
- Bell AW**, Bauman DE (1997) Adaptations of glucose metabolism during pregnancy and lactation. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **2**: 265-78.
- Belyakov IM**, Ahlers JD, Brandwein BY, Earl P, Kelsall BL, Moss B, Strober W, Berzofsky JA (1998) The importance of local mucosal HIV-specific CD8(+) cytotoxic T lymphocytes for resistance to mucosal viral transmission in mice and enhancement of resistance by local administration of IL-12. *J. Clin. Invest.* **102**: 2072-81.
- Berger J**, Moller DE (2002) The mechanisms of action of PPARs. *Annu. Rev. Med.* **53**: 409-35.
- Berke G** (1995) The CTL's kiss of death. *Cell* **81**: 9-12.
- Bernabucci U**, Ronchi B, Lacetera N, Nardone A (2005) Influence of body condition score on relationships between metabolic status and oxidative stress in periparturient dairy cows. *J. Dairy Sci.* **88**: 2017-26.
- Bertotto A**, Gerli R, Fabietti G, Crupi S, Arcangeli C, Scalise F, Vaccaro R (1990) Human breast milk T lymphocytes display the phenotype and functional characteristics of memory T cells. *Eur. J. Immunol.* **20**: 1877-80.

- Bianco C**, Götze O, Cohn ZA (1979) Regulation of macrophage migration by products of the complement system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **76**: 888-91.
- Bishayee A**, Barnes KF, Bhatia D, Darvesh AS, Carroll RT (2010) Resveratrol suppresses oxidative stress and inflammatory response in diethylnitrosamine-initiated rat hepatocarcinogenesis. *Cancer Prev. Res. (Phila)* **3**: 753-63.
- Black S**, Kushner I, Samols D (2004) C-reactive Protein. *J. Biol. Chem.* **279**: 48487-90.
- Boden G** (2006) Fatty acid-induced inflammation and insulin resistance in skeletal muscle and liver. *Curr. Diab. Rep.* **6**: 177-81.
- Brendemuhl JH**, Lewis AJ, Peo ER Jr (1989) Influence of energy and protein intake during lactation on body composition of primiparous sows. *J. Anim. Sci.* **67**: 1478-88.
- Burnol AF**, Leturque A, Loizeau M, Postic C, Girard J (1990) Glucose transporter expression in rat mammary gland. *Biochem. J.* **270**: 277-9.
- Casado J**, Remesar X, Pastor-Anglada M (1987) Hepatic uptake of gluconeogenic substrates in late-pregnant and mid-lactating rats. *Biosci. Rep.* **7**: 587-92.
- Castillo C**, Hernandez J, Bravo A, Lopez-Alonso M, Pereira V, Benedito JL (2005) Oxidative status during late pregnancy and early lactation in dairy cows. *Vet. J.* **169**: 286-92.
- Charoensuk L**, Pinlaor P, Prakobwong S, Hiraku Y, Laothong U, Ruangjirachuporn W, Yongvanit P, Pinlaor S (2011) Curcumin induces a nuclear factor-erythroid 2-related factor 2-driven response against oxidative and nitrative stress after praziquantel treatment in liver fluke-infected hamsters. *Int. J. Parasitol.* **41**: 615-26.
- Chung IS**, Kim JA, Kim JA, Choi HS, Lee JJ, Yang M, Ahn HJ, Lee SM (2013) Reactive Oxygen Species by Isoflurane Mediates Inhibition of Nuclear Factor κ B Activation in Lipopolysaccharide-Induced Acute Inflammation of the Lung. *Anesth. Analg.* **116**: 327-35.
- Clowes EJ**, Aherne FX, Baracos VE (2005) Skeletal muscle protein mobilization during the progression of lactation. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **288**: E564-72.

- Clowes EJ**, Aherne FX, Foxcroft GR, Baracos VE (2003) Selective protein loss in lactating sows is associated with reduced litter growth and ovarian function. *J. Anim. Sci.* **81**: 753-64.
- Coccurello R**, Caprioli A, Bellantuono S, D'Amato FR, Conti R, Giannessi F, Borsini F, Moles A (2010) Effects of the increase in neuronal fatty acids availability on food intake and satiety in mice. *Psychopharmacology (Berl)* **210**: 85-95.
- Coffey MP**, Simm G, Brotherstone S (2002) Energy balance profiles for the first three lactations of dairy cows estimated using random regression. *J. Dairy Sci.* **85**: 2669-78.
- Cogswell JP**, Godlevski MM, Wisely GB, Clay WC, Leesnitzer LM, Ways JP, Gray JG (1994) NF-kappa B regulates IL-1 beta transcription through a consensus NF-kappa B binding site and a nonconsensus CRE-like site. *J. Immunol.* **153**: 712-23.
- Coito AJ** (2011) Leukocyte transmigration across endothelial and extracellular matrix protein barriers in liver ischemia/reperfusion injury. *Curr. Opin. Organ Transplant.* **16**: 34-40
- Collart MA**, Baeuerle P, Vassalli P (1990) Regulation of tumor necrosis factor alpha transcription in macrophages: involvement of four kappa B-like motifs and of constitutive and inducible forms of NF-kappa B. *Mol. Cell Biol.* **10**: 1498-506.
- Cullinan SB**, Zhang D, Hannink M, Arvisais E, Kaufman RJ, Diehl JA (2003) Nrf2 is a direct PERK substrate and effector of PERK-dependent cell survival. *Mol. Cell Biol.* **23**: 7198-209.
- Das J**, Ghosh J, Roy A, Sil PC (2012) Mangiferin exerts hepatoprotective activity against D-galactosamine induced acute toxicity and oxidative/nitrosative stress via Nrf2-NFkB pathways. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **260**: 35-47.
- Dewey KG** (1997) Energy and protein requirements during lactation. *Annu. Rev. Nutr.* **17**: 19-36.
- Diamond MS**, Springer TA (1994) The dynamic regulation of integrin adhesiveness. *Curr. Biol.* **4**: 506-17.

- Ding ST**, Schinckel AP, Weber TE, Mersmann HJ (2000) Expression of porcine transcription factors and genes related to fatty acid metabolism in different tissues and genetic populations. *J. Anim. Sci.* **78**: 2127-34.
- Duffield T** (2000) Subclinical ketosis in lactating dairy cattle. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* **16**: 231-53.
- Escher P**, Braissant O, Basu-Modak S, Michalik L, Wahli W, Desvergne B (2001) Rat PPARs: quantitative analysis in adult rat tissues and regulation in fasting and refeeding. *Endocrinology* **142**: 4195-202.
- Escher P**, Wahli W (2000) Peroxisome proliferator-activated receptors: insight into multiple cellular functions. *Mutat. Res.* **448**: 121-38.
- Etienne M**, Dourmad J-Y, Noblet J (1998) The influence of some sow and piglet characteristics and of environmental conditions on milk production. In: Verstegen, M.W.A., Moughan PJ, Schrama JW (Eds.), *The lactating sow. Wageningen Pers, Wageningen, The Netherlands*, pp. 285–299.
- Etienne M**, Noblet J, Desmoulin B (1985) [Mobilization of body stores in the lactating primiparous sow]. *Reprod. Nutr. Dev.* **25**: 341-3.
- Farmer C**, Giguère A, Lessard M (2010) Dietary supplementation with different forms of flax in late gestation and lactation: Effects on sow and litter performances, endocrinology, and immune response. *J. Anim. Sci.* **88**: 225-37.
- Fiorino G**, Correale C, Fries W, Repici A, Malesci A, Danese S (2010) Leukocyte traffic control: a novel therapeutic strategy for inflammatory bowel disease. *Expert Rev. Clin. Immunol.* **6**: 567-72.
- Fischer M**, Keller J, Hirche F, Kluge H, Ringseis R, Eder K (2009) Activities of gamma-butyrobetaine dioxygenase and concentrations of carnitine in tissues of pigs. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* **153**: 324-31.
- Gessner DK**, Schlegel G, Keller J, Schwarz FJ, Ringseis R, Eder K (2013) Expression of target genes of nuclear factor E2-related factor 2 in the liver of dairy cows in the transition period and at different stages of lactation. *J. Dairy Sci.* **96**: 1038-43.

- Goff JP**, Horst RL (1997) Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders. *J. Dairy Sci.* **80**: 1260-8.
- Greenfield RB**, Cecava MJ, Donkin SS (2000) Changes in mRNA expression for gluconeogenic enzymes in liver of dairy cattle during the transition to lactation. *J. Dairy Sci.* **83**: 1228-36.
- Grimble RF** (1990) Nutrition and cytokine action. *Nutr. Res. Rev.* **3**: 193-210.
- Grum DE**, Drackley JK, Younker RS, LaCount DW, Veenhuizen JJ (1996) Nutrition during the dry period and hepatic lipid metabolism of periparturient dairy cows. *J. Dairy Sci.* **79**: 1850-64.
- Gruys E**, Toussaint MJ, Niewold TA, Koopmans SJ (2005) Acute phase reaction and acute phase proteins. *J. Zhejiang. Univ. Sci. B.* **6**: 1045-56.
- Gunnink JW** (1984) Post-partum leucocytic activity and its relationship to caesarian section and retained placenta. *Vet. Q.* **6**: 55-7.
- Gutgesell A**, Ringseis R, Brandsch C, Stangl GI, Hirche F, Eder K (2009a) Peroxisome proliferator-activated receptor alpha and enzymes of carnitine biosynthesis in the liver are down-regulated during lactation in rats. *Metabolism* **58**: 226-32.
- Gutgesell A**, Ringseis R, Schmidt E, Brandsch C, Stangl GI, Eder K (2009b) Downregulation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha and its coactivators in liver and skeletal muscle mediates the metabolic adaptations during lactation in mice. *J. Mol. Endocrinol.* **43**: 241-50.
- Haeryfar SM**, Berczi I (2001) The thymus and the acute phase response. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)* **47**: 145-56.
- Harty JT**, Tvinnereim AR, White DW (2000) CD8+ T cell effector mechanisms in resistance to infection. *Annu. Rev. Immunol.* **18**: 275-308.
- Hashimoto T**, Cook WS, Qi C, Yeldandi AV, Reddy JK, Rao MS (2000) Defect in peroxisome proliferator-activated receptor alpha-inducible fatty acid oxidation determines the severity of hepatic steatosis in response to fasting. *J. Biol. Chem.* **275**: 28918-28.

- He CH**, Gong P, Hu B, Stewart D, Choi ME, Choi AM, Alam J (2001) Identification of activating transcription factor 4 (ATF4) as an Nrf2-interacting protein. Implication for heme oxygenase-1 gene regulation. *J. Biol. Chem.* **276**: 20858-65.
- Heo K**, Odle J, Han IK, Cho W, Seo S, van Heugten E, Pilkington DH (2000) Dietary L-carnitine improves nitrogen utilization in growing pigs fed low energy, fat-containing diets. *J. Nutr.* **130**: 1809-14.
- Hiss-Pesch S**, Daniel F, Dunkelberg-Denk S, Mielenz M, Sauerwein H (2011) Transfer of maternal haptoglobin to suckling piglets. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **144**: 104-10.
- Holden PR**, Tugwood JD (1999) Peroxisome proliferator-activated receptor alpha: role in rodent liver cancer and species differences. *J. Mol. Endocrinol.* **22**: 1-8.
- Huang Y**, Krein PM, Muruve DA, Winston BW (2002) Complement factor B gene regulation: synergistic effects of TNF-alpha and IFN-gamma in macrophages. *J. Immunol.* **169**: 2627-35.
- Hwang SM**, Lee YJ, Yoon JJ, Lee SM, Kim JS, Kang DG, Lee HS (2012) *Prunella vulgaris* Suppresses HG-Induced Vascular Inflammation via Nrf2/HO-1/eNOS Activation. *Int. J. Mol. Sci.* **13**: 1258-68.
- Hynes RO** (2002) Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* **110**: 673-87.
- Ichihara S**, Yamada Y, Liu F, Murohara T, Itoh K, Yamamoto M, Ichihara G (2010) Ablation of the transcription factor Nrf2 promotes ischemia-induced neovascularization by enhancing the inflammatory response. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **30**: 1553-61.
- Inagaki T**, Dutchak P, Zhao G, Ding X, Gautron L, Parameswara V, Li Y, Goetz R, Mohammadi M, Esser V, Elmquist JK, Gerard RD, Burgess SC, Hammer RE, Mangelsdorf DJ, Kliewer SA (2007) Endocrine regulation of the fasting response by PPARalpha-mediated induction of fibroblast growth factor 21. *Cell Metab.* **5**: 415-25.
- Jiang L**, Sørensen P, Røntved C, Vels L, Ingvarsen KL (2008) Gene expression profiling of liver from dairy cows treated intra-mammary with lipopolysaccharide. *BMC Genomics* **9**: 443.
- Jiwakanon J**, Persson E, Dalin AM (2006) The endometrium of the anoestrous female pig: studies on infiltration by cells of the immune system. *Reprod. Domest. Anim.* **41**: 191-5.

- Johnson EF**, Hsu MH, Savas U, Griffin KJ (2002) Regulation of P450 4A expression by peroxisome proliferator activated receptors. *Toxicology* **181-182**: 203-6.
- Jung KA**, Kwak MK (2010) The Nrf2 system as a potential target for the development of indirect antioxidants. *Molecules* **15**: 7266-91.
- Kaspar JW**, Niture SK, Jaiswal AK (2009) Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* **47**: 1304-9.
- Kerner J**, Froseth JA, Miller ER, Bieber LL (1984) A study of the acylcarnitine content of sows' colostrum, milk and newborn piglet tissues: demonstration of high amounts of isovalerylcarnitine in colostrum and milk. *J. Nutr.* **114**: 854-61.
- Kersten S**, Seydoux J, Peters JM, Gonzalez FJ, Desvergne B, Wahli W (1999) Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting. *J. Clin. Invest.* **103**: 1489-98.
- Khor TO**, Huang MT, Kwon KH, Chan JY, Reddy BS, Kong AN (2006) Nrf2-deficient mice have an increased susceptibility to dextran sulfate sodium-induced colitis. *Cancer Res.* **66**: 11580-4.
- Kim J**, Cha YN, Surh YJ (2010) A protective role of nuclear factor-erythroid 2-related factor-2 (Nrf2) in inflammatory disorders. *Mutat. Res.* **690**: 12-23.
- Kim SW**, Easter RA (2001) Nutrient mobilization from body tissues as influenced by litter size in lactating sows. *J. Anim. Sci.* **79**: 2179-86.
- Kirchgessner M** (Roth FX/ Schwarz FJ/ Stangl GJ): Tierernährung. Weihenstephan¹²2008.
- Kushner I** (1982) The phenomenon of the acute phase response. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **389**: 39-48.
- Lahjouji K**, Mitchell GA, Qureshi IA (2001) Carnitine transport by organic cation transporters and systemic carnitine deficiency. *Mol. Genet. Metab.* **73**: 287-97.
- Lamhonwah AM**, Mai L, Chung C, Lamhonwah D, Ackerley C, Tein I (2011) Upregulation of mammary gland OCTNs maintains carnitine homeostasis in suckling infants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **404**: 1010-5.

- Laspiur JP**, Burton JL, Weber PS, Moore J, Kirkwood RN, Trottier NL (2009) Dietary protein intake and stage of lactation differentially modulate amino acid transporter mRNA abundance in porcine mammary tissue. *J. Nutr.* **139**: 1677-84.
- Le Cozler Y**, David C, Beaumal V, Johansen S, Dourmad JY (1998) Effect of the feeding level during rearing on performance of Large White gilts. Part 2: Effect on metabolite profiles during gestation and lactation, and on glucose tolerance. *Reprod. Nutr. Dev.* **38**: 377-90.
- Le Jan C** (1994) A study by flow cytometry of lymphocytes in sow colostrum. *Res. Vet. Sci.* **57**: 300-4.
- Lee EK**, Kehrli ME Jr (1998) Expression of adhesion molecules on neutrophils of periparturient cows and neonatal calves. *Am. J. Vet. Res.* **59**: 37-43.
- Lee MJ**, Lee HS, Jung HJ, Lee CS, Kim JE, Moon HI, Park WH (2010) Caesalpinia sappan L. ameliorates hypercholesterolemia in C57BL/6 mice and suppresses inflammatory responses in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) by antioxidant mechanism. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **32**: 671-9.
- Leone TC**, Weinheimer CJ, Kelly DP (1999) A critical role for the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in the cellular fasting response: the PPARalpha-null mouse as a model of fatty acid oxidation disorders. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **96**: 7473-8.
- Li W**, Yu S, Liu T, Kim JH, Blank V, Li H, Kong AN (2008) Heterodimerization with small Maf proteins enhances nuclear retention of Nrf2 via masking the NESzip motif. *Biochim. Biophys. Acta.* **1783**: 1847-56.
- Libermann TA**, Baltimore D (1990) Activation of interleukin-6 gene expression through the NF-kappa B transcription factor. *Mol. Cell Biol.* **10**: 2327-34.
- Liu CY**, Liang LC, Chang LC (1995) Differential responses of hormone-sensitive lipase gene to nutritional transition in adipose tissue, liver, and skeletal muscle of pigs. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **36**: 689-94.
- Loor JJ**, Dann HM, Everts RE, Oliveira R, Green CA, Guretzky NA, Rodriguez-Zas SL, Lewin HA, Drackley JK (2005) Temporal gene expression profiling of liver from

- periparturient dairy cows reveals complex adaptive mechanisms in hepatic function. *Physiol. Genomics*. **23**: 217-26.
- Loor JJ**, Dann HM, Guretzky NA, Everts RE, Oliveira R, Green CA, Litherland NB, Rodriguez-Zas SL, Lewin HA, Drackley JK (2006) Plane of nutrition prepartum alters hepatic gene expression and function in dairy cows as assessed by longitudinal transcript and metabolic profiling. *Physiol. Genomics* **27**: 29-41.
- Loor JJ**, Everts RE, Bionaz M, Dann HM, Morin DE, Oliveira R, Rodriguez-Zas SL, Drackley JK, Lewin HA (2007) Nutrition-induced ketosis alters metabolic and signaling gene networks in liver of periparturient dairy cows. *Physiol. Genomics* **32**: 105-16.
- Luci S**, Geissler S, König B, Koch A, Stangl GI, Hirche F, Eder K (2006) PPARalpha agonists up-regulate organic cation transporters in rat liver cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **350**: 704-8.
- Luci S**, Giemsa B, Hause G, Kluge H, Eder K (2007a) Clofibrate treatment in pigs: effects on parameters critical with respect to peroxisome proliferator-induced hepatocarcinogenesis in rodents. *BMC Pharmacol.* **7**: 6.
- Luci S**, Giemsa B, Kluge H, Eder K (2007b) Clofibrate causes an upregulation of PPAR-{alpha} target genes but does not alter expression of SREBP target genes in liver and adipose tissue of pigs. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **293**: R70-7.
- Luci S**, König B, Giemsa B, Huber S, Hause G, Kluge H, Stangl GI, Eder K (2007c) Feeding of a deep-fried fat causes PPARalpha activation in the liver of pigs as a non-proliferating species. *Br. J. Nutr.* **97**: 872-82.
- Ma Q** (2010) Transcriptional responses to oxidative stress: pathological and toxicological implications. *Pharmacol. Ther.* **125**: 376-93.
- Mandard S**, Müller M, Kersten S (2004) Peroxisome proliferator-activated receptor alpha target genes. *Cell. Mol. Life Sci.* **61**: 393-416.
- Marcolin E**, San-Miguel B, Vallejo D, Tieppo J, Marroni N, González-Gallego J, Tuñón MJ (2012) Quercetin treatment ameliorates inflammation and fibrosis in mice with nonalcoholic steatohepatitis. *J. Nutr.* **142**: 1821-8.

- Mattmiller SA**, Corl CM, Gandy JC, Loor JJ, Sordillo LM (2011) Glucose transporter and hypoxia-associated gene expression in the mammary gland of transition dairy cattle. *J. Dairy Sci.* **94**: 2912-22.
- McCarthy SD**, Waters SM, Kenny DA, Diskin MG, Fitzpatrick R, Patton J, Wathes DC, Morris DG (2010) Negative energy balance and hepatic gene expression patterns in high-yielding dairy cows during the early postpartum period: a global approach. *Physiol. Genomics* **42A**: 188-99.
- McGarry JD**, Brown NF (1997) The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis. *Eur. J. Biochem.* **244**: 1-14.
- McNamara JP** (1994) Lipid metabolism in adipose tissue during lactation: a model of a metabolic control system. *J. Nutr.* **124**: 1383S-91S.
- Mebius RE**, Kraal G (2005) Structure and function of the spleen. *Nat. Rev. Immunol.* **5**: 606-16.
- Medina KL**, Kincade PW (1994) Pregnancy-related steroids are potential negative regulators of B lymphopoiesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **91**: 5382-6.
- Medina KL**, Smithson G, Kincade PW (1993) Suppression of B lymphopoiesis during normal pregnancy. *J. Exp. Med.* **178**: 1507-15.
- Menendez A**, Brett Finlay B (2007) Defensins in the immunology of bacterial infections. *Curr. Opin. Immunol.* **19**: 385-91.
- Mitre R**, Etienne M, Martinais S, Salmon H, Allaume P, Legrand P, Legrand AB (2005) Humoral defence improvement and haematopoiesis stimulation in sows and offspring by oral supply of shark-liver oil to mothers during gestation and lactation. *Br. J. Nutr.* **94**: 753-62.
- Morris DG**, Waters SM, McCarthy SD, Patton J, Earley B, Fitzpatrick R, Murphy JJ, Diskin MG, Kenny DA, Brass A, Wathes DC (2009) Pleiotropic effects of negative energy balance in the postpartum dairy cow on splenic gene expression: repercussions for innate and adaptive immunity. *Physiol. Genomics* **39**: 28-37.

- Moyes KM**, Drackley JK, Morin DE, Loor JJ (2010a) Greater expression of TLR2, TLR4, and IL6 due to negative energy balance is associated with lower expression of HLA-DRA and HLA-A in bovine blood neutrophils after intramammary mastitis challenge with *Streptococcus uberis*. *Funct. Integr. Genomics* **10**: 53-61.
- Moyes KM**, Drackley JK, Morin DE, Rodriguez-Zas SL, Everts RE, Lewin HA, Loor JJ (2010b) Mammary gene expression profiles during an intramammary challenge reveal potential mechanisms linking negative energy balance with impaired immune response. *Physiol. Genomics* **41**: 161-70.
- Nair S**, Doh ST, Chan JY, Kong AN, Cai L (2008) Regulatory potential for concerted modulation of Nrf2- and Nfkb1-mediated gene expression in inflammation and carcinogenesis. *Br. J. Cancer* **99**: 2070-82.
- Noblet J**, Dourmad JY, Etienne M (1990) Energy utilization in pregnant and lactating sows: modeling of energy requirements. *J. Anim. Sci.* **68**: 562-72.
- Noblet J**, Etienne M (1987) Metabolic utilization of energy and maintenance requirements in lactating sows. *J. Anim. Sci.* **64**: 774-81.
- Noblet J**, Etienne M (1989) Estimation of sow milk nutrient output. *J. Anim. Sci.* **67**: 3352-9.
- Nonaka M**, Huang ZM (1990) Interleukin-1-mediated enhancement of mouse factor B gene expression via NF kappa B-like hepatoma nuclear factor. *Mol. Cell Biol.* **10**: 6283-9.
- O'Grady JF**, Lynch PB, Kearney PA (1985) Voluntary feed intake by lactating sows. *Livestock Production Science* **12**: 355-65.
- Pae HO**, Oh GS, Lee BS, Rim JS, Kim YM, Chung HT (2006) 3-Hydroxyanthranilic acid, one of L-tryptophan metabolites, inhibits monocyte chemoattractant protein-1 secretion and vascular cell adhesion molecule-1 expression via heme oxygenase-1 induction in human umbilical vein endothelial cells. *Atherosclerosis* **187**: 274-84.
- Pahl HL** (1999) Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* **18**: 6853-66.

- Pahl HL**, Baeuerle PA (1995) A novel signal transduction pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus is mediated by transcription factor NF-kappa B. *EMBO J.* **14**: 2580-8.
- Pedraza N**, Solanes G, Carmona MC, Iglesias R, Viñas O, Mampel T, Vazquez M, Giralt M, Villarroya F (2000) Impaired expression of the uncoupling protein-3 gene in skeletal muscle during lactation: fibrates and troglitazone reverse lactation-induced downregulation of the uncoupling protein-3 gene. *Diabetes* **49**: 1224-30.
- Pedraza N**, Solanes G, Iglesias R, Vázquez M, Giralt M, Villarroya F (2001) Differential regulation of expression of genes encoding uncoupling proteins 2 and 3 in brown adipose tissue during lactation in mice. *Biochem. J.* **355**: 105-11.
- Pelletier G**, Charbonneau P, Morisset J (1983) Anatomical and biochemical changes of the stomach and duodenum during a reproductive cycle of first-litter sows. *Canadian Journal of Animal Science* **63**: 59-65
- Pelletier G**, de Passillé AM, Bernier-Cardou M, Morisset J (1987) Influence of pregnancy, lactation, litter size and diet energy density on the stomach and intestine of sows. *J. Nutr.* **117**: 1759-66.
- Penn D**, Bobrowski PJ, Zhang L, Schmidt-Sommerfeld E (1997) Neonatal nutritional carnitine deficiency: a piglet model. *Pediatr. Res.* **42**: 114-21.
- Père MC**, Etienne M (2007) Insulin sensitivity during pregnancy, lactation, and postweaning in primiparous gilts. *J. Anim. Sci.* **85**: 101-10.
- Perrone CE**, Shao L, Williams GM (1998) Effect of rodent hepatocarcinogenic peroxisome proliferators on fatty acyl-CoA oxidase, DNA synthesis, and apoptosis in cultured human and rat hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **150**: 277-86.
- Persson-Waller K**, Colditz IG (1998) Expression of surface antigens on blood and mammary leukocytes in lactating and dry ewes. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **62**: 273-8.
- Peters MG**, Ambrus JL Jr, Fauci AS, Brown EJ (1988) The Bb fragment of complement factor B acts as a B cell growth factor. *J. Exp. Med.* **168**: 1225-35.
- Petersen HH**, Nielsen JP, Heegaard PM (2004) Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Vet. Res.* **35**: 163-87.

- Piriou-Guzylack L**, Salmon H (2008) Membrane markers of the immune cells in swine: an update. *Vet. Res.* **39**: 54.
- Quesnel H**, Etienne M, Père MC (2007) Influence of litter size on metabolic status and reproductive axis in primiparous sows. *J. Anim. Sci.* **85**: 118-28.
- Quesnel H**, Meunier-Salaün MC, Hamard A, Guillemet R, Etienne M, Farmer C, Dourmad JY, Père MC (2009) Dietary fiber for pregnant sows: influence on sow physiology and performance during lactation. *J. Anim. Sci.* **87**: 532-43.
- Quesnel H**, Prunier A (1995) Endocrine bases of lactational anoestrus in the sow. *Reprod. Nutr. Dev.* **35**: 395-414.
- Quinlan CL**, Orr AL, Perevoshchikova IV, Treberg JR, Ackrell BA, Brand MD (2012) Mitochondrial complex II can generate reactive oxygen species at high rates in both the forward and reverse reactions. *J. Biol. Chem.* **287**: 27255-64.
- Rakhshandehroo M**, Hooiveld G, Müller M, Kersten S (2009) Comparative Analysis of Gene Regulation by the Transcription Factor PPARα between Mouse and Human. *PLoS ONE* **4**: e6796.
- Rawson P**, Stockum C, Peng L, Manivannan B, Lehnert K, Ward HE, Berry SD, Davis SR, Snell RG, McLauchlan D, Jordan TW (2012) Metabolic proteomics of the liver and mammary gland during lactation. *J. Proteomics* **75**: 4429-35.
- Rebouche CJ**, Seim H (1998) Carnitine metabolism and its regulation in microorganisms and mammals. *Annu. Rev. Nutr.* **18**: 39-61.
- Reeds PJ**, Fjeld CR, Jahoor F (1994) Do the differences between the amino acid compositions of acute-phase and muscle proteins have a bearing on nitrogen loss in traumatic states? *J. Nutr.* **124**: 906-10.
- Revell DK**, Williams IH, Mullan BP, Ranford JL, Smits RJ (1998) Body composition at farrowing and nutrition during lactation affect the performance of primiparous sows: I. Voluntary feed intake, weight loss, and plasma metabolites. *J. Anim. Sci.* **76**: 1729-37.

- Reynolds CK**, Aikman PC, Lupoli B, Humphries DJ, Beever DE (2003) Splanchnic metabolism of dairy cows during the transition from late gestation through early lactation. *J. Dairy Sci.* **86**: 1201-17.
- Richert L**, Price S, Chesne C, Maita K, Carmichael N (1996) Comparison of the induction of hepatic peroxisome proliferation by the herbicide oxadiazon in vivo in rats, mice, and dogs and in vitro in rat and human hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **141**: 35-43.
- Ringseis R**, Heller K, Kluge H, Eder K (2011) mRNA expression of genes involved in fatty acid utilization in skeletal muscle and white adipose tissues of sows during lactation. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* **158**: 450-4.
- Ringseis R**, Pösel S, Hirche F, Eder K (2007) Treatment with pharmacological peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonist clofibrate causes upregulation of organic cation transporter 2 in liver and small intestine of rats. *Pharmacol. Res.* **56**: 175-83.
- Ringseis R**, Wege N, Wen G, Rauer C, Hirche F, Kluge H, Eder K (2009) Carnitine synthesis and uptake into cells are stimulated by fasting in pigs as a model of nonproliferating species. *J. Nutr. Biochem.* **20**: 840-7.
- Ringseis R**, Wen G, Eder K (2012) Regulation of Genes Involved in Carnitine Homeostasis by PPAR α across Different Species (Rat, Mouse, Pig, Cattle, Chicken, and Human). *PPAR Res.* **2012**: 868317.
- Santos CX**, Tanaka LY, Wosniak J, Laurindo FR (2009) Mechanisms and implications of reactive oxygen species generation during the unfolded protein response: roles of endoplasmic reticulum oxidoreductases, mitochondrial electron transport, and NADPH oxidase. *Antioxid. Redox Signal.* **11**: 2409-27.
- Sastry SK**, Burridge K (2000) Focal adhesions: a nexus for intracellular signaling and cytoskeletal dynamics. *Exp. Cell Res.* **261**: 25-36.
- Sauber TE**, Stahly TS, Nonnecke BJ (1999) Effect of level of chronic immune system activation on the lactational performance of sows. *J. Anim. Sci.* **77**: 1985-93.
- Sauber TE**, Stahly TS, Williams NH, Ewan RC (1998) Effect of lean growth genotype and dietary amino acid regimen on the lactational performance of sows. *J. Anim. Sci.* **76**: 1098-111.

- Schlegel G**, Keller J, Hirche F, Geißler S, Schwarz FJ, Ringseis R, Stangl GI, Eder K (2012a) Expression of genes involved in hepatic carnitine synthesis and uptake in dairy cows in the transition period and at different stages of lactation. *BMC Vet. Res.* **8**: 28.
- Schlegel G**, Ringseis R, Keller J, Schwarz FJ, Windisch W, Eder K (2012b) Expression of fibroblast growth factor 21 in the liver of dairy cows in the transition period and during lactation. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl)*. [Epub ahead of print]
- Schröder M**, Kaufman RJ (2005) The mammalian unfolded protein response. *Annu. Rev. Biochem.* **74**: 739-89.
- Schumann RR** (1995) Mechanisms of transcriptional activation of lipopolysaccharide binding protein (LBP). *Prog. Clin. Biol. Res.* **392**: 297-304.
- Schumann RR**, Leong SR, Flaggs GW, Gray PW, Wright SD, Mathison JC, Tobias PS, Ulevitch RJ (1990) Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science* **249**: 1429-31.
- Schwartz MA**, Ginsberg MH (2002) Networks and crosstalk: integrin signalling spreads. *Nat. Cell Biol.* **4**: E65-8.
- Shennan DB**, Peaker M (2000) Transport of milk constituents by the mammary gland. *Physiol. Rev.* **80**: 925-51.
- Shields RG Jr**, Mahan DC (1983) Effects of pregnancy and lactation on the body composition of first-litter female swine. *J. Anim. Sci.* **57**: 594-603.
- Shimizu H**, Mitomo K, Watanabe T, Okamoto S, Yamamoto K (1990) Involvement of a NF-kappa B-like transcription factor in the activation of the interleukin-6 gene by inflammatory lymphokines. *Mol. Cell Biol.* **10**: 561-8.
- Smith MS**, Grove KL (2002) Integration of the regulation of reproductive function and energy balance: lactation as a model. *Frontiers in Neuroendocrinology* **23**: 225-56.
- Smith TR**, McNamara JP (1990) Regulation of bovine adipose tissue metabolism during lactation. 6. Cellularity and hormone-sensitive lipase activity as affected by genetic merit and energy intake. *J. Dairy Sci.* **73**: 772-83.

- Sorrells AD**, Eicher SD, Harris MJ, Pajor EA, Richert BT (2007) Periparturient cortisol, acute phase cytokine, and acute phase protein profiles of gilts housed in groups or stalls during gestation. *J. Anim. Sci.* **85**: 1750-7.
- Spertini O**, Luscinskas FW, Kansas GS, Munro JM, Griffin JD, Gimbrone MA Jr, Tedder TF (1991) Leukocyte adhesion molecule-1 (LAM-1, L-selectin) interacts with an inducible endothelial cell ligand to support leukocyte adhesion. *J. Immunol.* **147**: 2565-73.
- Spincer J**, Rook JA, Towers KG (1969) The uptake of plasma constituents by the mammary gland of the sow. *Biochem. J.* **111**: 727-32.
- Strijbis K**, Vaz FM, Distel B (2010) Enzymology of the carnitine biosynthesis pathway. *IUBMB Life* **62**: 357-62.
- Suffredini AF**, Fantuzzi G, Badolato R, Oppenheim JJ, O'Grady NP (1999) New insights into the biology of the acute phase response. *J. Clin. Immunol.* **19**: 203-14.
- Sulila P**, Mattsson R (1990) Humoral immune activity in CBA/Ca mice during late pregnancy and the post-partum period. *J. Reprod. Immunol.* **18**: 259-69.
- Tamai I**, Ohashi R, Nezu J, Yabuuchi H, Oku A, Shimane M, Sai Y, Tsuji A (1998) Molecular and functional identification of sodium ion-dependent, high affinity human carnitine transporter OCTN2. *J. Biol. Chem.* **273**: 20378-82.
- Taylor BC**, Dellinger JD, Cullor JS, Stott JL (1994a) Bovine milk lymphocytes display the phenotype of memory T cells and are predominantly CD8+. *Cell Immunol.* **156**: 245-53.
- Taylor BC**, Mattapallil J, Moore PF, Scibienski RJ, Stott JL (1994b) Characterization of a novel bovine leukocyte protein involved in cell-cell adhesion. *Tissue Antigens* **44**: 252-60.
- Theil PK**, Labouriau R, Sejrsen K, Thomsen B, Sørensen MT (2005) Expression of genes involved in regulation of cell turnover during milk stasis and lactation rescue in sow mammary glands. *J. Anim. Sci.* **83**: 2349-56.
- Theilgaard-Mönch K**, Jacobsen LC, Nielsen MJ, Rasmussen T, Udby L, Gharib M, Arkwright PD, Gombart AF, Calafat J, Moestrup SK, Porse BT, Borregaard N (2006)

- Haptoglobin is synthesized during granulocyte differentiation, stored in specific granules, and released by neutrophils in response to activation. *Blood* **108**: 353-61.
- Thompson RD**, Wakelin MW, Larbi KY, Dewar A, Asimakopoulos G, Horton MA, Nakada MT, Nourshargh S (2000) Divergent effects of platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 and beta 3 integrin blockade on leukocyte transmigration in vivo. *J. Immunol.* **165**: 426-34.
- Tkachev VO**, Menshchikova EB, Zenkov NK (2011) Mechanism of the Nrf2/Keap1/ARE signaling system. *Biochemistry (Mosc.)* **76**: 407-22.
- Toner MS**, King RH, Dunshea FR, Dove H, Atwood CS (1996) The effect of exogenous somatotropin on lactation performance of first-litter sows. *J. Anim. Sci.* **74**: 167-72.
- Trayhurn P**, Douglas JB, McGuckin MM (1982) Brown adipose tissue thermogenesis is 'suppressed' during lactation in mice. *Nature* **298**: 59-60.
- Trevisi E**, Amadori M, Cogrossi S, Razzuoli E, Bertoni G (2012) Metabolic stress and inflammatory response in high-yielding, periparturient dairy cows. *Res. Vet. Sci.* **93**: 695-704.
- Tripathy D**, Mohanty P, Dhindsa S, Syed T, Ghanim H, Aljada A, Dandona P (2003) Elevation of free fatty acids induces inflammation and impairs vascular reactivity in healthy subjects. *Diabetes* **52**: 2882-7.
- Trottier NL**, Easter RA (1995) Dietary and plasma branched-chain amino acids in relation to tryptophan: effect on voluntary feed intake and lactation metabolism in the primiparous sow. *J. Anim. Sci.* **73**: 1086-92.
- Uskoković A**, Dinić S, Mihailović M, Grdović N, Arambašić J, Vidaković M, Bogojević D, Ivanović-Matić S, Martinović V, Petrović M, Poznanović G, Grigorov I (2012) STAT3/NF-κB interactions determine the level of haptoglobin expression in male rats exposed to dietary restriction and/or acute phase stimuli. *Mol. Biol. Rep.* **39**: 167-76.
- van den Brand H**, Heetkamp MJ, Soede NM, Schrama JW, Kemp B (2000) Energy balance of lactating primiparous sows as affected by feeding level and dietary energy source. *J. Anim. Sci.* **78**: 1520-8.

- van Dorland HA**, Richter S, Morel I, Doherr MG, Castro N, Bruckmaier RM (2009) Variation in hepatic regulation of metabolism during the dry period and in early lactation in dairy cows. *J. Dairy Sci.* **92**: 1924-40.
- Van Kampen C**, Mallard BA (1997) Effects of peripartum stress and health on circulating bovine lymphocyte subsets. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **59**: 79-91.
- Vaz FM**, Wanders RJ (2002) Carnitine biosynthesis in mammals. *Biochem. J.* **361**: 417-29.
- Vels L**, Røntved CM, Bjerring M, Ingvartsen KL (2009) Cytokine and acute phase protein gene expression in repeated liver biopsies of dairy cows with a lipopolysaccharide-induced mastitis. *J. Dairy Sci.* **92**: 922-34.
- Venugopal R**, Jaiswal AK (1998) Nrf2 and Nrf1 in association with Jun proteins regulate antioxidant response element-mediated expression and coordinated induction of genes encoding detoxifying enzymes. *Oncogene* **17**: 3145-56.
- Verheyen AJ**, Maes DG, Mateusen B, Deprez P, Janssens GP, de Lange L, Counotte G (2006) Serum biochemical reference values for gestating and lactating sows. *Vet. J.* **174**: 92-8.
- Vernon RG** (2005) Lipid metabolism during lactation: a review of adipose tissue-liver interactions and the development of fatty liver. *J. Dairy Res.* **72**: 460-9.
- Vernon RG**, Denis RGP, Sorensen A, Williams G (2002) Leptin and the adaptations to lactation in rodents and ruminants. *Hormone and Metabolic Research* **34**: 678-85.
- Wada Y**, Saito T, Matsuda N, Ohmoto H, Yoshino K, Ohashi M, Kondo H, Ishida H, Kiso M, Hasegawa A (1996) Studies on selectin blockers. 2. Novel selectin blocker as potential therapeutics for inflammatory disorders. *J. Med. Chem.* **39**: 2055-9.
- Walters AH**, Pryor AW, Bailey TL, Pearson RE, Gwazdauskas FC (2002) Milk yield, energy balance, hormone, follicular and oocyte measures in early and mid-lactation Holstein cows. *Theriogenology* **57**: 949-61.
- Wathes DC**, Fenwick M, Cheng Z, Bourne N, Llewellyn S, Morris DG, Kenny D, Murphy J, Fitzpatrick R (2007) Influence of negative energy balance on cyclicity and fertility in the high producing dairy cow. *Theriogenology* **68**: S232-41.

- Weldon WC**, Lewis AJ, Louis GF, Kovar JL, Giesemann MA, Miller PS (1994) Postpartum hypophagia in primiparous sows: I. Effects of gestation feeding level on feed intake, feeding behavior, and plasma metabolite concentrations during lactation. *J. Anim. Sci.* **72**: 387-94.
- Wen G**, Kühne H, Rauer C, Ringseis R, Eder K (2011) Mouse γ -butyrobetaine dioxygenase is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor α through a PPRE located in the proximal promoter. *Biochem. Pharmacol.* **82**: 175-83.
- Wen G**, Ringseis R, Eder K (2010) Mouse OCTN2 is directly regulated by peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) via a PPRE located in the first intron. *Biochem. Pharmacol.* **79**: 768-76.
- Wen G**, Ringseis R, Rauer C, Eder K (2012) The mouse gene encoding the carnitine biosynthetic enzyme 4-N-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor α . *Biochim. Biophys. Acta.* **1819**: 357-65.
- Wirt DP**, Adkins LT, Palkowetz KH, Schmalstieg FC, Goldman AS (1992) Activated and memory T lymphocytes in human milk. *Cytometry* **13**: 282-90.
- Wu S**, Tan M, Hu Y, Wang JL, Scheuner D, Kaufman RJ (2004) Ultraviolet light activates NFkappaB through translational inhibition of IkappaBalpha synthesis. *J. Biol. Chem.* **279**: 34898-902.
- Xiao XQ**, Grove KL, Smith MS (2004) Metabolic adaptations in skeletal muscle during lactation: complementary deoxyribonucleic acid microarray and real-time polymerase chain reaction analysis of gene expression. *Endocrinology* **145**: 5344-54.
- Yu AL**, Lu CY, Wang TS, Tsai CW, Liu KL, Cheng YP, Chang HC, Lii CK, Chen HW (2010) Induction of heme oxygenase 1 and inhibition of tumor necrosis factor alpha-induced intercellular adhesion molecule expression by andrographolide in EA.hy926 cells. *J. Agric. Food Chem.* **58**: 7641-8.
- Zhang D**, Jiang SL, Rzewnicki D, Samols D, Kushner I (1995) The effect of interleukin-1 on C-reactive protein expression in Hep3B cells is exerted at the transcriptional level. *Biochem. J.* **310**: 143-8.

Zhang WY, Schwartz E, Wang Y, Attrep J, Li Z, Reaven P (2006) Elevated concentrations of nonesterified fatty acids increase monocyte expression of CD11b and adhesion to endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **26**: 514-9.

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation **„Untersuchungen zu genomweiten Veränderungen der Genexpression in der Leber von Sauen während der Laktation“** selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe.

Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht.

Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der ‚Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis‘ niedergelegt sind, eingehalten.“

Gießen, August 2013

.....
Susann Rosenbaum

Danksagung

Mein Dank richtet sich in erster Linie an Herrn Prof. Dr. Klaus Eder für die Möglichkeit am Institut für Tierernährung und Ernährungsphysiologie meine Dissertation anzufertigen. Des Weiteren möchte ich ihm für die Vergabe des interessanten Forschungsthemas und die konstruktive Betreuung danken.

Besonders herzlich möchte ich zudem Herrn Dr. habil. Robert Ringseis für seine fortwährende Unterstützung wissenschaftliche Fragestellungen betreffend und die kritische Durchsicht und hilfreichen Anmerkungen zur Anfertigung dieser Dissertationsschrift danken. Dies hat in großem Maße zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Des Weiteren möchte ich mich für die gewinnbringenden fachlichen Gespräche und sein immerzu freundschaftliches Entgegenkommen bedanken.

Ebenso danke ich den Tierpflegern des Instituts für Tierernährung für die tatkräftige praktische Unterstützung bei der Durchführung des Versuchsvorhabens. Den Mitarbeitern der Klinik für Schweine der Universität Gießen möchte ich für die kooperative und freundliche Zusammenarbeit danken. Mein Dank gilt zudem den Mitarbeitern der Lehr- und Forschungsstation Oberer Hardthof, welche durch ihren engagierten Einsatz zu diesem Projekt beigetragen haben.

Weiterhin richtet sich mein Dank an die Mitarbeiter/innen und Doktoranden des Institutes für Tierernährung und Ernährungsphysiologie, die mir im Rahmen meines Versuchsvorhabens mit Rat und Tat zur Seite standen. Auch für die freundschaftlichen und hilfreichen Gespräche während meiner Promotionszeit bin ich ihnen sehr dankbar.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich für die fortwährende mentale Unterstützung während meiner Promotionszeit.

Die vorliegende Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) finanziell unterstützt (ED 70/9-1).