

# Acetonemie bij runderen

Een biochemische benadering van de  
pathogenese van acetonemie bij runderen

drs. Peter R. Hut

Faculteit  
Diergeneeskunde

Universiteit Utrecht

Onder begeleiding van:  
Drs. S. G. A. van der Drift  
Dr. R. Jorritsma  
Dr. M. Houweling  
Prof. Dr. A.G.M. Tielens

Utrecht  
Januari – augustus  
**2011**

Departement Biochemie & Celbiologie  
Departement Landbouwhuisdieren

**Onderzoekstage**

## Inhoudsopgave

---

Voorwoord	2
Hoofdstuk 1 Inleiding	3
Hoofdstuk 2 Literatuuronderzoek	
- Lipolyse	7
- Adipose Triglyceride Lipase (ATGL)	7
- Hormone Sensitive Lipase (HSL)	8
- Perilipine (PLIN)	8
- Peroxisome Proliferator-activated Receptor $\gamma$ (PPAR $\gamma$ )	10
- Phosphodiesterase 3 $\beta$ (PDE3B)	10
- B-hydroxy-butyraat Receptor (GPR109A)	11
Hoofdstuk 3 Keuze en verantwoording van de primers	12
Hoofdstuk 4 Polymerase Chain reaction (PCR)	15
Hoofdstuk 5 Biochemisch onderzoek	
- Het testen van de primers	16
- De patiënten en de controle	18
- De resultaten	20
Discussie	24
Nawoord en dankzegging	26
Bijlagen	
1. Sequenties en primers	27
2. Protocollen laboratorium	
a. Protocol zuiveren RNA uit leverweefsel	39
b. Protocol zuiveren RNA uit vetweefsel, user developed protocol	40
c. Protocol zuiveren RNA uit vetweefsel, Qiagen protocol, lipid tissue kit	41
d. Protocol cDNA maken uit RNA	42
e. Protocol PCR	43
f. Protocol elektroforese	45
3. Rapport oligonucleotidesynthese primers	46
Bibliografie	47

## Voorwoord

---

Na het behalen van mijn doctoraal in augustus 2010 is een wachttijd van 11 maanden voor de co-schappen aan het begin lastig te overzien, maar na contact met de juiste personen kan hier toch een meer dan zinnige invulling aan worden gegeven. Na een productief gesprek met dr. R. Jorritsma werd ik geïntroduceerd in het promotieonderzoek van drs. S.G.A. van der Drift.

Slepende melkziekte was bij mij bekend als een veel voorkomende stofwisselingsziekte met mogelijk catastrofale gevolgen, maar met relatief weinig middelen redelijk goed te verhelpen. Toch vind ik het vreemd dat er, niet alleen voor deze aandoening, niet bekend is wat de onderliggende oorzaak is of wat er biochemisch verandert. Samen met mijn begeleiders prof. dr. A.G.M. Tielens en dr. M. Houweling hebben we een voor een onderzoekstage zeer uitgebreid onderzoek opgezet en uitgevoerd om te kijken wat de biochemische achtergrond is van acetonaemie bij lacterende runderen met behulp van PCR. Op basis van het literatuuronderzoek en na overleg hebben we gekozen voor 6 enzymen, receptoren of genen die betrokken zijn bij de lipolyse. De verwachting was dat er één of meerdere enzymen een veranderde expressie zouden tonen in het verloop van de ontwikkeling naar slepende melkziekte.

Het idee achter dit onderzoek is tweeledig. Ten eerste is het doel het opzetten van een analyse om vanuit de literatuur te bepalen welke biochemische componenten invloed uit kunnen oefenen op de veranderende lipolyse rondom de partus. Ten tweede is het doel het opzetten van een biochemische analyse om de veranderingen in de expressie die optreden vanaf de periode voor het afkalven tot en met de eerste verschijnselen van acetonaemie aan te tonen.

Uit de literatuur blijkt dat dit de eerste studie is die zo uitgebreid kijkt naar verschillende enzymen met betrekking tot de lipolyse in vetweefsel bij runderen.

Voor het tweede onderdeel van deze studie zijn vetbiopten gebruikt welke reeds waren geogost door drs. S.G.A. van der Drift na een selectie op de kliniek van de faculteit Diergeneeskunde te Utrecht. Alvorens hiermee aan de slag te gaan dienden eerst primers te worden gezocht of ontworpen en vervolgens dienden deze te worden getest op hun werkzaamheid. Twee primers, de primer voor phosphodiesterase 3 $\beta$  en de primer voor  $\beta$ -hydroxybutyraat receptor GPR109A, waren nog niet eerder gebruikt dus deze hebben we zelf op basis van de sequentie ontworpen of op basis van de bekende sequentie van de rat omgezet naar de sequentie van het rund en daarop de primers ontworpen. Na het bestellen van de primers hebben we eerst de werkzaamheid getest op leverweefsel. Omdat niet elk enzym tot expressie komt in leverweefsel moest er toch nog vetweefsel worden gebruikt om de enzymen te testen. Uiteindelijk bleken alleen de primers van PDE3B niet werkzaam. Ten slotte kon het uiteindelijke onderzoek worden gestart met de vetbiopten die ingevroren waren opgeslagen. De resultaten bleken niet eenduidig en zoals de meeste onderzoeken leverde dit weer meer vragen op dan antwoorden. Alleen bij ATGL en bij PPAR $\gamma$  leek er een duidelijk verloop van de expressie in de periode voor de partus tot en met de eerste verschijnselen van acetonaemie.

## Hoofdstuk 1 Inleiding

---

Slepde melkziekte, acetonaemie, is de meest voorkomende metabole aandoening bij melkgevend rundvee in aansluiting op de partus. Na de partus komt de melkproductie abrupt op gang en de hoeveelheid energie die hiervoor nodig is, is dusdanig groot dat het niet met een hogere voeropname kan worden gecompenseerd. De melkproductie heeft energetisch 'voorrang' op andere metabole processen in het rund, waardoor het rund eigen reserves zal gaan verbruiken om aan de energetische vraag van de toegenomen melkproductie te voldoen. Deze energetische onbalans, de negatieve energiebalans ofwel NEB, kan dusdanige vormen aannemen dat het rund ziekteverschijnselen vertoont. Een negatieve energiebalans post partum is een fysiologisch proces, maar het is een compensatiemechanisme welke bedoeld is voor de korte termijn. Normaal gesproken zal het rund de energiebehoefte met een toenemende voeropname zelf recht moeten trekken. Door de toenemende mate van vetafbraak, lipolyse, en de stijgende vraag naar energie voor de melkproductie neemt de productie van ketonlichamen, de ketogenese, toe. Dit resulteert biochemisch in een ketose. Dit betekent dat er een te hoge concentratie aan ketonlichamen in het bloed circuleert. Afhankelijk van de mate van ernst van de ketose is er onderscheid te maken in twee verschillende uitingen of stadia van slepde melkziekte te weten; een subklinische slepde melkziekte en een klinische slepde melkziekte. Bij acetonaemie is het compensatiemechanisme uiteindelijk niet toereikend om de melkproductie op peil te houden. Het afbreken van de eigen lichaamsreserves kent zijn grenzen en wanneer deze grenzen worden bereikt zal de melkproductie zienderogen afnemen.

Een daling van de melkproductie is slechts één van de verschijnselen van acetonaemie. Runderen met acetonaemie hebben ook een verminderde eetlust, ze hebben een voorkeur voor ruwvoer boven krachtvoer, er treedt gewichtsverlies op, de penscontracties zijn zwakker in kracht en minder in aantal en de mest is droog. De waarden van de ademhaling, pols en temperatuur vallen over het algemeen binnen de referentiewaarden. In een verder gevorderd stadium kan een nerveuze acetonaemie optreden. De bijkomende verschijnselen zijn loze kauwbewegingen, rillen, speekselen, hangen en duwen tegen de stalmuren, atactische bewegingen, likzucht en hyperesthesie.

Vanuit biochemisch oogpunt komen alle melkgevende runderen na de partus in een negatieve energiebalans. Er is geen rund wat instantaan de gestegen behoefte aan energie voor de relatief grote melkproductie met een verhoogde voeropname kan couperen. Dit impliceert dat elk rund na de partus in een metabole onbalans komt en ziekteverschijnselen vertoont. Echter, er zijn veel runderen die geen klinische verschijnselen vertonen en zich in de subklinische acetonaemie bevinden. Het is onduidelijk waarom sommige runderen in de subklinische acetonaemie blijven en opknappen zonder verschijnselen terwijl andere runderen in de klinische acetonaemie geraken met alle verschijnselen van dien.

Mogelijk is het verschil te verklaren in de regulatie van de lipolyse. Normaal gesproken wordt de lipolyse door middel van negatieve feedback geremd, maar door de metabole 'voorrang' die de melkproductie krijgt, zou de remming van de lipolyse onderdrukt kunnen worden, wat de ketogenese zal stimuleren.

Gedurende de lipolyse worden, in het vetweefsel, triacylglycerolmoleculen gesplitst in een glycerolmolecuul die wordt gebruikt voor de gluconeogenese en drie vetzuurmoleculen die in het bloed worden gebonden aan albumine. De gebonden vetzuurmoleculen worden enerzijds getransporteerd naar de lever alwaar deze moleculen via de  $\beta$ -oxidatie worden afgebroken tot acetyl-CoA en anderzijds naar de rest van het lichaam voor ATP-productie. Acetyl-CoA wordt vervolgens gebruikt enerzijds in de ketogenese voor de productie van de

ketonlichamen aceto-acetaat,  $\beta$ -hydroxybutyraat en aceton, en anderzijds in de Krebs-cyclus. Door een verhoogde lipolyse treedt een ketose op. Naast een ketose kan er een stapeling van triacylglycerolen in de lever optreden vanwege de grote vetzuurmobilisatie, met een leververvetting als gevolg.

De huidige therapie van acetonaemie is gestaafd op, simplistisch weergegeven, het herstructureren van de metabole onbalans. De therapie, bestaande uit het verstrekken van glucose of glucogene precursors, heeft als gevolg dat de lipolyse en ketogenese worden geremd en de gluconeogenese en de glycolyse worden bevorderd. Het moet worden gezien als een correctie van het metabolisme waarna het rund aansluitend meer voer op zal nemen waardoor de glucosevoorziening van het dier verbetert opdat het rund niet de eigen lichaamsreserves uitput. De voeropname wordt namelijk geremd door het circuleren van ketonlichamen en VLDL's (very low density lipoproteins) in het bloed. Hierdoor is er bij acetonaemie een vicieuze cirkel bereikt waar het rund zonder interventie niet uit zal komen. Het doel van dit onderzoek is om te bepalen of bepaalde eiwitten en enzymen die betrokken zijn in de lipolyse, afwijkend zijn bij koeien met acetonaemie. Uit bovenstaande wordt verwacht dat er verschillen zullen zijn in de aanwezigheid, hoeveelheid en expressie van deze eiwitten en enzymen tussen runderen met een klinische acetonaemie en een subklinische acetonaemie vergeleken met de droogstandsituatie. Hieruitvolgend is de volgende hypothese geformuleerd:

### Hypothese

Bij koeien met acetonaemie is de expressie verstoord van één of meerdere enzymen betrokken bij de afbraak van triacylglycerolen en de regulatie ervan.

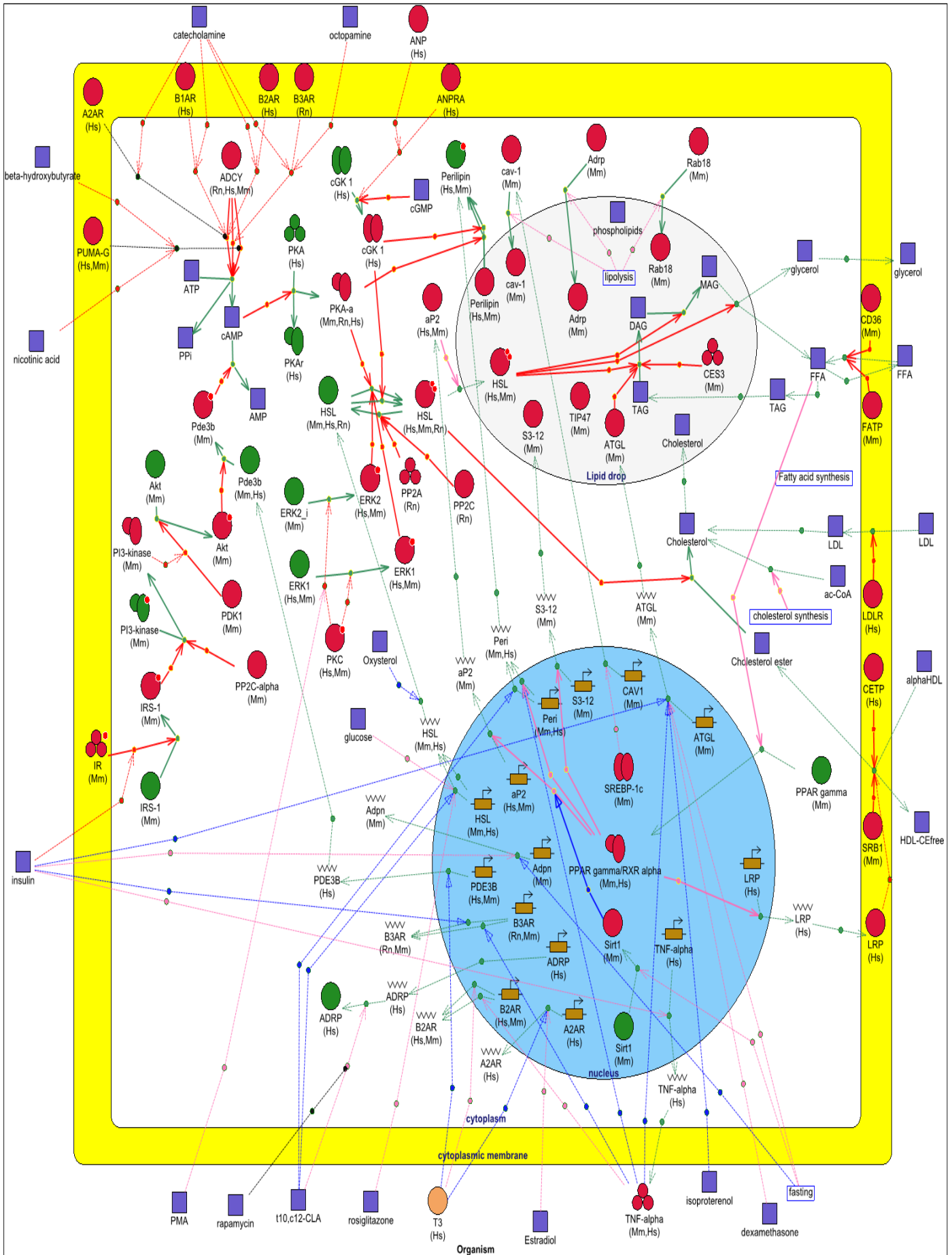


Fig.1 Volledige lipolyse <http://www.mqs.bionet.nsc.ru/mqs/qnw/qenonet/viewer/AdipocyteLipolysis.html>

De volledige lipolyse, zoals deze schematisch in figuur 1 staat weergegeven, is zeer uitgebreid. Voor dit onderzoek is het niet uitvoerbaar om elk enzym, eiwit of gen betrokken bij de lipolyse, biochemisch te bepalen. Daarom staat figuur 2 hieronder, deze is gebaseerd op de figuur van de lipolyse uit het Exellent Tracé onderzoek van drs. R. Everts uit 2008, aangevuld met de metabole paden van perilipine.

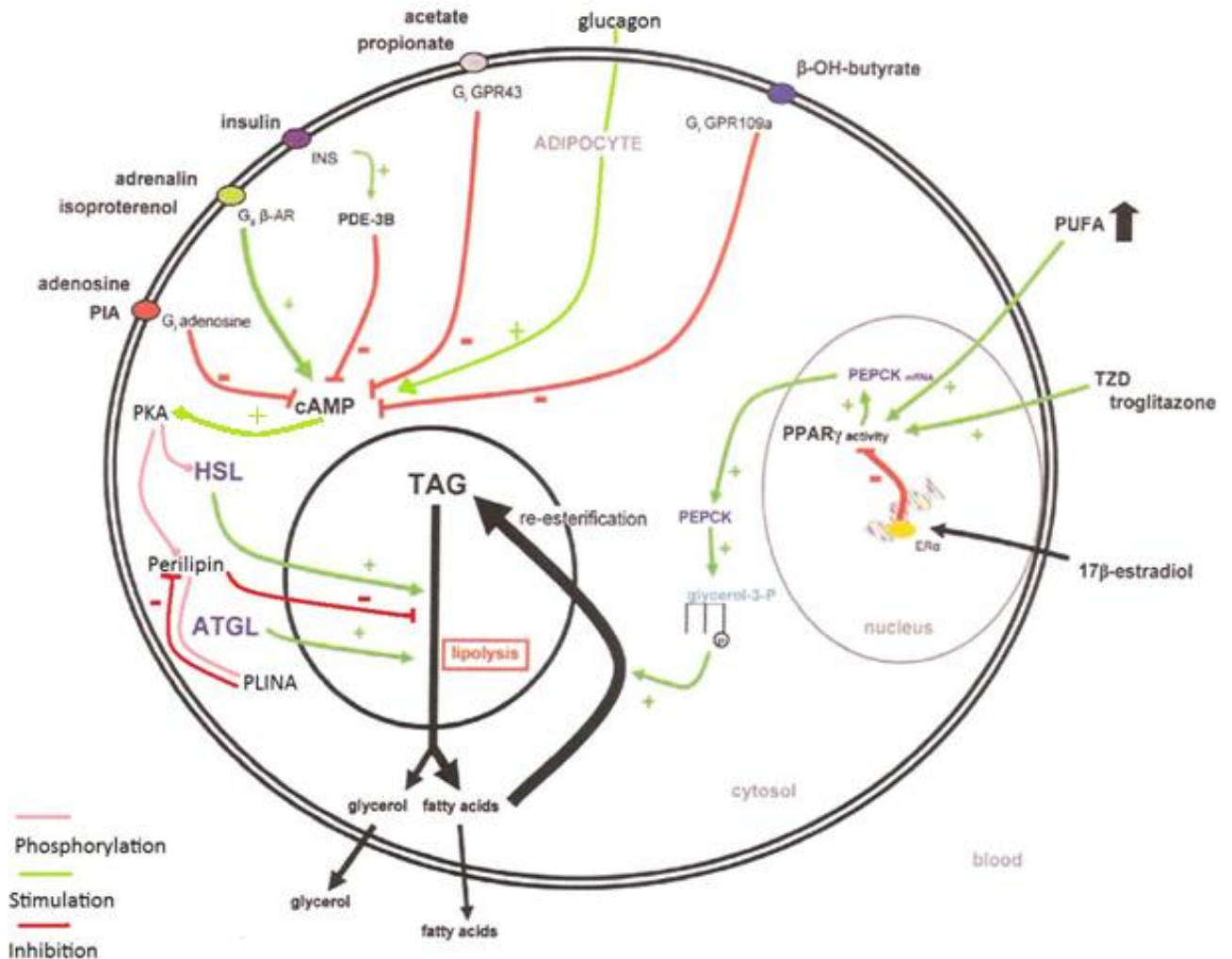


Fig.2 Lipolyse gesimplificeerd, gebaseerd op Everts 2008

In figuur 2 is de lipolyse gesimplificeerd en in grote lijnen weergegeven. Zoals uit figuur 2 valt af te leiden, zijn er bepaalde eiwitten en enzymen die de lipolyse reguleren. In dit onderzoek zal de nadruk worden gelegd op de volgende eiwitten en enzymen, die vervolgens zullen worden toegelicht:

- Adipose Triglyceride Lipase (ATGL)
- Hormone Sensitive Lipase (HSL)
- Perilipine (PLIN, PLIN A)
- Peroxisome Proliferator-activated Receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ )
- Phosphodiesterase 3  $\beta$  (PDE3B)
- B-hydroxy butyraat receptor (BHBA-receptor GPR109A)

### Lipolyse

De transitieperiode bij runderen van dracht naar lactatie is een periode van metabole stress [10] en een kritieke periode voor de gezondheid en productie [23]. Van oudsher, en nu nog, wordt de conditie van de koe vaak gemeten door het systeem van de Body Condition Score (BCS). De BCS geeft een goede weergave van de proporties van lichaamsvet van het rund. De BCS is een belangrijke factor in het dagelijkse management van melkgevend rundvee [26]. De enorme toename van melkproductie en een niet evenredige toename in voeropname resulteert in een negatieve energiebalans en mobilisatie van lichaamsvet.

Wanneer de vraag naar energie hoger is dan geboden, wordt de lipolyse geactiveerd door hormonen zoals catecholamines en insuline. Interactie vindt vervolgens plaats met G-eiwit gekoppelde receptoren,  $\beta$ -adrenerge receptoren op adipocyten, waardoor de concentratie cAMP in de adipocyt toeneemt [38, 40]. Hierdoor wordt proteïne kinase A (PKA) geactiveerd. PKA fosforyleert vervolgens HSL en perilipin A [38]. Echter, er is gebleken dat bij muizen waar HSL werd geblokkeerd er geen obese muizen ontstonden [39], hetgeen het bewijs leverde dat HSL niet de enige aanwezige lipase kon zijn. Wel vindt er bij muizen een diacylglycerolstapeling plaats wanneer er een HSL-deficiëntie is [41].

Globaal verloopt de lipolyse als volgt: Triacylglycerol (TAG) wordt afgebroken tot diacylglycerol (DAG) onder invloed van ATGL. Vervolgens zorgt HSL ervoor dat DAG wordt afgebroken in monoacylglycerol (MAG). MAG wordt door monoglyceridelipase afgebroken tot glycerol en een enkel vetzuur [18].

Hoewel er steeds meer mogelijkheden zijn om slepende melkziekte bij runderen aan te tonen met behulp van bloed- en/of melkmonsters [20, 36] en in de loop der jaren steeds meer aandacht is besteed aan de overgang van voerverandering rondom de partus, is er nog steeds weinig bekend over de biochemische grondslag van deze metabole aandoening.

### Adipose Triglyceride Lipase (ATGL)

Adipose triglyceride lipase werkt als een triacylglycerollipase in de lipolyse bij rundvee [37]. ATGL is een vrij recent ontdekte lipase die de eerste ester-binding van triacylglycerol (TAG) hydrolyseert [38]. ATGL bevindt zich in hoge concentraties in vetweefsel en in weefsel met vetopslag zoals de lever [39]. De lipolyse, waar als eerste TAG wordt afgebroken tot DAG, heeft deze stap als snelheidsbepalende stap, welke wordt bepaald door ATGL. Tevens is ATGL nodig voor PKA-gestimuleerde vetzuurmobilisatie [38, 41]. DAG wordt vervolgens gehydrolyseerd door Hormone-sensitive lipase (HSL). HSL heeft een hogere affiniteit voor DAG dan voor TAG.

Het blijkt dat alle PKA gestimuleerde vetzuurmobilisatie en glycerolmobilisatie afhankelijk is van de activiteit van ATGL in embryonale fibroblasten van muizen, waaruit volgt dat Perilipin A de ATGL-afhankelijke lipolyse reguleert. Bij perilipin knock-out muizen worden ATGL en HSL in overvloed geproduceerd [40]. ATGL wordt door vasten meer tot expressie gebracht dan HSL. Een overexpressie van ATGL heeft er toe geleid dat er een hogere concentratie aan glycerol en nonesterified fatty acids (NEFAs) circuleerden en een knock-out van ATGL leidde tot het omgekeerde. Insuline heeft een niet te verwaarlozen invloed op de lipolyse, een hogere insuline-concentratie leidt tot een lagere ATGL-expressie en vice versa [30].

De bovine primers die reeds in de literatuur gebruikt zijn voor de PCR van ATGL zijn als volgt [37]:



Primer	Sequentie	Grootte bp	GenBank
ATGL-F1 ATGL-R1	5'-CCGCGATGTTCCCAAGGAGA-3' 5'-AAGCGGAGGCCATCCCTGTA-3'	742	FJ897536
ATGL-F2 ATGL-R2	5'-GTGGACGGTGGCATCTCAGA-3' 5'-CCTTAGCAAGGGGGCGAGCT-3'	983	FJ897536
ATGL-F2 ATGL-R1	5'-GTGGACGGTGGCATCTCAGA-3' 5'-AAGCGGAGGCCATCCCTGTA-3'	251	FJ897536

### Hormone Sensitive Lipase (HSL)

De naam HSL komt voort uit het feit dat dit enzym wordt beïnvloed door insuline en catecholaminen [28]. Uit het artikel van Sumner en McNamara blijkt dat in de transitieperiode en tijdens de periode in een negatieve energiebalans, de expressie van HSL toeneemt naarmate de negatieve energiebalans toeneemt [10]. HSL is de meest bepalende lipase in de lipolyse die onder andere gestuurd wordt door catecholamines [12]. HSL heeft TAG-hydrolase activiteit, maar niet zoveel als ATGL. HSL heeft voornamelijk DAG-hydrolase activiteit. De translocatie van HSL uit het cytosol naar de lipidedruppel is afhankelijk van de proteïn kinase A-afhankelijke fosforylering van perilipine [19]. In grote lijnen wordt HSL geactiveerd (gefosforyleerd) door PKA waardoor het actieve HSL de lipolyse in gang zet [28]. De cAMP-afhankelijke fosforylering wordt gestimuleerd door catecholamines, dit proces wordt voorkomen door insuline [35]. De afbraak van een TAG-molecuul is een samenwerking tussen HSL, ATGL en een adipocyte fatty acid-binding proteïn (A-FABP) [37]. Naast vetweefsel bevindt HSL zich ook in andere weefsels zoals de bijnieren en gonaden omdat het een belangrijke rol speelt in de cholesteryl ester-hydrolase in de productie van steroïdhormonen waar HSL na lipolyse zorgt voor de aanvoer van cholesterol [28]. De bovine primers die reeds in de literatuur gebruikt zijn voor de PCR (Polymerase Chain Reaction) van HSL zijn als volgt [42, 37, 10]:

Primer	Sequentie	Grootte bp	GenBank
HSL-F HSL-R	5'-GCCTGAAGCTGAATGACCTG-3' 5'-CAGCGGTGACATGAAGGGAT-3'		U78042
HSL-F HSL-R	5'-CGGGAGGCTCTTCTTTGAGG-3' 5'-TGGAGATGGTCTGCAGGAAC-3'		AJ237675
HSL-F HSL-F	5'-AGTCCCACCTGAAATCAGTGT-3' 5'-CCAAGTAAGAAGTTGATGGTT-3'	226	NM_001080220
HSL	3'-GAGTTTGAGCGGATCATT GAGCCATGTTTGCTAGAG-5'		XM_592955

### Perilipine (PLIN, PLIN A)

Perilipine speelt een centrale rol in de regulering van de lipolyse. Perilipine is het belangrijkste PAT-eiwit, een familienaam van de eiwitten Perilipine, ADRP en TIP47 die allen

affiniteit hebben met de intracellulaire vetopslag, geassocieerd met de oppervlakte van de vetdruppel in de volwassen adipocyt. Tevens is het een uiterst belangrijke regulerende factor van de lipolyse. De vetdruppels in adipocyten zijn gecoat met perilipines, het is het meest aanwezige vetdruppel-geassocieerde eiwit in adipocyten [21, 33, 34]. Perilipine is niet aanwezig in andere cellen dan adipocyten, ook niet in andere cellen met lipidedruppels, zoals hepatocyten [28].

De functie van perilipine is veelzijdig. Onder gevoede omstandigheden zorgt perilipine voor opslag van triglyceriden in vetcellen door endogene lipases te blokkeren doordat deze niet kunnen aanhechten op vetdruppels in de vetcel [21, 7]. Echter wordt perilipine A gefosforyleerd door PKA, waardoor de conformatie van perilipine op de oppervlakte van de vetdruppel wordt veranderd, dan wordt de lipolyse in gang gezet [18]. Fosforylering van Perilipin A wordt gereguleerd door Proteïn Kinase A voor de stimulatie van de lipolyse in adipocyten. Serine 517 in Perilipin A is de hoofdregulator van PKA-gestimuleerde lipolyse in adipocyten [40]. Een serine van perilipine is een aminozuur waar een fosfaat aan kan grijpen wat leidt tot een fosforylering van perilipine. De fosforylering van één of meer serines in de 3 plaatsen waar PKA kan aangrijpen op het amino-uiteinde is nodig om HSL toegang te geven tot lipidesubstraten. Daarnaast is de fosforylering van serines in het carboxyl-uiteinde van perilipine nodig om een maximale lipolyse te bewerkstelligen [21].

Muizen waarbij perilipine niet aanwezig is, tonen een verhoogde basale lipolyse vergeleken met adipocyten van normale muizen, maar wanneer lipolytische stimuli zich voordoen, wordt daar niet op gereageerd. Met de aanwezigheid van normale levels van HSL bleek dat de  $\beta$ -adrenerge receptor gestimuleerde lipolyse volledig afwezig was. Met andere woorden, perilipine faciliteert de hormonaal gestuurde lipolyse [19].

De activatie van PKA leidt tot een fosforylering van perilipine, waardoor ATGL wordt geactiveerd [7]. Perilipine A wordt gefosforyleerd door PKA, een stap die essentieel is voor de translocatie van HSL van het cytosol naar de lipidedruppel. [12, 19].

Voordat HSL actief wordt in de lipolyse bindt het perilipine. De expressie van perilipine neemt toe na de partus als de melkproductie toeneemt [10]. De bovine primers die reeds in de literatuur gebruikt zijn voor de PCR van perilipine zijn als volgt [10, 43]:

Primer	Sequentie	Groote bp	GenBank
Perilipin	3'-AGACACTGCCGAGTATGCTG TGGAGGGAGGAGGAACTCTA-5'		XM_598845
Perilipin-F	5'-GTCGAGAAGATGGTAGAGTTCCTC-3'	155	gi 134024672
Perilipin-R	5'-TGGAAGGTGTGTCTAGAGAGAGTG-3'		

### Peroxisome Proliferator-activated Receptor $\gamma$ (PPAR $\gamma$ )

PPAR $\gamma$  bindt aan de promotorplaats van perilipine. Een isovorm van PPAR $\gamma$ , PPAR $\gamma$ 2, komt alleen in adipocyten tot uiting. De genexpressie van perilipine wordt gereguleerd door PPAR $\gamma$ 2. In de studie van Arimura *et al.* bleek dat de genexpressie van perilipine in zich differentierende adipocyten enorm toeneemt nadat de adipocyten zijn behandeld met agonisten van PPAR $\gamma$  [9]. PPAR's zitten in verschillende weefsels en kunnen worden geactiveerd door vetzuren en eicosanoiden wat vervolgens leidt tot activatie of repressie van genexpressie. Gevolgen van PPAR-activatie zijn reeds geïdentificeerd in de regio's van promotors die coderen voor eiwitten in peroxisomen, mitochondria en cytosol die betrokken zijn bij het metabolisme van vet. Een toegenomen PPAR-expressie is gevonden na verhoogde

NEFA's (Non Esterified Fatty Acids) concentraties of tijdens een periode van vasten [23]. In een humaan onderzoek is de hoogste expressie van PPAR gevonden in vetweefsel terwijl de expressie minder hoog was in de lever en nieren. PPAR $\gamma$  komt bij knaagdieren het meest tot uiting in wit en bruin vetweefsel. *In vitro* experimenten laten een verhoogde expressie zien na toediening van insuline en corticosteroiden, tevens wordt een daling van de expressie gezien na toediening van tumor necrose factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Ratten die gevoerd werden met een hoog vetgehalte, lieten een significante stijging van PPAR $\gamma$  zien, na vasten daalde de expressie van PPAR $\gamma$  enorm. Het blijkt dat PPAR $\gamma$  een grote rol speelt in de adipogenese [32] en de differentiatie van vetcellen [44]. Wat de (specifieke) rol van PPAR $\gamma$  is in het vetzuurmetabolisme bij runderen is nog niet bekend. Een *in vitro* onderzoek naar de adipogene expressie in perimusculair vet bij runderen, gaf als resultaat dat de expressie van PPAR $\gamma$  toeneemt in adipocyten, nadat adipofibroblasten werden geïncubeerd in een kweekmedium [45]. De verwachting is dat PPAR $\gamma$  een zeer lage expressie heeft bij runderen met slepende melkziekte gezien de bovenstaande functie. De bovine primers die reeds in de literatuur gebruikt zijn voor de PCR van PPAR $\gamma$  zijn als volgt [44, 11, 22, 45]:

Primer	Sequentie	Groote bp	GenBank
PPAR $\gamma$	left 5'-CCCTGGCAAAGCATTGTAT-3' right 5'-GGATATGAGGACCCCATCCT-3'	389	NM181024
PPAR $\gamma$ -F PPAR $\gamma$ -R	5'-GTGAAGCCATTGAGGACAT-3' 5'-AGCTGCACGTGTTCTGTCAC-3'	149	NM_181024
PPAR $\gamma$ -F PPAR $\gamma$ -R	5'-AAGAGCCTTCCAACCTCCCTCA-3' 5'-CCGGAAGAAACCCTTGCAT-3'		
PPAR $\gamma$ -F PPAR $\gamma$ -R	5'-GTGAAGTTCAACGCACTGGA-3' 5'-ATGTCCTCAATGGGCTTCAC-3'		BC116098

### Phosphodiesterase 3 $\beta$ (PDE3B)

Van phosphodiesterases is bekend dat ze een hoge affiniteit hebben met cyclisch AMP (cAMP). PDE3 en PDE4 zijn humaan bekend als regulatoren van de cAMP-concentratie in hematopoietische cellen door cAMP af te breken tot AMP. PDE3A is specifiek voor het myocard en bloedplaatjes, PDE3B is specifiek voor adipocyten [3, 5] en wordt ook wel de cGMP-inhibitie phosphodiesterase genoemd [6]. De activatie van PDE3B vermindert de vrijlating van vrije vetzuren uit adipocyten. PDE3B wordt geactiveerd door insuline en werkt antilipolytisch, door de intracellulaire cAMP concentratie te verlagen en de proteïn kinase A activiteit te remmen. Deze laatste leidt tot een vermindering van de activiteit van Hormone Sensitive Lipase waardoor er minder vrije vetzuren worden vrijgemaakt. Wanneer het aantal vrije vetzuren is toegenomen, wekt dit insulineresistentie in de hand in skeletspierweefsel, lever en adipocyten. Muizen met diabetes hebben een verlaagde genexpressie van PDE3B in adipocyten [4]. De reden om PDE3B in dit onderzoek te testen is gebaseerd op het feit dat PDE3B in andere diersoorten, inclusief de mens, een antilipolytische werking heeft en interactie aangaat met cAMP. Wat precies de functie van PDE3B bij runderen is, is niet bekend. Het is te verwachten dat PDE3B bij runderen een gelijke functie heeft in de vetstofwisseling en daarom is het voor dit onderzoek van belang de verschillen in PDE3B-

expressie te meten bij runderen in verschillende stadia van slepende melkziekte. Voor zover bekend is PDE3B nog niet eerder getest bij runderen en dus geeft de literatuur ook geen bekende primers voor PDE3B. Wel is PDE3B onder andere bij de rat gebruikt voor PCR, de primers zijn hiervan wel bekend [6]. Bij de muis is een ontregeling van PDE3B een oorzaak in de ontwikkeling van leververvetting en staat in nauwe verbinding met de ontwikkeling van Diabetes Type 2. Muizen met een PDE3B knock-out zijn dun en hebben een verhoogde insulinesecretie. Tevens vertonen ze een glucose-intolerantie, insulineresistentie en een toegenomen lipolyse [8].

### **$\beta$ -hydroxybutyraat Receptor (BHBA-receptor) (GPR109A)**

Een lage insulinespiegel stimuleert het gebruik van ketonlichamen als substraat voor metabole processen. Ketonlichamen inhiberen het gebruik van glucose en aminozuren als substraat voor metabole processen in lichaamsweefsels [25].  $\beta$ -hydroxybutyraat grijpt op de adipocyt aan op een G-eiwit gekoppelde receptor die, na binding, een inhiberend effect heeft op intracellulair cAMP. Hierdoor wordt de lipolyse geremd [46]. Het blijkt dat ketonlichamen een negatieve feedback geven op de lipolyse. Echter, er blijft energie nodig voor de melkproductie en de eigen onderhoudsbehoefte. Waarschijnlijk is de vraag naar deze energievoorziening, de ketogenese, sterker dan de negatieve feedback van ketonlichamen op de lipolyse, want runderen met een klinische slepende melkziekte komen zonder veterinaire interventie niet uit deze metabole negatieve vicieuze cirkel en sterven. In de literatuur is, voor zover bekend, geen onderzoek gedaan met primers voor de receptor van  $\beta$ -hydroxybutyraat.

## Hoofdstuk 3 Keuze en verantwoording van de primers

---

### ATGL:

#### Referentie 37.

Deiuliis, J., Shin, J., Murphy, E., Kronberg, S.L., Eastridge, M.L., Suh, Y., Yoon, J., Lee, K. 2010. *Bovine adipose triglyceride lipase is not altered and adipocyte fatty acid-binding protein is increased by dietary flaxseed*. *Lipids* 45:963-973.

Forward: 5'-GTGGACGGTGGCATCTCAGA-3'

Reverse: 5'-AAGCGGAGGCCATCCCTGTA-3'

In dit experiment is de expressie van ATGL gemeten in verschillende weefsels van runderen voor en na toediening van lijnzaad. De expressie van ATGL is na toediening van lijnzaad lager dan voor de toediening van lijnzaad. Er is een grote homologie van de sequentie van ATGL met andere diersoorten, onder andere die van de mens. Primers voor ATGL zijn soms voor meerdere species te gebruiken. Toch noemen de auteurs van dit artikel expliciet dat ze succes hebben gehad met de gebruikte primers voor ATGL.

### HSL:

#### Referentie 37:

Deiuliis, J., Shin, J., Murphy, E., Kronberg, S.L., Eastridge, M.L., Suh, Y., Yoon, J., Lee, K. 2010. *Bovine adipose triglyceride lipase is not altered and adipocyte fatty acid-binding protein is increased by dietary flaxseed*. *Lipids* 45:963-973.

Groen\*:

Forward: 5'-AGTCCCACCTGAAATCAGTGT-3'

Reverse: 5'-CCAAGTAAGAAGTTGATGGTT-3'

In dit experiment is tevens gekeken naar de expressie van HSL na toediening van lijnzaad. Er is geen verschil in expressie van HSL na toediening van lijnzaad gevonden. Lijnzaad heeft alleen effect op de expressie van ATGL, welke TAG afbreekt tot DAG. De primers voor HSL zijn succesvol gebleken, omdat bij beide experimenten, voor en na, HSL gemeten is.

#### Referentie 42:

Yonezawa, T., Haga, S., Kobayashi, Y., Katoh, K., Obara, Y. 2008. *Regulation of hormone-sensitive lipase expression by saturated fatty acids and hormones in bovine mammary epithelial cells*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 376 36-39.

Geel\*:

Forward: 5'-CGGGAGGCTCTTCTTTGAGG-3'

Reverse: 5'-TGGAGATGGTCTGCAGGAAC-3'

In dit artikel uit 2008 is gekeken naar de expressie van HSL in epitheelcellen uit de uier van runderen. Verzadigde vetzuren als stearaat en palmitaat zorgen voor een verhoogde expressie van HSL en na behandeling met insuline, dexamethason of groeihormoon (GH) lieten deze een daling in de expressie van HSL zien.

Op basis van dit artikel worden bovenstaande primers gekozen.

## Perilipine

### Referentie 43:

Xu, J.X., Albrecht, E., Viergutz, T., Nürnberg, G., Zhao, R.Q., Wegner, J. 2009. *Perilipin, C/EBP $\alpha$ , and C/EBP $\beta$  mRNA abundance in longissimus muscle and different adipose tissue of Holstein and Charolais cattle*. J. Meat Sci. 83 120-126.

Forward: 5'-GTCGAGAAGATGGTAGAGTTCCTC-3'

Reverse: 5'-TGGAAGGTGTGTCTAGAGAGAGTG-3'

Dit experiment betreft een onderzoek naar de expressie van regulatoren van vetopslag in spier- en vetweefsel. Er is gekeken of er verschil is tussen Holstein-runderen en Charolais-runderen. Er bleek geen verschil te zijn tussen de rassen maar wel tussen de weefsels, hieruit is gebleken dat de primers goed waren gekozen.

## PPAR $\gamma$

### Referentie 44:

Fernyhough, M.E., Hausman, G.J., Dodson, M.V. 2007. *Progeny from dedifferentiated bovine adipocytes display protracted adipogenesis*. Cells Tissues Organs 188:359-372.

Geel\*:

Forward: 5'-CCCTGGCAAAGCATTGTAT-3'

Reverse: 5'-GGATATGAGGACCCCATCCT-3'

Er is in dit onderzoek gekeken naar de differentiatie van gedifferentieerde runderadipocyten. In een medium met foetaal serum (bovine) beginnen de cellen zich te differentiëren. De expressie van PPAR $\gamma$  is aangetoond bij de gedifferentieerde vetcellen.

### Referentie 11:

McCarthy, S.D., Waters, S.M., Kenny, D.A., Diskin, M.G., Fitzpatrick, R., Patton, J., Wathes, D.C., Morris, D.G. 2010. *Negative energy balance and bovine hepatic gene expression*. PresS. Physiol Genomics.

Groen\*:

Forward: 5'-GTGAAGCCCATTGAGGACAT-3'

Reverse: 5'-AGCTGCACGTGTTCTGTCAC-3'

In dit artikel is in de vroege periode na de partus gekeken naar de genexpressie van onder andere PPAR $\gamma$ . Met bovenstaande primers zijn significante resultaten geboekt.

### Referentie 22:

Harvatine, K.J., Perfield II, J.W., Bauman, D.E. 2009. *Expression of enzymes and key regulators of lipid synthesis is upregulated in adipose tissue during CLA-induced milk fat depression in dairy cows*. The Journal of Nutrition 139: 849-854.

Blauw\*:

Forward: 5'-AAGAGCCTTCCAACCTCCCTCA-3'

Reverse: 5'-CCGGAAGAAACCCTTGCAT-3'

Het artikel van Harvatine *et al.* beschrijft het onderzoek naar de expressie van enzymen en regulatoren van de vetsynthese in adipocyten. In dit onderzoek is een toename van PPAR $\gamma$  gemeten na toediening van geconjungeerd linolzuur.

#### Referentie 45:

Taniguchi, M., Guan, L.L., Zhang, B., Dodson, M.V., Okine, E., Moore, S.S. 2008.  
*Adipogenesis of bovine perimuscular preadipocytes*. BBRC 336 54-59.

Roze\*:

Forward: 5'-GTGAAGTTCAACGCACTGGA-3'

Reverse: 5'-ATGTCCTCAATGGGCTTCAC-3'

Dit is een *in vitro* model van de genexpressie in de adipocyt. Hier zijn ongedifferentieerde adipofibroblasten in een medium gebracht, waarna de adipofibroblasten begonnen te differentiëren. Twee dagen nadat de ongedifferentieerde adipofibroblasten in het medium zijn gebracht, is via kwantitatieve real-time PCR de expressie van PPAR $\gamma$  gemeten. Voor dit onderzoek wordt gekozen voor de primers van referentie 22.

#### **Phosphodiesterase 3 $\beta$ (PDE3B)**

Forward 5'-ACGTGAAGGGCTGCGTGAGC-3'

Reverse 5'-GTGCCAGCAGCCACCAGGAG-3'

Bij bovenstaande primers is geen referentie uit de literatuur, omdat er in de literatuur tot op heden geen PCR is uitgevoerd naar PDE3B bij runderen. De primer is ontworpen op de sequentie voor PDE3B.

#### **B-hydroxy butyraat receptor (BHBA-receptor) (GPR109A)**

Forward: 5'-CATGAACCGCCAGGGCAGCA -3'

Reverse: 5'-TGGACCGTCAGGCCGATGGT-3'

Ook bij deze primers is geen referentie uit de literatuur te geven. Zelfs de sequentie van bovine GPR109A is niet bekend, maar wel te voorspellen op basis van de rat. De sequentie van de rat is gebruikt om via een BLAST de sequentie van het rund te maken. Op basis van het model voor het rund zijn vervolgens de primers ontworpen.

\*De genoemde kleuren zijn terug te vinden in bijlage 1, sequenties en primers.

## Hoofdstuk 4 Polymerase Chain reaction (PCR)

Met behulp van Polymerase Chain Reaction, PCR, zal worden getracht de aanwezigheid en expressie van eerder genoemde eiwitten en enzymen in reeds genomen vetbiopten aan te tonen. De polymerase kettingreactie vermenigvuldigt specifieke DNA sequenties. PCR maakt gebruik van DNA-polymerase om DNA herhaaldelijk te vermenigvuldigen. De DNA-polymerase maakt gebruik van specifieke DNA-primers om te hechten aan de DNA-streng. Met behulp van de korte primers kan de DNA-polymerase aan het 5'-einde van de DNA-streng binden om de replicatie te starten aan elke DNA-streng. Omdat in dit onderzoek specifiek wordt gekeken naar de expressie van bepaalde eiwitten wordt het mRNA met behulp van reverse transcriptase omgeschreven in cDNA en het cDNA wordt vervolgens vermenigvuldigd met behulp van PCR. In elk cupje bevindt zich een volume van 50  $\mu$ l waarin onder andere de forward en reverse primer zijn gepipetteerd. Met behulp van de Taq polymerase wordt vervolgens de genetische code tussen beide primers vermenigvuldigd. Zoals in bijlage 2 in het protocol van PCR is te lezen, is voor elk eiwit een afzonderlijk PCR-protocol gemaakt. De vetbiopten die gebruikt zijn voor dit onderzoek zijn afkomstig van 2 patiënten en 1 controledier. Beide patiënten hebben tijdens hun opname in de kliniek van de Faculteit Diergeneeskunde klinische slepende melkziekte ontwikkeld. Het ligt in de lijn der verwachting dat de lipolyse-stimulerende eiwitten en enzymen in verhoogde mate aanwezig zullen zijn bij runderen met een klinische slepende melkziekte. Zoals de hypothese reeds eerder aan heeft gegeven wordt verwacht dat 1 of meerdere enzymen, eiwitten of genen een verandere expressie zullen vertonen. Omdat er vetbiopten zijn genomen in verschillende opeenvolgende stadia van de stofwisselingsziekte, zal er met behulp van PCR gekeken worden naar de verschillen in expressie tussen beide patiënten, én het verloop van een verlaagde of verhoogde expressie. De uitkomsten van dit onderzoek kunnen wellicht bijdragen aan betere inzichten in de pathogenese van slepende melkziekte en wellicht een deur openen naar nieuwe oplossingen of therapieën van deze veel voorkomende metabole stoornis.

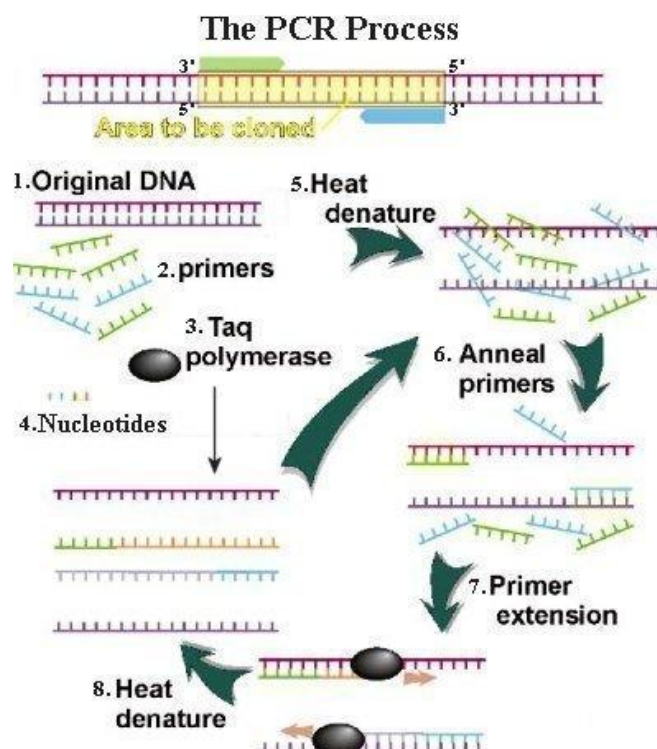


Fig. 3 Overzicht PCR <http://neodnaism.com/what-is/pcr>



### Het testen van de primers

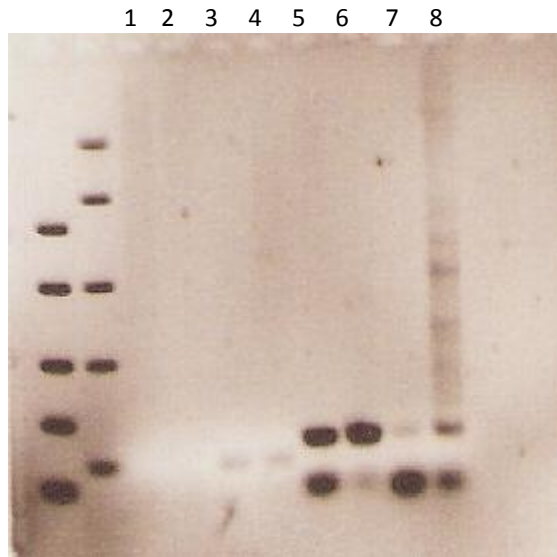
Voor alle gebruikte protocollen verwijs ik u naar bijlage 2.

Na het oplossen en verdunnen van de primers dienden deze eerst te worden getest op hun werkzaamheid. Aangezien het lastig is om RNA te isoleren uit vetweefsel, werden de primers getest op hun werkzaamheid in leverweefsel, vers en op ijs gehaald uit een slachthuis. RNA werd vervolgens omgeschreven in cDNA. cDNA werd daarna met de desbetreffende primers geamplificeerd in de PCR-machine. Na het voltooien van elk specifiek programma werd het geamplificeerde materiaal samen met een loading dye (glycerol wat zwaarder is dan de buffer) op een agarosegel geladen en vervolgens werd het geheel in de elektroforese gebracht. Op 90 volt gedurende drie kwartier verbleef de gel met het geamplificeerde cDNA in de elektroforese waarna het door middel van UV-licht werd doorstraald en de resultaten werden getoond.

HSL en ATGL gaven blijk van expressie in leverweefsel, de andere enzymen waren niet zichtbaar. Achteraf bleek de reden hiervoor logisch: deze enzymen zitten niet of nauwelijks in leverweefsel (fig.4,5). HSL en ATGL zijn aanwezig in vetcellen in de lever, maar de receptor voor  $\beta$ -hydroxybutyraat (GPR109a), PPAR $\gamma$ , perilipine en phosphodiesterase 3B komen alleen in vetweefsel tot expressie en niet in vetcellen elders in het lichaam of andere organen waar zich vetcellen bevinden.

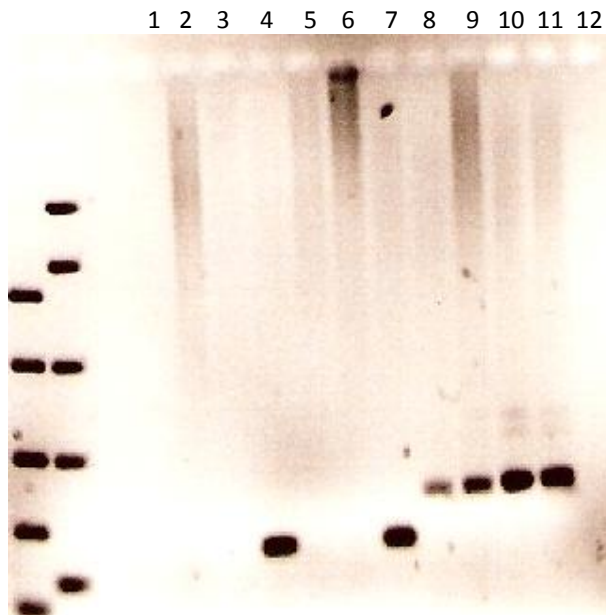
Vervolgens werd uit 2 vetbiopten RNA geïsoleerd volgens dezelfde methode zoals beschreven is voor leverweefsel en hierop werden alle primers getest. Alle eiwitten bleken in het vetweefsel aanwezig te zijn met uitzondering van PDE3B (fig. 5). Omdat de primers voor PDE3B een relatief groot genetisch gebied insloten, werd voor dit enzym een apart PCR-protocol ontworpen. Het aantal cycli werd verveelvoudigd en de tijd voor de fase waarin beide strengen worden geamplificeerd door de polymerase werd verruimd. Toch gaf ook dit geen resultaat voor PDE3B, waaruit kan worden geconcludeerd dat de primers voor PDE3B niet werkzaam zijn of dit enzym zit niet of nauwelijks in vetweefsel (fig. 6).

Aansluitend is voor HSL en ATGL een curve opgesteld met cycli van achtereenvolgens 10, 20, 30, 40 en 50 cycli. Hieruit bleek dat na 40 cycli de resultaten het beste zichtbaar werden en ook nog in het lineaire gebied van de curve lagen(fig. 7).



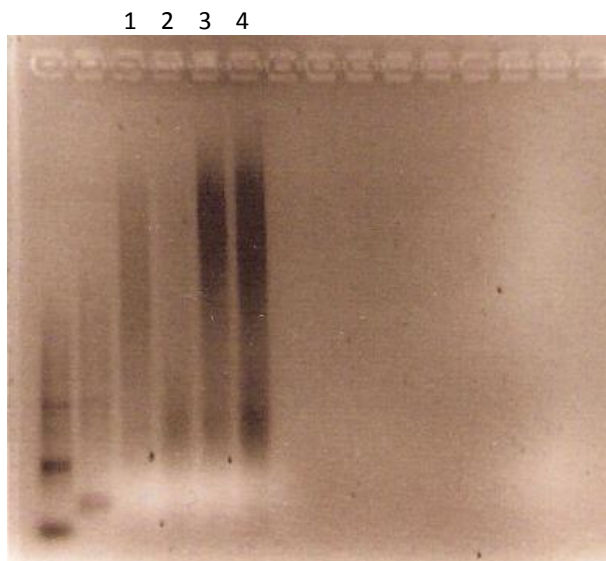
- Legenda:
- 1: PPARy lever 1
  - 2: PPARy lever 2
  - 3: PPARy vet
  - 4: PPARy vet
  - 5: Perilipine vet
  - 6: Perilipine vet
  - 7: GPR109a vet
  - 8: GPR109a vet

Fig. 4 Test primers deel 1



- Legenda:
- 1: PDE3B vet 1
  - 2: PDE3B vet 2
  - 3: PDE3B lever 1
  - 4: PDE3B lever 2
  - 5: HSL lever 1
  - 6: HSL lever 2
  - 7: HSL vet 1
  - 8: HSL vet 2
  - 9: ATGL lever 1
  - 10: ATGL lever 2
  - 11: ATGL vet 1
  - 12: ATGL vet 2

Fig. 5 Test primers deel 2



- Legenda:
- 1: PDE3B vet 1
  - 2: PDE3B vet 1
  - 3: PDE3B vet 2
  - 4: PDE3B vet 2

Fig. 6 Test primers PDE3B 1

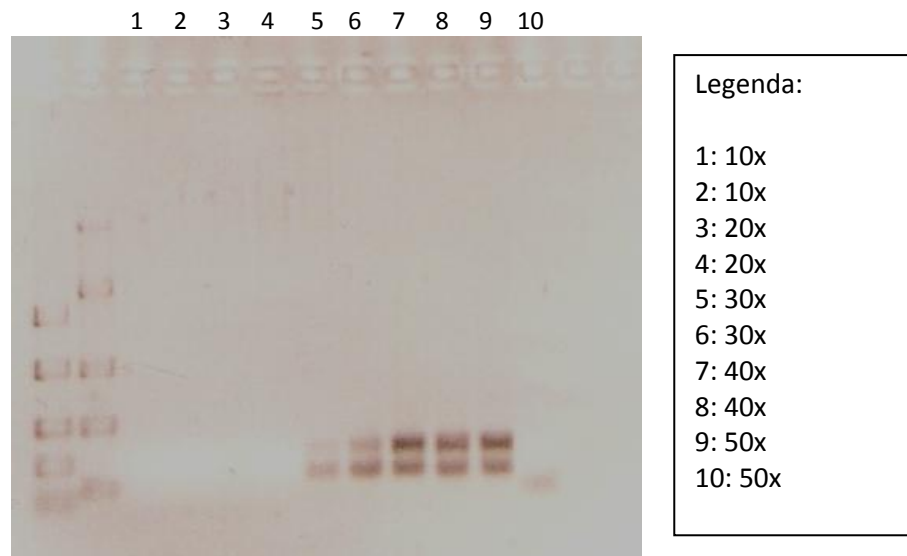


Fig. 7 Curve HSL + ATGL 1

### De patiënten en de controle

Vetbiopten van 2 koeien die elk op de kliniek slepende melkziekte ontwikkelden kwamen in aanmerking voor het onderzoek. Van beiden kon het verloop van de expressie van de eerder genoemde enzymen en eiwitten voorafgaand en op het moment van diagnose van de ziekte worden bepaald. Om de expressie van de verschillende enzymen en eiwitten te vergelijken werd er bij elk enzym ook de expressie gemeten van hetzelfde enzym in een controlekoe. Het biopt van de controlekoe is genomen tijdens de droogstand. Gedurende de hele proef is weefsel van dit droogstandsbiopt als controle gebruikt.

In onderstaande tabel is te zien dat er 1 monster is genomen voor het afkalven (D) tijdens de droogstand en de overige monsters zijn wekelijks afgenomen tot het moment dat slepende melkziekte optrad. Op deze manier is elke koe te vergelijken met de controlekoe maar ook is elke koe met zichzelf te vergelijken, namelijk met de eerste meting voor het afkalven.

<b>Koe 79/7856</b>	<b>D</b>	<b>1 feb.</b>	<b>L1</b>	<b>5 feb.</b>	<b>L2</b>	<b>12 feb</b>	<b>L3</b>	<b>19 feb.</b>	<b>L4</b>	<b>26 feb.</b>
<b>Koe 82/6425</b>	<b>D</b>	<b>8 feb.</b>	<b>L1</b>	<b>17 feb.</b>	<b>L2</b>	<b>24 feb.</b>	<b>L3</b>	<b>3 mrt.</b>		
<b>Koe controle/5914 10 feb.</b>										

Tabel 1 Aantal monsters per koe

Daarnaast diende elk monster gecorrigeerd te worden voor de hoeveelheid RNA aanwezig in elk vetbiopt. Met andere woorden, tijdens het maken van cDNA uit RNA diende er een gecorrigeerde hoeveelheid RNA te worden toegevoegd om de hoeveelheid RNA gelijk te houden om later iets te kunnen zeggen over de verschillen in expressie. Met behulp van de Nano-drop, een apparaat welke de hoeveelheid RNA of DNA in een microliter oplossing kan bepalen, werd van elk monster de hoeveelheid RNA bepaald. Vervolgens werd uitgerekend hoeveel RNA van elk monster nodig was om cDNA te maken. Na het produceren van cDNA werd van elk monster gecontroleerd of de hoeveelheden cDNA ongeveer gelijk waren.

Koe	Concentratie ng/ $\mu$ l	$\mu$ l RNA toevoegen	$\mu$ l H <sub>2</sub> O toevoegen
79 D	105,9	4,22	7,78
79 L1	62,1	7,19	4,81
79 L2	44,6	10	2
79 L3	130,2	3,43	8,57
79 L4	113,3	3,9	8,1
82 D	152,5	2,93	9,07
82 L1	112,3	3,96	8,04
82 L2	37,2	12	0
82 L3	108,3	4,12	7,88
C	133,0	3,36	8,64

Tabel 2 Correctie voor hoeveelheid RNA t.b.v. cDNA productie

Monster L2 van koe 82 had verreweg de laagste RNA-concentratie. Deze werd gebruikt als referentie om de rest te corrigeren. Dat betekent dat voor 82 L2 er 12  $\mu$ l RNA wordt gebruikt en 0  $\mu$ l H<sub>2</sub>O. In totaal dient er 14  $\mu$ l in het buisje te zitten met 1  $\mu$ l oligo dT en 1  $\mu$ l 10mM dNTP's. Na het proces om cDNA te maken werd van elk monster gecontroleerd of de hoeveelheid cDNA gelijk was. Het bleek dat de waarden behoorlijk dicht bij elkaar lagen, zoals te zien in de tabel en de grafiek hieronder, waarin alle monsters voor de golflengte van DNA staan weergegeven.

Koe	Concentratie DNA ng/ $\mu$ l
79 D	2052,1
79 L1	2218,4
79 L2	2112,4
79 L3	1714,7
79 L4	2392,8
82 D	1941,9
82 L1	2183,1
82 L2	2296,8
82 L3	2213,9
C	1461,3

Tabel 3 Concentratie DNA per monster na cDNA productie

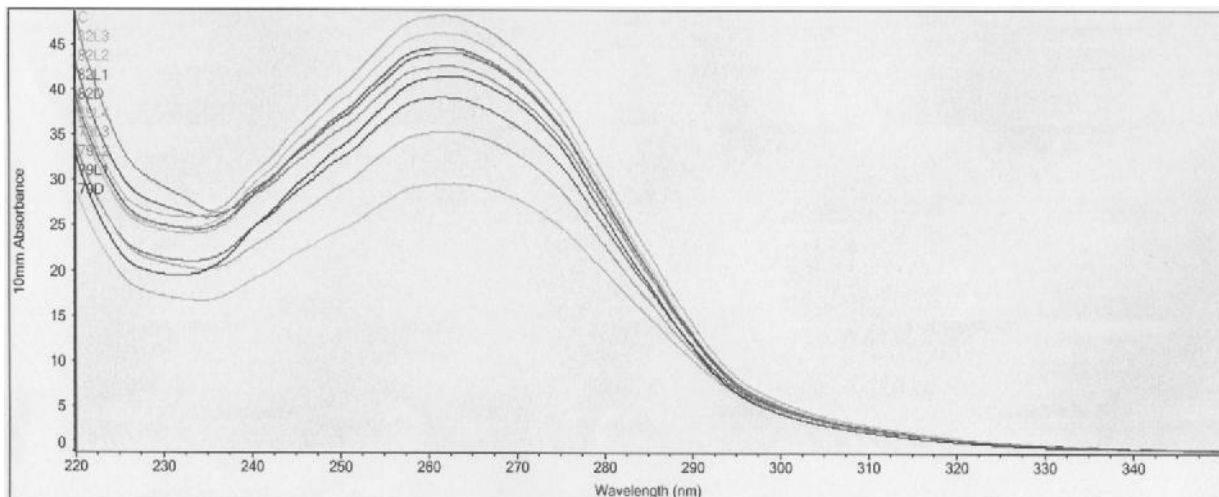


Fig. 8 Alle monsters in NanoDrop voor DNA golflengte

In het weefsel van de controlekoe zit de laagste concentratie DNA, hier moet met het bespreken van de resultaten rekening worden gehouden.

## De resultaten

### ATGL

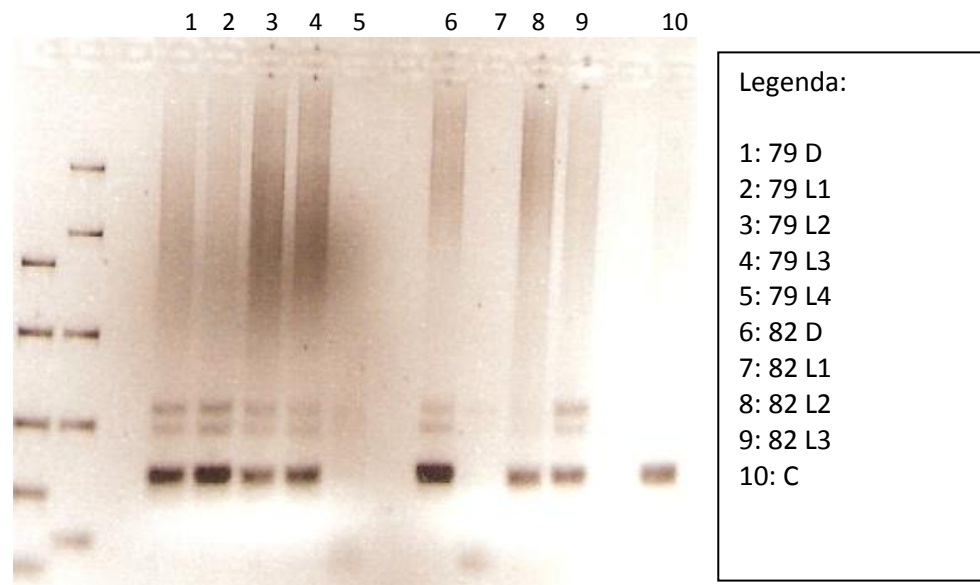


Fig. 9 Resultaten ATGL

Het lijkt erop dat in het verloop van de ziekte bij beide koeien een verminderde expressie van ATGL aanwezig is. Bij laan 5 en laan 7 respectievelijk 79 L4 en 82 L1 is niets te zien. Dit kan verschillende oorzaken hebben. Na controle bleek dat er niets is misgegaan bij het pipeteren op de gel, want na herhaling van deze elektroforese werd hetzelfde beeld getoond. Aangezien in elk cupje cDNA zat, moet er iets mis zijn gegaan bij de PCR-fase. Wellicht hebben de primers niet aan kunnen grijpen of is er een fout gemaakt tijdens het pipetteren. In vergelijking met de controlekoe is er een verhoogde expressie aan het begin van de ziekte op het moment dat deze nog niet klinisch is. Het zou goed kunnen dat het rund in deze fase zijn energie uit de vetafbraak haalt en in een later stadium dit proces iets downreguleert. Echter, wanneer er wordt gekeken naar de expressie in het verloop van de tijd van de patiënten zelf dan is goed te zien dat er een mindere mate van expressie van ATGL is in het verloop van de tijd in vergelijking met de eigen droogstandsbipten.

## HSL

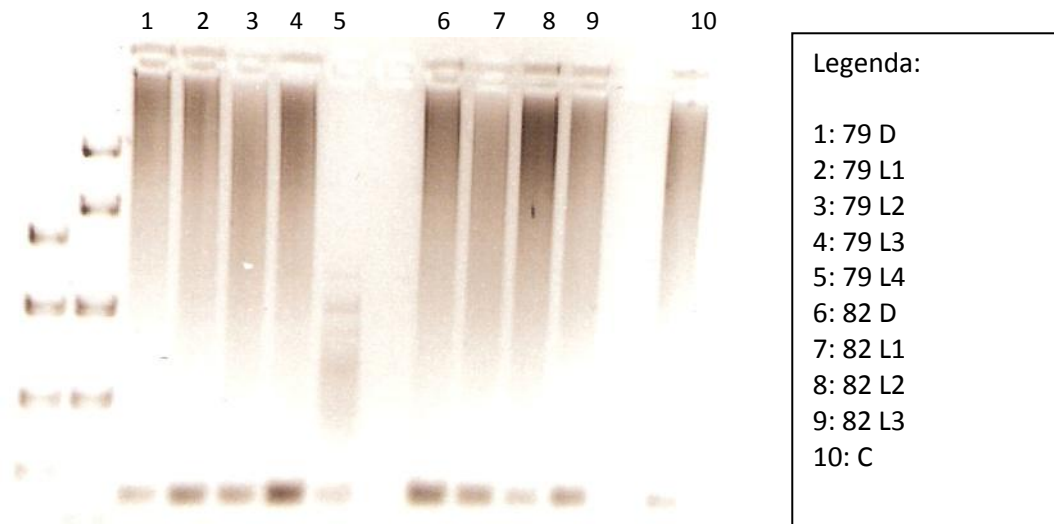


Fig. 10 Resultaten HSL

Bij koe 79 lijkt de expressie van HSL langzaam toe te nemen, maar in het laatste stadium is er zeer weinig expressie. Het zou kunnen dat er in deze cup niet voldoende contact heeft plaats kunnen vinden met de primers. Koe 82 laat een golfbeweging zien in de expressie van HSL. Ook dit kan natuurlijk liggen aan de uitvoering van het onderzoek, maar het kan ook een sinusoidale zijn die de expressie weergeeft in het verloop van de ziekte. Als de droogstandsbiopsen van beide dieren worden vergeleken met de controlekoe, tevens een droogstandsbiops, dan is er verschil te zien in expressie van HSL bij alle 3 de dieren (lanen 1, 3 en 6). De enige juiste conclusie is als volgt: in de droogstand is de mate van HSL-expressie niet sterk. Het verschillende verloop bij beide patiënten lijkt tegenstrijdig, dier 79 heeft een toenemende expressie van HSL m.u.v. spoor 5 en dier 82 heeft een afnemende expressie m.u.v. spoor 9. Ik heb voor deze verschillen geen verklaring.

## GPR109a

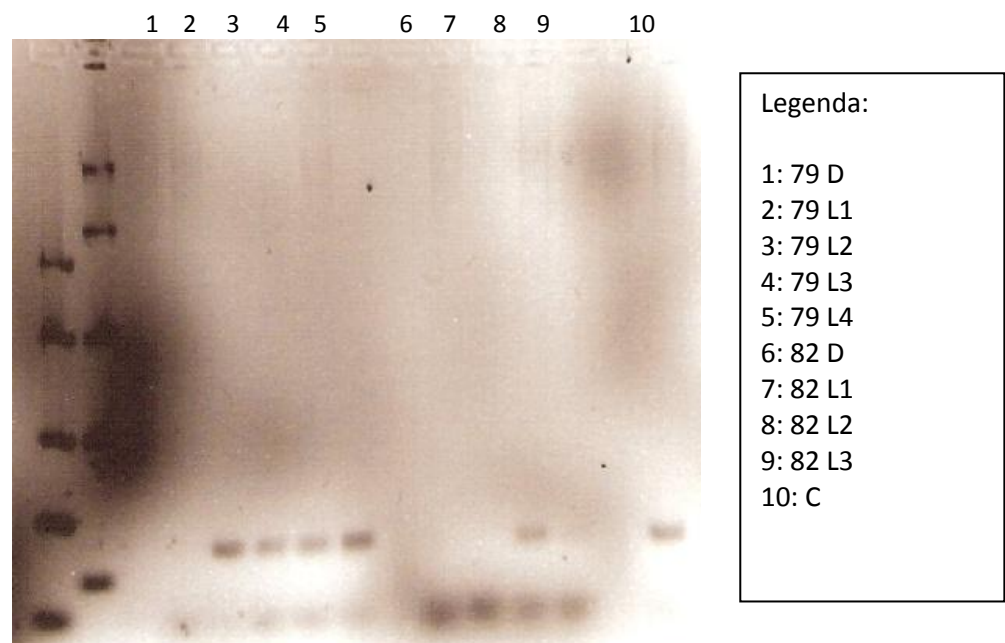


Fig. 11 Resultaten GPR109a

Kijkend naar de resultaten van de receptor vallen er een paar dingen op. Allereerst lijken er 2 horizontale rijen expressiebandjes te zijn. Waarom er bij koe 82 slechts expressie op de

bovenste rij is in spoor 8 is dubieus. De primers zijn werkzaam en in elk cupje zit cDNA. Als beide koeien met elkaar worden vergeleken zit er wel verband tussen de expressie op de verschillende rijen. Daar waar de hoogste expressie op de bovenste rij bij koe 79 is, kan men zien dat er bij koe 82 een hogere expressie op de onderste rij heeft plaatsgevonden en vice versa. Het zou kunnen dat de onderste rij een verzameling is geworden van delen primers die aan elkaar zijn geplakt, maar dat verklaart het verband tussen beide koeien nog niet. Het lijkt dat daar waar de receptor is vermenigvuldigd door de primers er minder over is voor de primers om "afval" te vermenigvuldigen en daar waar de primers de receptor niet hebben vermenigvuldigd er meer over is voor het "afval". Echter, volgens het protocol moet er van alle substraten een overmaat aanwezig zijn.

In ieder geval is er geen verklaarbaar verloop te ontdekken in de expressie van GPR109a gedurende de ontwikkeling van acetonaemie bij beide runderen. Kijkend naar koe 79 lijkt de expressie van GPR109a af te nemen gedurende het verloop na de partus met uitzondering van laan 5. Kijkend naar koe 82 lijkt de mate van expressie in laan 6 en 7 gelijk én de mate van expressie in laan 8 en 9 lijkt ook gelijk. Bij laan 8 en 9 is de expressie duidelijk verminderd ten opzichte van laan 6 en 7. Wellicht wordt een mogelijk patroon duidelijker naar mate er meer koeien in de proef zitten en er over een langere periode meer monsters worden genomen, of met een korter interval van monsternamen in een gelijke periode. Ook in vergelijking met de controle is er geen verband te ontdekken. Er is niet een duidelijk verhoogde of verlaagde expressie te zien bij beide koeien in vergelijking met de controlekoe.

## PPAR $\gamma$

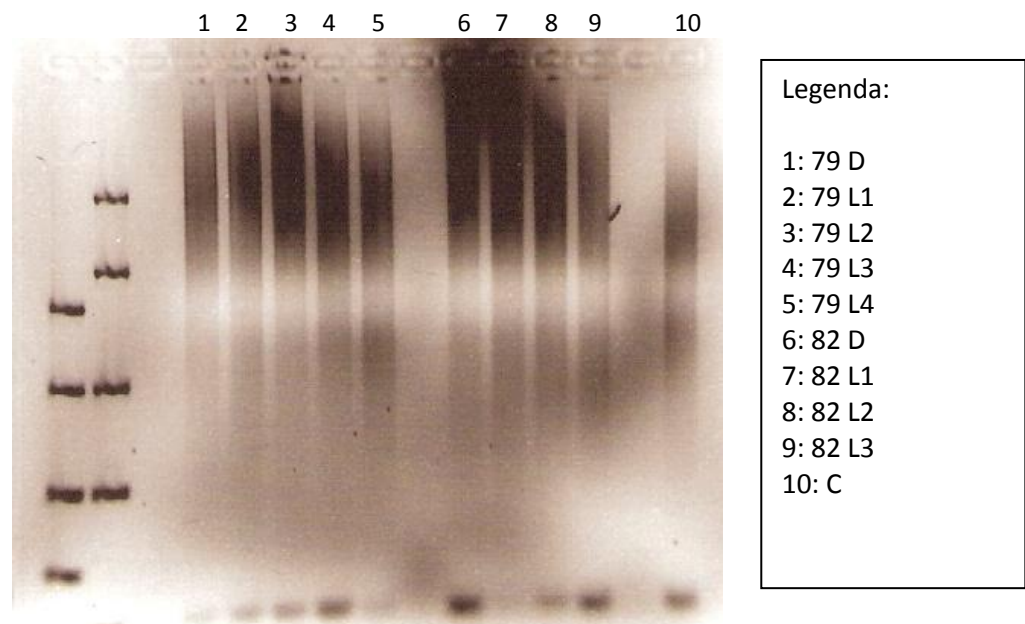


Fig. 12 Resultaten PPAR $\gamma$

Koe 79 begint in de droogstand met een zeer lage mate van expressie van PPAR $\gamma$ . Naarmate de tijd vordert lijkt de expressie licht toe te nemen met uitzondering van laan 5, waar de expressie sterk verminderd is. Koe 82 heeft een sterke expressie tijdens de droogstand en na de partus is de expressie zeer sterk verlaagd om vervolgens weer licht toe te nemen in het verloop van de ontwikkeling naar acetonaemie. De controlekoe heeft in vergelijking met beide koeien een expressie die tussen beide droogstandsbiopsen van de patiënten in zit. De verwachting was om in het verloop van de ontwikkeling van acetonaemie een verlaagde expressie van PPAR $\gamma$  te zien vanwege een mindere mate van re-esterificatie tijdens een negatieve energiebalans. Dit resultaat is niet terug te halen in deze opzet.

## Perilipine

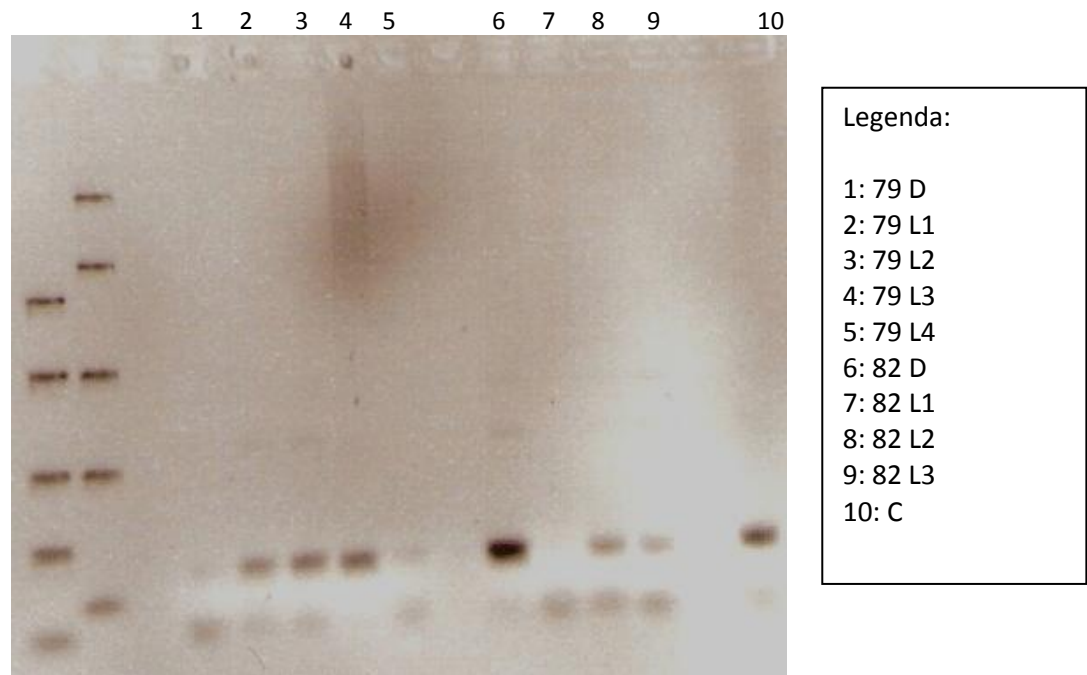


Fig. 13 Resultaten Perilipine

Perilipine geeft een soortgelijk beeld als GPR109a. Bij koe 79 lijkt de expressie in het stadium tussen laan 2 en laan 4 een verband te zijn, hier neemt de expressie van perilipine toe. In laan 5 is echter de expressie sterk verminderd. Bij koe 82 is in laan 6 een enorme expressie te zien tijdens de droogstand waarna de expressie erg afneemt. In vergelijking met de controlekoe is er een algehele lagere expressie van perilipine. Ook hier zit het monster van de controlekoe in vergelijking met de beide droogstandsbipten qua expressie tussen beide monsters in.



## Discussie

---

Naar aanleiding van bovenstaande resultaten is er niet een éénduidige conclusie te trekken. Op basis van de literatuur hebben we gekozen voor de 6 eerder genoemde enzymen en eiwitten. In een mogelijk uitgebreider vervolgonderzoek zou hieraan adiponectine en leptine kunnen worden toegevoegd.

Op basis van de geteste enzymen en eiwitten is er in deze opzet met 2 patienten en 1 controle slechts voorzichtig iets te zeggen over de expressie van ATGL gedurende de periode na afkalven in vergelijking met het droogstandsbiopt. De expressie van ATGL is bij beide patiënten lager gedurende de periode post partum ten opzichte van het eigen droogstandsbiopt. De resultaten van HSL zijn tegenstrijdig. Bij koe 79 neemt de mate van expressie ten opzichte van het droogstandsbiopt toe en bij koe 82 neemt de expressie af. Kijkend naar de resultaten van de  $\beta$ -hydroxy butyraat receptor lijken er bij beide dieren niet veel verschillen op te treden gedurende de periode post partum ten opzichte van het droogstandsbiopt. Toch lijkt er bij koe 79 een zeer lichte vermindering van expressie op te treden gedurende de periode post partum maar het droogstandsbiopt heeft zeer weinig expressie. Koe 82 heeft meer expressie in de droogstand en post partum lijkt de expressie zeer licht af te nemen.

De resultaten van PPAR $\gamma$  zijn niet eenduidig. De expressie in de droogstandsbiopten zijn onderling al zeer tegenstrijdig, zeer laag bij koe 79 en vrij hoog bij koe 82. Vervolgens neemt in de periode post partum bij koe 79 de expressie toe met uitzondering van het laatste biopt en bij koe 82 is de expressie post partum veel lager dan in de droogstand en lijkt het vervolgens ook toe te nemen.

De resultaten van perilipine lijken behoorlijk op de resultaten van PPAR $\gamma$ . Ook hier zijn de beide droogstandsbiopten van de patiënten zeer verschillend. De expressie van koe 82 in de droogstand valt hierin direct op. Met uitzondering van het laatste monster lijkt de expressie van perilipine bij koe 79 toe te nemen post partum. Bij koe 82 zijn deze resultaten post partum niet terug te vinden.

Van phosphodiesterase 3 $\beta$  zijn helaas geen resultaten te bespreken vanwege de onwerkzaamheid van de primers, of de afwezigheid of onvoldoende aanwezigheid van phosphodiesterase 3 $\beta$  in het vetweefsel van de patiënten en de controlekoe. Het eerste argument, de onwerkzaamheid van de primers, lijkt lastig te bewijzen. Wellicht is de genetische range tussen de primers die moest worden geamplificeerd te groot, echter, hier hebben we met PCR rekening mee gehouden. We hebben de het aantal cycli meerdere malen aangepast en we hebben de amplificatieperiode dusdanig opgerekt dat de kans op onwerkzaamheid van de primers behoorlijk klein is geworden.

De eerste opzet voor de biochemische achtergrond van acetonaemie is gemaakt en daarin is het doel geslaagd. Er is op basis van dit onderzoek nog geen duidelijke factor aan te wijzen in de lipolyse bij runderen post partum die een rol zou kunnen spelen bij het ontwikkelen van acetonaemie.

In een mogelijk vervolgonderzoek zal in ieder geval het aantal dieren moeten worden verhoogd en wellicht kan het interval tussen de monsternames verkleind worden tot en met het moment van acetonaemie. Hierdoor is er per patient een meer vloeiende curve te bereiken in het expressiepatroon van de verschillende betrokken enzymen en eiwitten in de lipolyse.

Ook zou hetzelfde onderzoek uitgevoerd kunnen worden met, naast de huidige primers en cDNA in de PCR, zogenaamde house keeping genes. Dit zijn sequenties die in theorie niet qua expressie veranderen, in welke staat het dier zich ook bevindt. Op deze manier is het verschil in expressie harder te maken wanneer de expressie van de house keeping genes

gelijk blijft. Echter, het is volgens de literatuur lastig om goede house keeping genes te gebruiken voor vetweefsel. De onderzoeken die voor rond zijn gedaan met betrekking tot vetweefsel leveren 2 redelijk betrouwbare house keeping genes op, echter blijft ook hiervan de expressie niet gelijk. (47,48,49,50)

Daarnaast ben ik benieuwd naar het verloop van de insulineconcentratie gedurende het verloop van de ziekte. Insuline beïnvloedt een aantal van de getestte enzymen en wellicht geeft dit meer duidelijkheid. In theorie is de insulinespiegel van runderen met acetonaemie laag maar het verloop van insulinespiegels in de transitieperiode en de periode post partum waarin de acetonaemie zich ontwikkeld is nooit dusdanig gemonitord. Ook de insuline/glucagon ratio is aansluitend wellicht een bron van verheldering, zowel in het verloop van de lactatie als in het verloop van slepende melkziekte.

Nogmaals, het doel van deze onderzoekstage is bereikt en wellicht is er nu meer draagvlak voor een vervolgonderzoek. Slepende melkziekte blijft een interessante aandoening. De theorie in energiehuishouding én de therapie is relatief eenvoudig. Wat er echter op biochemisch niveau met de verhoogde lipolyse gebeurt blijft tot op heden nog steeds een raadsel, al zijn de eerste stappen nu gezet.

## Nawoord en dankzegging

---

Op het laboratorium hangt een briefje met de volgende tekst: “geen resultaat is ook resultaat”. Dat lijkt de conclusie te zijn aangezien er nu meer vragen dan antwoorden zijn overgebleven. Na dit onderzoek is geen keyfactor aan te wijzen in de ontwikkeling van slepende melkziekte. Wellicht zijn er andere oorzaken van deze stofwisselingsziekte aan te wijzen maar ook daar dient verder onderzoek naar te worden gedaan.

Ik heb in ieder geval veel plezier gehad in het uitvoeren van dit onderzoek de afgelopen 9 maanden. Als student Diergeneeskunde krijgen wij wel wat mee van laboratoriumwerk en processen, maar uiteraard kan dat niet tippen aan andere opleidingen als biomedische wetenschappen. Juist dit vind ik één van de leukste ervaringen tijdens het onderzoek, het was interdisciplinair. De samenwerking met de mensen van B&C heb ik als ontzettend leerzaam ervaren.

De volgende personen en instanties wil ik graag bedanken voor de afgelopen periode: Slachterij Van Kooten te Montfoort voor het kosteloos beschikbaar stellen van een lever. Ruurd, voor het leuke gesprek en de introductie in de onderzoeksgroep.

Saskia, voor de tips, uitleg en natuurlijk het bloedtappen door heel Nederland.

Lodewijk, voor het engelengeduld, de uitleg en de coaching.

Martin, voor het bijstaan in het lab, nog meer voor het engelengeduld en mijn oprechte excuses, omdat ik meer dan eens het bloed onder je nagels vandaan zal hebben gehaald.

Alle mensen op de afdeling biochemie voor alle raad en hulp in het lab.

Petra, voor de gezellige pauzes en de hulp met alle belangrijke randzaken en het openen van de deuren.

## Sequentie ATGL

1 atgttcccca aggagacgac gtggagcgta ctogtcgcgg gctgcggctt cctcggcgtc  
 61 taccatatacg gcgtggcctc ctgcctccgc gagcacgcgc cttccttggg ggccaacgcc  
 121 acgcacatct acggcgcctc ggccggggcg ctcacggcca cggcgttggg caccggggcc  
 181 tgcttgggtg aagctggtgc caacatcacc gaggtgtcca aggaggcccg gaagcgggtc  
 241 ttggggccac tgcacccttc cttcaacatg gtgaagacca tccggggctg cctgctgaag  
 301 attctgcctg ctgattgcta tgagtgtgcc agcggccgcc taggcatctc tctgaccctg  
 361 gtctctgatg gcgagaacgt cattataacc cacttcaact ccaaagagga gcttatccag  
 421 gccaatgtct gcagcacctt catccccgtg tactgcggcc tcatcccccc ttccctccag  
 481 ggggtgcgct acgtggaagg tggcatctca gacaacctgc cgctctatga gctcaagaac  
 541 accatcacgg tgtccccctt ctggggcgag agtgacatct gccgcagga cagctccacc  
 601 aacatccacg agctccgagt caccaacacc agcatccagt tcaacctgcy caacctctac  
 661 cgcctctcca aggcctgtt ccgcccag cccctggtgc ttcgagagat gtgcaaacag  
 721 ggctacaggg atggcctccg cttcctgcgg cggaaacggc tcctgaaccg gcccaccccc  
 781 ttgttggcac tgccccctag ccagccccct gcccccgagg atgcagatgc agaggagggg  
 841 gcagtggcca tggagaggac tggaggggaag gaccacctgc ctccgcccag ggaggatcac  
 901 atcctggagc acctgcctc aaggctcaat gaggccctgc tggaggcctg catggagccc  
 961 tcggacctgc tgaccacact ctccaacatg ctgcccgtgc gtctggccat ggccatgatg  
 1021 gtgccttaca ctctgcccct ggagagcgcg gtgtccttca ccatccgctt gctcagatgg  
 1081 ctgcctgacg tcctgagga catccggtgg atgaaggagc agacaggcag catctgccag  
 1141 tacctgatga tacgcgcaa gaggaagctg ggcaaccacc tgccctccag gctgtcgggg  
 1201 caggtggtgc tgcgcgcgc ccgctcgtt cctccgtgc cgctgtcctg cgcgcctac  
 1261 agcgaggtgc tgcccagctg gatgcgcaac agcctgtgc tgggggatgt actggccaaa  
 1321 tgggaggagt gccagcggca actgctgctc gggctcttct gcaccaacgt ggccttcccg  
 1381 ccggacgcc tgcgatgog cgtccctgcc ggcccggccc ccgagcccc gcagcaccg  
 1441 ccagctcgc ccccttgcta a GG?

## Geel

Forward: 5'-GTGGACGGTGGCATCTCAGA-3'

Reverse: 5'-CCTTAGCAAGGGGCGAGCT-3'

Reverse omgeschreven: 5'-AGCTCGCCCCCTTGCTAAGG-3'

## Groen

Forward: 5'-GTGGACGGTGGCATCTCAGA-3'

Reverse: 5'-AAGCGGAGGCCATCCCTGTA-3'

Reverse omgeschreven: 5'-TACAGGGATGGCCTCCGCTT-3'

Vet en onderstreept in geel forward is tevens de forward van groen.

## Sequentie HSL

1 cctggggata tctgaagagg cctgggaggg cctcacggct cttgcagagg atggacctgc  
61 gcacatgac acagtcgctg gtgtccctgg cagaggacaa catggccttc ttctccagcc  
121 agggccccgg ggagacggcc cggcggctga cggcgtctt tgcgggcatt cgggagcagg  
181 ccctggggct ggagccggcc ctgggcccgc tgctgagcgt ggcgcacctc tttgacctgg  
241 acacagagac gccggccaat gggtagcgca gcctgggtgca cacggccccg tgctgcctgg  
301 cacacctgcc gcacaaatcg cgctacgtgg cctccaaccg cgcgagcatc ttctttcgca  
361 ccagccacaa cctggccgaa ctogaggcct acctggcccgc cctcacccag ctccgcgctc  
421 tggcttacta cgcccagcgc ctgctgacca ccaaccagcc **cgggaggctc ttctttgagg**  
481 gtgatgagag ggtaattgcc gacttcctac gagagtacgt cacgctgcac aaaggctgct  
541 tctacggccg ctgcctgggt ttccagttca cacctgccat cgggccgttc **ctgcagacca**  
601 **tctccat**cgg actggtgtcc ttccggggagc actacaaacg aaacgagact ggcacagtg  
661 tgaccgccag ctccctcttc actgacggcc gctttgcatc cgacccccgag ctgcgtgggg  
721 ccgagtttga gcggatcatt cagaacctag acgtgcactt ctggaaagct ttctggaata  
781 tcaccgagat ccaggtgcta tegtctctag caaacatggc ctcaaccacc gtgaggggtga  
841 gccgctgct cagcctgcca cccgtgcctc ttgaaatgcc tctgacctcg gacccccgagc  
901 tcacagtcac catctcgccc ccgctggccc acacaggccc tgggctgctc ctgctcaggc  
961 tcatctccta tgacctgcgg gaaggacagg acagcaagga gctcagcagc ttcgtgaggt  
1021 ccgagggccc caggagcctg gagctgcggc tgcgccccca gcaggcacc cgtccaggg  
1081 ccctggtggt gcacatccac ggcggcggct tcgtggccca gacctccaag tcgcacgagc  
1141 cttacctcaa gagctgggccc caggagctgg gcgcccccat cctctccatc gactactccc  
1201 tggccccaga ggcccccttc ccccgggcgc tcgaagagtg cttctatgcc tactgctggg  
1261 ccgtcaagca ctgcgccctg ctoggtcaa cagggtgagcg gatatgcctc gctggagaca  
1321 gcgcccggcg gaacctctgc ttcaccgtgt cccttcgggc agcggcctac ggggtgcggg  
1381 tgcccgatgg catcatggca gcctaccggy ccacctgct gcagtccacc gcctctcctt  
1441 cccgctgct gagcctcatg gaccacctgc tgccctcag cgtgctctcc aagtgcgtca  
1501 gcacctatgc cgggtcggag actgaggacc accccgactc agaccagaag gcgctgggtg  
1561 tgatggggct cgtgcagcgg gacacggccc tgctcttgcg agacctccgg ctgggcccct  
1621 cctcgtggct caactccttc ttggagttgg gtgggcaaaa **gtcccacctg aaatcagtgt**  
1681 ccaagacaga gccaatgcgg cgcagtgtgt ctgaagcagc cctgacccag ccggagggct  
1741 cactgggaac cgactccctc aaaagcctga agctgcatga cctgggccc aggaacagca  
1801 gtgacacaac agacacgcca gagctgtcac tgtcccgga gacactcggc ccctccgcac  
1861 cctca**accat caacttctta cttgg**atctg aggatggatc tgaaatgtct aaggccccag

1921 aggagctgaa caacaaggac cgagttcgag gtgtgggagc cgccttcccc gagggtttcc  
 1981 acccacggcg ctgcagccag ggtgccatgt ggatgcccct ctactcggcc cccatcgtca  
 2041 agaatccctc catgtcaccg ctgctggcac ccgacagcat gctgcagact ctgccacctg  
 2101 tgcacatcgt ggctgcgag ctggatccca tgctggacga ctcggtcacg ttcgcgcggc  
 2161 ggctccgagg cctggggccag cccgtgacgc tgcgcgtggc ggaggacctg ccgcacggct  
 2221 tcctgagcct ggcgggctttg tgccgggaga cgcggcaggc agccgcgctg tgcgtggagc  
 2281 gcatccgtct catcctcaat cttcccgggc cgcgggtctg agccggggcg tgccaggccc  
 2341 cgcggggaga ggggggctgc ggggggagc actaaaggcc gcttgtacc atctgcgcag  
 2401 ggctccctgg tgaatgcgcc tcgggaaggg cgggggaaac cccgggcccg gggctccccg  
 2461 gcccatccag gacctctcta gggctgggtg gaaggggggtg ggctgtgcct taagttgggg  
 2521 gaacggcatg gggagagtcg ggcgggggccc cctccccag agctaagacc ctggcctccg  
 2581 ggaggagggc gcacacagac cagtctcaga gacagccgga cttgcacggg atcactgcct  
 2641 tctattg

**Geel:**

Forward: 5'-CGGGAGGCTCTTCTTTGAGG-3'  
 Reverse: 5'-TGGAGATGGTCTGCAGGAAC-3'  
 Reverse omgeschreven: 5'-GTTCTGCAGACCATCTCCA-3'

**Groen:**

Forward: 5'-AGTCCCACCTGAAATCAGTGT-3'  
 Reverse: 5'-CCAAGTAAGAAGTTGATGGTT-3'  
 Reverse omgeschreven: 5'-AACCATCAACTTCTTACTTGG-3'

## Sequentie perilipine

1 gggctctgtg gcaactgagac aacatcagct ggagtgagtg tggggcttcc gagacgacct  
61 tacctggttg gtttctgaga agtaaaaaag ttgaggcttg aagagctcca atggcagtca  
121 acaagggccc caccttgctg gatggagacc tccctgagca ggagaatgtg ctgcagcggg  
181 tcctgcagct gccggtggtg agcggcacct gtgagtgctt ccagaagacc tacgccagca  
241 ccaaggaagc ccaccccctg gtggcctctg tatgcaatgc ctacgagaag ggcgtgcagg  
301 ggcaccagcag tctggcggcc tggagcatgg agcccgtggt ccgcaggctg tccaccagt  
361 tcgtagctgc caacgagctg gcctgcccag gcctggacca cctggaggaa aagatccccg  
421 ccctccagta tctctctgaa aagatgcct ctgagctgaa ggacaccatc tccaccgcc  
481 ttcgcagcgc caggaacagc atcagtgtgc ccattgccag cacttcagac aaaatcctag  
541 gggccgctct ggccggtgtg gagctgcct gggggatggc gagagacact gccgagtatg  
601 ctgccaacac ccgagctggc cggctggcct ctggaggggc cgacttggcc ttgggtggtg  
661 tgcgagaagat ggtagagttc ctctccctc cagccaacga agagtcagcc gctgccccag  
721 gactccagga tgcccagaaa cctcccagg ccaagccgag cctcgtgagc agggttggg  
781 ccctggccaa cactctctct agacacacct tccagaccac agcccgggca ctgaaacagg  
841 gccatgcctt ggccatgtgg atcccaggty tggcacctct gagcagcctg gcccagtggg  
901 gcacgtcggc ggccatgcag gtggtgtcgc ggcggcggag cgaggtgcgg gtgccctggc  
961 tgcacagcct cacggccacc caggaggagg accacgagga gcacacggac actgacgggg  
1021 aggagaccgg ggaggaggag gactcagaga ccgaggagag caagctcagc gagggggcag  
1081 ccttgccagg ctcacagggc ctctgggca gcgtggcaca caccctgcag aaggccctcc  
1141 agagcacctg ctcagtcgtg atgtgggcac cggcggctgt gctgggcacg gcggggagga  
1201 tgctgcacct cacgccagcc caggccacct cctcaaccaa ggcagggcc atgtccctgt  
1261 ccgacgccct gaaggggtgtt actgacaacg tgggtggacac agtgggtaac tacgtgccgc  
1321 tccccaggct gtcgctgatg gaaccogaga gcgaattccg ggacatcgac aaccctccag  
1381 ccgaggccga gcgcggggag gcggaacgca gagggtccgg ggcaccgccc gcttgcccag  
1441 agcccgccc gcgcctgog cctcccogcg gcagcctgog gagcgtcog ggccctggggc  
1501 cggaggaacg cgtggacgca accgccttgc cgcgcggcg cttcccggcc gtgccccgcg  
1561 agaagcccac gcgcggggtc agcagacagct tcttccggcc cagcgtcatg gagcccatcc  
1621 tgggcccagc gcagtacagc cagctgcgca agaagagctg agccgcctac ctaccgcctt  
1681 cccggcccgg cgcttttccc ccaccccggg ccggggccgct gtcgagagca gacagacaga  
1741 acctacgaag aagtgagcgt tggcttctc aaagtagtcc cgttgggtcc cgagcctctc  
1801 tccaaggatg ctgccaaggc acacatcttt tgagcatcct ctttgggctt agctatcaga  
1861 acccattttt gagaaacatc agagtagcag tctgctttga ttctaggcct tggttttttt

1921 tattatTTTT tttttaccac aagattaatt gcctaactta tctctcactt ctttcaccaa  
 1981 atttgtggcc ccttgacatt gaactgtttc caatatttat atccatcctc tgtagacaaa  
 2041 tatttgctac cagcgagtaa cgtgtcacca cgccaagggc tcaagcaggc gatcctgaca  
 2101 catgttcaag ccccgaatgc agagattcct gtgagtacac aggctctcag ctgactcctt  
 2161 tgaagggaac agcgtgcgta agtcgcttca gtcgtgtctg actcttcggg accccatagt  
 2221 ctgtagcccg ctaggctcct ctgtocatgt gattctccag gcaagaatgc tggagtgggt  
 2281 tgccatgccc tctcctccag gggaatcttc cggaccaggc attgaaccag tgtcccttat  
 2341 gtctcctgca ttggcaggcg ggttctttac cactagtgcc acctgggata catattagca  
 2401 tcattttctg agaaccctgc cctcttcaca ggctgagtc tgcctgctgc tctgtagcgc  
 2461 cacctttctg ttcccggcta cattgccatt tgcaccgttc cagttttaca cctaagttca  
 2521 ctctttcttc cacgttttga gtgctggcgc cccagtcct aggagacaat agagaacgtt  
 2581 agttatataa acaatatata tatagaatcc atggggcgtc cttgggtggc tcagcgataa  
 2641 ggaatccacc tgcaatgcag gagatacagg tttggtcctt ggttgggaaa tcccttggag  
 2701 taggaaatgg caacctactc cagtattctt gcttgggaat cccttagagg agcctggtgg  
 2761 gctacagtcc atggggctgc aaacagtcag acatgactga gggactgaac aacaacagca  
 2821 tagaccctat agccacagtt cattocaaac ccatttttga aaacgttaac atttggtacc  
 2881 tttagaaatg catacatata atttaaaatt caaacattgc aaaaggggtg gtgctttcct  
 2941 ccctgcattc cctggttccc ctttcccaga gcagtcttgg cagcagtctt gtgtaccctt  
 3001 tccactacag actgagggcg cacaagcaca catgtgcacc ctccccactc ttcatacaag  
 3061 ctgtgggggtg ttatactcac tgctttttca ctcagcagta catcttagaa gtattttgta  
 3121 agcagtatca taaattctcc ttgctgtttt taacagccac atagtaagtg cttcataata  
 3181 tagacatgct atatttgatt aaaccagttc cttaatcatg aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa  
 3241 aaaa

**Forward:** 5'-GTCGAGAAGATGGTAGAGTTCCTC-3'  
**Reverse:** 5'-TGGAAGGTGTGTCTAGAGAGAGTG-3'  
**Reverse omgeschreven:** 5'-CACTCTCTCTAGACACACCTCCA-3'



## Sequentie PPARgamma

1 cctggctctc tgtgagttat tcccacctcc tccaaacatt tggaaacgga cgtcttgact  
61 cattgggtgcy ttcccaagtt ttactgccat gcatcttttt ctttgaacgg aactggcctt  
121 ttgcaagaaa tagaccaaat atcgggtgga gtcgtggcaa atccctgttc cgtgctgtga  
181 tgggtgaaac tctgggagat gctcttattg acccagagag tgagcccttc gctgtcacag  
241 tgtctgcaag gacctcacia gaaattacca tggttgacac agagatgccg ttttggccca  
301 ccaactttgg gatcagctcc gtggaccttt ctatgatgga tgaccactcc catgcctttg  
361 acatcaagcc cttcaccacc gttgacttct ccagcatttc cactccgcac tatgaggaca  
421 ttccgttccc aagagctgac ccgatggttg cagattataa gtatgacctg aagctccaag  
481 agtaccaaag tgcaatcaaa gtggagcctg tatccccacc ttattattct gaaaagactc  
541 agctgtacag taagcctcat gaagagcctt ccaactccct catggccatt gaatgccggg  
601 tctgtgggga taaagcgtca gggttccact atggagttca tgcttgtgaa ggatgcaagg  
661 gtttcttccg gaggacaatc agattgaaac ttatttacga taggtgtgat cttaactgtc  
721 ggatccacia gaaaagtaga aataaatgtc agtactgtcg gtttcagaag tgccttgctg  
781 tggggatgtc tcataatgcc atcaggtttg ggcgcatgcc acaggccgag aaggagaagc  
841 tgttagcggg gatctccagc gatatcgacc aactgaacc agagtctgct gacctccggg  
901 ccctggcaaa gcatttgtat gactcgtaca taaagtcctt cccgctgacc aaagcaaagg  
961 cgagggcgat cttgacggga aagacgacag acaaatcacc gtttgttatac tatgacatga  
1021 actccttaat gatgggagaa gataaaatca agttcaagca catcagtccc ctgcaggagc  
1081 ccagcaaaga ggtggccatc cgcacttcc aggggtgtca gtttcgctcc gtggaagccg  
1141 tgcaggagat cacagagtac gccaagaata tccccggctt tgtgaacctt gacttgaacg  
1201 accaagtaac tctcctaaaa tacggcgtgc acgagatcat ttacacgatg ctggcctcct  
1261 tgatgaataa ggatggggtc ctcatatccg agggccaagg attcatgaca agggagtttc  
1321 taaagagcct gcgaaagccc tttggtgact ttatggagcc caagttcgag tttgctgtga  
1381 agttcaacgc actggaatta gatgacagcg acttagcaat atttatagct gtcattattc  
1441 tcagtggaga ccgcccaggt ttgctgaacg tgaagccat tgaggacata caagacaatc  
1501 tgctgcaagc cttggagctg cagctcaagc tgaaccaccc cgagtctctc cagctctttg  
1561 ccaagctgct ccagaaaatg acagacctca gacagattgt gacagaacac gtgcagctgt  
1621 tgcaagtaat aaagaaaaca gagacggaca tgagtctcca cccactccta caggaaatct  
1681 acaaggactt gtattagcag agaagtccga gttcactgac agcatcttcc ttctcccaat  
1741 tgcactatta ttttgagggg aaatctgaca cctaaaaatt actgtgaaag cattgaaaag  
1801 aaagtttaga ataata

Primers:

**Geel**

Forward: 5'-CCCTGGCAAAGCATTTGTAT-3'  
Reverse: 5'-GGATATGAGGACCCCATCCT-3'  
Reverse omgeschreven: 5'-AGGATGGGGTCCTCATATCC-3'

**Groen**

Forward: 5'-GTGAAGCCCATTGAGGACAT-3'  
Reverse: 5'-AGCTGCACGTGTTCTGTAC-3'  
Reverse omgeschreven: 5'-GTGACAGAACACGTGCAGCT-3'

**Blauw**

Forward: 5'-AAGAGCCTTCCAACCTCCCTCA-3'  
Reverse: 5'-CCGGAAGAAACCCTTGCAT-3'  
Reverse omgeschreven: 5'-ATGCAAGGGTTTCTCCGG-3'

**Roze**

Forward: 5'-GTGAAGTTCAACGCACTGGA-3'  
Reverse: 5'-ATGTCCTCAATGGGCTTAC-3'  
Reverse omgeschreven: 5'-GTGAAGCCCATTGAGGACAT-3'

Vet en onderstreept in het groen is tevens de reverse van roze.

## Sequentie PDE3B

1 atgaggaggg acgagcgaga cgccaaagcc atgcgggtccc cgccgccgcc ggacggggcc  
61 gcctcgcccc ccgagagtgt gaggaacggc tacgtgaagg gctgcgtgag cccccgcg  
121 caggaccctc cgcgcggtt cttcttccac ctctgccgct tctgcaacgt ggagctgctg  
181 ctgccgccgc ccgcctcccc tcagcagccg cggcgcggtt ccccttctc ccgggcgcgc  
241 ctcttgctgg gcgccttggc cgcctttgtc ctgcacctgc tgctcggctc ggggccgag  
301 agctgggctg ctggggccgc ccggttgccg accctgctga gcgtctgctc gcaaagcctc  
361 agccccctct tcagcatcgc ctgtgccttc ttcttctca cctgcttctt gaccggacc  
421 aagcggggcg ccgggcccgg ccggagcggc ggccgctcct ggtggctgct ggcactcccc  
481 gcctgctggt acctggggga cttcttgggt gggcagtggg aatcctggtc tcggggggac  
541 ggagacgcca gggccccggt cccgcacaca ccccagcgg tggcgggccg gtggttcttg  
601 gtgctgagct gcgtgggctt gttgacgctc gcgcagccgg ggaggctccg gcacagcatc  
661 gtggtgctgc tcttctccag cttcgtctgg tgggtgtcct tcaccagcct tggggcgtg  
721 cctccagccc tccggcccct gctgtcctgc ctggtggggg gcgtcggctg cctgctggcc  
781 ctggggctgg atcacttctt tcaaatacag gaagctcccc agcaacctca gttgtccagt  
841 accgcagaag aaaaagtgcc tgtgatcaga ccccgaggga ggtccagctg cgtgtcattc  
901 ggagaaactt caggcgggta ctatggcagt tgcaaaatgt tcaggagacc ttcgttgctc  
961 tgcattctga gagaacagat gattcttggg gattgggatt taaagcagtg gtataaacct  
1021 cactatcaga tttctggagg tggaaagtga gttgatcttt cagtgctaaa tgaggctcgc  
1081 aatatggtgt cagatcttct ggttgacccc acccttctc cacaagtcat tgcttcccta  
1141 cggagtatca gtagcttgat ggggtgctttc tcaggctcct gtaggccaaa gatgaatccc  
1201 ctcacaccat ttcttgatt ttatccctgc tctgagatag aggacccccg tgagaaaagga  
1261 gatcgaaaac ttcacaaggg gctgaacagt aggaatagtt taccaacccc acatctgagg  
1321 aggagctcgg gaacctcagg totgccaact atcgaccaga cttctccaag gtgggaacgc  
1381 aataatggca aacggcctca ccaagaattt ggcattttaa gtcaaggatg ctatctaaat  
1441 gggcctttta gttcaaatct actgacagtc ccgaagcaaa ggtcatcatc tgtatcgtta  
1501 actcaccatg taggtctaag aagagctggg ggtttacca gcatgaattc acccagtcac  
1561 ggaccagtgt ctgctggctc tccagctaac cgatcaccta tagaatttcc tgatactgct  
1621 gaatttctta ctaaaccacc tgtcatttta cacaaatctc tgagcagtac acccaattca  
1681 ccagatTTTT atcagcagct tagaaattct gatagcaatt tatgtaacag ctgtggacat  
1741 caaatactga aatatgatcc agcatctgaa ccagagtctg gtacagactg ccacagggaa  
1801 aagtcaggtg gcgaagacaa taccgTTTT tcaaaagcat cattcaacct taccgaagct  
1861 caacaagaag tggaaacaga gaacagagac ggcagaaaat tactttggga aggtgaaaat

1921 cacctaaaag cagcagcaca gaatgaagag caaccaata ttgaacaaga agcatcacag  
1981 gatctgattt taatagaaga ttatgactca ttaatagaaa atatgagtaa ctggaatttt  
2041 caaatttttg aacttgtaga aaagatggga gagaaatcag gaaggatcct cagtcaggtt  
2101 gtgtatacct tatttcaaga cactggctta ttggagatat ttaaaattcc cactctacaa  
2161 ttcatagaact actttcatgc tttagaaaat ggttatcgag acattcctta tcacaatcgt  
2221 atacatgccca cagacgtcct acatgctggt tggatatctga caacacggcc cattcctggc  
2281 ctacaggaga tccacagtga tcatggagca ggaaatgaaa cagcaattaa ccctgagcga  
2341 attgcttaca tttcgtcgag gagctgctcg attccagatg agagctatgg ctgtctatct  
2401 tcaaacattc ctgcgctgga actgatggct ctgtatgtgg cagctgccat gcatgactac  
2461 gaccaccgga gacggacaaa tgcgttctca gtggctacca atgccctca ggcagtctta  
2521 tacaacgaca gatctgtttt ggaaaatcat catgctgcat cagcctggac tctatatctt  
2581 tctcgtccag aatacaactt ccttcttaat cttgacaatg tggattcaa gcgctttcgt  
2641 tttttagtca tagaagcaat ccttgccaca gatcttaaaa agcattttga tttccttgct  
2701 gaattcaatg ccaaggccaa tgatgtaaat agtaacggta tagaatggag taatgaaaa  
2761 gatcgcctct tagtgtgcca ggtgtgcatc aaactggcag atattaatgg cccaaccaa  
2821 gttcgagact tgcatttgaa atggacagaa ggcattgtca atgaatttta tgagcagggg  
2881 gatgaagaag caaatcttgg tttgcccac agtcccctca tggatcgctt tttcctcaa  
2941 ctagcaaac tccaggaatc ttttatcacc cacatagtgg gtcccctgtg taactcctat  
3001 gacgctgctg gtctgctacc gggctcagtgg atagaatcag aagaggacga tgatactgaa  
3061 agttgttatg aggaagaaga tgctgaagaa ttagatacag aggatgaaga aatagaggac  
3121 aatctaaatt ctaaaccaca aagacggaaa ggcagacggc aaatattttg tcagctaatg  
3181 caccatctca ccgaaaacca caagatatgg aaggaaatca tagaggaaga agagaaatgt  
3241 aaagctgatg ggaataaact gcagatggag aattcttctt tacctcaagg agatgagatt  
3301 caggtcattg aagaagcaga tgaagaggaa gagagacagc tggaaataaaa gaaaaggcat  
3361 gttgaagaag tgccttgggc catgccttat gtcgatgtca ttgcccagtg ctcaccacc  
3421 tgacttgag ctgaccgctc ctaggtcgac aggccctaac actgtgagag gatccttgct  
3481 gtgccagcgt tcccactcc catgcacttt ttcaccacac ggatgaaaag tatkcttaag  
3541 agcttggttt cagttgactt gtgttgccaa gccatactc agtgctttta ctggtgtata  
3601 aatactttgt cataatactg ctttgctgag tagaaggctt ttattgttca tgaggcagga  
3661 gctgtacctt aaaactcaag taattcactg tagtttctca agtggccaac tttctgcttt  
3721 cttaaagaca tgatttaaaa aaaagaaaaa acaacaaggg aattccactc agcgccttca  
3781 ctgctatggc ccaggtttaa tctctgcttg agttcagtcc ccg

Forward: 5'-ACGTGAAGGGCTGCGTGAGC-3'  
Reverse: 5'-CTGCCAGCAGCCACCAGGAG-3'  
Reverse omgeschreven: 5'-CTCCTGGTGGCTGCTGGCAC-3'

## BHBA-receptor: GPR109a

### Sequentie rattus norvegicus

```
1 atgagcaagc agaaccactt tctggtgata aacggcaaga actgctgtgt gttccgagat
61 gaaaacatcg ccaaggtcct gccgcgggtg ttggggctgg agtttgtggt tggactcctg
121 ggtaatggcc ttgccttgtg gatcttctgt ttccatctca aatcctggaa atccagccgg
181 attttcttgt tcaacctggc cgtggctgac tttctcctga tcatttgctt gccgttcttg
241 acggacaact atgtccagaa ctgggactgg aggttcggga gcatcccctg ccgcgtgatg
301 ctcttcatgt tggccatgaa ccgacagggc agcatcatct tcctcacggt ggtggctgtg
361 gacagg tact tcaggggtgg ccaccgcac cacttctga acaagatctc caaccggacg
421 gcggccatca tctcttgctt cctgtggggc atcaccatcg gcctgacagt ccacctcctc
481 tacacggaca tgatgaccgc aaacggcgat gcaaacctgt gcagcagttt tagcatctgc
541 tacactttca ggtggcacga tgcaatgttc ctcttggaa tcttctgccc cctgggcatc
601 atcctgttct gctctggcag gatcatttgg agcctaaggc agagacagat ggacaggcac
661 gtcaagatca agagggccat caacttcac atggtgggtg ccattgtggt tgtcatctgc
721 ttctgcccga gtgtggccgt gaggatccgc atcttctggc tcctctacaa acacaacgtg
781 aggaactgtg acatctactc ctctgtggac ttggccttct tcaccaccct tagctttacc
841 tacatgaaca gcatgctoga cccggtggtc tactatttct ccagcccatc tttccccaac
901 ttcttctcca cgtgcatcaa ccggtgcctt cgaaggaaaa ccttgggcca accagataat
961 aaccggagca cgagtgtgga gctcacgggg gacccagca caatcagaag tattccaggg
1021 gcattaatga ctgaccccag tgagccaggc agccccctt atctggcttc cacatctcgt
1081 taa
```

## BLAST Bos Taurus

```
1 actcagagcc gcacctcggt cccogaacct tggctaggtg agctgctccc tggcgccaac
61 gcgattcact catgaacct tcccaactgc agaatacatt tctgaaaata ggcgagaaga
121 actgctgtgt gttcccgat gacttcattg ccaaagtgt gccgccggtc gtggggctgtg
181 agttcgtggt cgggctcctg ggcaatggcc ttgccctgtg gatcttctgc ttccacctca
241 agtctggaa agccagccgg gttttcctgt tcaacttggc cgtggctgac tttctcctga
301 tcatctgcct gccgttcctg gcggacaact acgtgcccag gtgggactgg aagtttgggg
361 agatcccctg ccggtcatg ctcttcatgt tggccatgaa ccgcccagggc agcatcattt
421 tcctcacctg ggtggccgtg gataggtact tccgggtggt ccatccccac catgccctga
481 acaagatctc caatcggaca gcgggcatca tctcctgcct cttgtggggc atccacctg
541 gcctgacggt ccaatctcta cacagaacga ggttgatcga gaatcagggt tcgaaactgt
601 gcagcagctt cagcatctgt gatgccttcc gctggcatga tgccatgttc ctctggagt
661 tctttgtgcc cctgggcata atctgttct gctcagtcag aattgtctgg agcctgcggc
721 agcggcaaat gaacaaacac gccaaatca ggcgggctat caacttcata atgggtgtag
781 ccattgtctt catcatctgc ttctgocca gcgtggccgt gcgtatacat attttctggc
841 tcttgcgcaa ggctggcacg gaaaactgtg acatctatcg ttcagtggac ctggcgtttt
901 acatcaccct cagcttcacc tacatgaaca gcatgctgga ccctttggtg tactacttct
961 ccagcccatc tttccccaac ttcttctcca ccttgatcaa ccgctgcctg aagaggaag
1021 ggccgatga gtcggataac aaccgcagca ccagcgtcga gctcactggg gatctgagca
1081 ctaccaagaa cgttcccag gctttgatgg ccaatcccag tgagccgcag agcccctctt
1141 atctgaatcc agtctccagt taaaaagcc aagcaaagaa gggagatgat catcaagcac
1201 caggatctct ggagaagccg tttggctggt gcacggagta acagagcctt ggtctgtggt
1261 ttcccagaac ttgcagatcc ggagaagcag atttagggca tcggtgtggc agtgtgggct
1321 gtttgctat agagtgtctc cacaggaac
```

Forward primer: 5'-TGGCGCCAACGCGATTCACT-3'  
Reverse primer: 5'-TGCTGCCCTGGCGGTTTCATG-3'  
Reverse omgeschreven: 5'-CATGAACCGCCAGGGCAGCA-3'

**Protocol zuiveren RNA uit leverweefsel**

- a. 30 mg leverweefsel met 600  $\mu$ l RLT buffer homogeniseren
- b. 3 min. 14.000 rpm centrifugeren
- c. 500  $\mu$ l supernatant over pipetteren in nieuw cupje
- d. 500  $\mu$ l ETOH toevoegen en direct mengen met pipet, op en neer pipetteren
- e. 500  $\mu$ l op spin column brengen
- f. 15s 10.000 rpm centrifugeren
- g. e. en f. herhalen
- h. 3x wassen
  1. 700  $\mu$ l RW1 toevoegen, 15s 10.000 rpm centrifugeren
  2. 500  $\mu$ l RPE toevoegen, 15s 10.000 rpm centrifugeren
  3. 500  $\mu$ l RPE toevoegen, 2 min. 10.000 rpm centrifugeren
- i. 1 min. 14.000 rpm voor verwijderen van buffer
- j. Nieuw cupje 50  $\mu$ l RNase vrij water toevoegen
- k. 1 min. 10.000 rpm



## Protocol zuiveren RNA uit vetweefsel, user developed protocol

- a. 100-200 mg vetweefsel in vloeibaar stikstof met 600  $\mu$ l RLT buffer, op en neer pipetteren. Homogeniseren voor 1 min.
- b. 3 min. bij kamertemperatuur 10.000 rpm centrifugeren
- c. 500  $\mu$ l supernatant overbrengen in nieuw buisje, 500  $\mu$ l 70% ethanol toevoegen en mengen door op en neer te pipetteren
- d. 500  $\mu$ l overbrengen op de spin column, 15s 10.000 rpm centrifugeren.
- e. 350  $\mu$ l RLT buffer toevoegen aan pellet, op en neer pipetteren en vortexen. 3 min. Centrifugeren op 10.000 rpm
- f. 300  $\mu$ l supernatant toevoegen aan 300  $\mu$ l 70% ethanol, samen pipetteren op de spin column, 15s op 10.000 rpm centrifugeren. Flow-through weggooien.
- g. 3x wassen
  1. 700  $\mu$ l RW1 toevoegen, 15s 10.000 rpm centrifugeren
  2. 500  $\mu$ l RPE toevoegen, 15s 10.000 rpm centrifugeren
  3. 500  $\mu$ l RPE toevoegen, 2 min. 10.000 rpm centrifugeren
- h. 1 min. 14.000 rpm centrifugeren voor verwijderen buffer
- i. 50  $\mu$ l RNase-vrij water in nieuw cupje
- j. 1 min. centrifugeren 10.000 rpm

## Protocol zuiveren RNA uit vetweefsel. Qiagen protocol, lipid tissue kit

- a. Homogeniseer 100 mg vetweefsel in 1 ml QIAzol Lysis Reagent
- b. Incubeer op kamertemperatuur voor 5 min.
- c. Voeg 200  $\mu$ l chloroform toe en schudt gedurende 15s.
- d. Incubeer op kamertemperatuur voor 2-3 min.
- e. Centrifugeer op 12.000 x g gedurende 15 min. op 4 graden Celcius.
- f. Transfereer de bovenste substantie in een nieuw buisje, voeg 1 volume van 70% ethanol toe en vortex.
- g. Transfereer het monster naar de RNeasy column in 2ml tube. Deksel dicht, centrifugeren gedurende 15s op 8000 x g. Gooi flow-through weg.
- h. Voeg 700  $\mu$ l buffer RW1 toe aan de column, centrifugeren gedurende 15s op 8000 x g en gooi de flow-through weg.
- i. Voeg 500  $\mu$ l buffer RPE toe aan de column, centrifugeer 15s op 8000 x g en gooi de flow-through weg.
- j. Voeg 500  $\mu$ l buffer RPE toe aan de column, centrifugeer gedurende 2 min. op 8000 x g.
- k. Zet de column in een nieuwe 1.5 ml tube. Voeg 30-50  $\mu$ l RNase-vrij water toe en centrifugeer 1 min. op 8000 x g.

## Protocol cDNA maken uit RNA, QIAGEN RNeasy Lipid Tissue Kit

- a. Pipetteer het volgende in een cupje:
  - 1  $\mu$ l oligo dT 500 $\mu$ g/ml
  - 10  $\mu$ l RNA bij vetweefsel, 1  $\mu$ l RNA bij leverweefsel
  - 1  $\mu$ l 10 mM dNTP's
  - 2  $\mu$ l H<sub>2</sub>O bij vetweefsel, 11  $\mu$ l H<sub>2</sub>O bij leverweefsel
- b. Verwarm de mix op 60 graden Celsius gedurende 5 min. en zet vervolgens direct in ijs.
- c. Centrifugeer kort
- d. Voeg toe:
  - 4  $\mu$ l 5x First strand buffer
  - 2  $\mu$ l 0.1M DTT
- e. Mix de inhoud en incubeer gedurende 2 min. op 37 graden Celsius.
- f. Voeg 1  $\mu$ l 200 units M-MLV RT (reverse transcriptase) toe en pipetteer op en neer.
- g. Incubeer gedurende 50 min. op 37 graden Celsius.
- h. Inactieveer door 15 min. op 70 graden Celsius te verwarmen.

## Protocol PCR

Pipetteer het volgende in een tube voor PCR, totaal 50 µl:

- 5 µl buffer
- 1 µl dNTP's 10 mM (10mM dATP, dGTP, dCTP en d TTP, pH neutraal)
- 1 µl forward primer
- 1 µl reverse primer
- 4 µl MgCl<sub>2</sub>
- 5 µl cDNA
- 0.5 µl Taq polymerase
- 32.5 µl H<sub>2</sub>O

Instellen PCR apparaat:

40 cycli						
<b>Temperatuur in graden Celsius</b>	95	95	5°C onder min. smeltemperatuur primers	77	72	4
<b>Tijd in min.</b>	5.00	0.30	0.30	0.45	10.00	∞

40 cycli ATGL						
<b>Temperatuur in graden Celsius</b>	95	95	56,4	77	72	4
<b>Tijd in min.</b>	5.00	0.30	0.30	0.45	10.00	∞

40 cycli HSL						
<b>Temperatuur in graden Celsius</b>	95	95	54,4	77	72	4
<b>Tijd in min.</b>	5.00	0.30	0.30	0.45	10.00	∞

40 cycli Perilipine						
<b>Temperatuur in graden Celsius</b>	95	95	57,7	77	72	4
<b>Tijd in min.</b>	5.00	0.30	0.30	0.45	10.00	∞

40 cycli PPARy						
<b>Temperatuur in graden Celsius</b>	95	95	51,7	77	72	4
<b>Tijd in min.</b>	5.00	0.30	0.30	0.45	10.00	∞

40 cycli PDE3B						
<b>Temperatuur in graden Celsius</b>	95	95	58,5	77	72	4
<b>Tijd in min.</b>	5.00	0.30	0.30	0.45	10.00	∞

40 cycli GPR109a						
<b>Temperatuur in graden Celsius</b>	95	95	58,5	77	72	4
<b>Tijd in min.</b>	5.00	0.30	0.30	0.45	10.00	∞

## Protocol elektroforese

- a. Maak de gel door 750 mg agarose poeder te mengen met 50 ml TAE oplossing. Verhit de erlenmeyer met inhoud 1 min. in de magnetron totdat de agarose is opgelost.
- b. Pipetteer 2,5  $\mu$ l oranje Eridium vloeistof in de mal voor de gel en voeg het mengsel toe. Meng het geheel goed en laat het gedurende 15-20 min. uitharden tot een glazige gel.
- c. Verwijder de mal en de pinnetjes uit de gel.
- d. Pipetteer in het eerste vakje 3  $\mu$ l midrange marker.
- e. Pipetteer in het tweede vakje 3  $\mu$ l lowrange marker.
- f. Pipetteer een zelfde aantal druppels loading dye op een parafilm als het aantal monsters
- g. Pipetteer 5  $\mu$ l van het monster en meng met een druppel loading dye en pipetteer het vervolgens in het volgende vakje.
- h. Doe dit voor elk monster
- i. Breng de gel in de TAE-oplossing en sluit de elektroforese aan op 90 V gedurende 30-45 minuten afhankelijk van de passagesnelheid.
- j. Schakel de elektroforese uit en breng de gel in de Trans-UV machine.
- k. Maak de mooist mogelijke print van de gel.



# Oligonucleotide Synthesis Report

Isogen Life Science  
 Order ID: 5095898  
 Customer ID: 112252  
 Your Order ID (PO#): 14153 / 14153  
 Order Date: 21/04/2011  
 Lab No.: 4333  
 No. of Oligos: 12/12

No.	Oligo Name	Sequence (5' -> 3')	Yield [OD]	Yield [µg]	Yield [nmol]	Concentration [pmol/µl]	Vol. for 100pmol/µl	Tm [°C]	MW [g/mol]	GC-Content	Synthesis Scale	Purification	Modification	Barcode IDO	QC Report
1	ATGL-For	GTGGACGGGTGGCATCTC AGA (20)	9.5	265	42.8	-	428	61.4	6198	60 %	0.05 µmol	HPSF	-	013047074	-
2	ATGL-Rev	AAGCGGAGGCCATCCCT GTA (20)	4.4	123	20.0	-	200	61.4	6127	60 %	0.05 µmol	HPSF	-	013047075	-
3	HSL-For	CGGGAGGCTCTCTTTGA GG (20)	4.2	124	20.0	-	200	61.4	6180	60 %	0.05 µmol	HPSF	-	013047076	-
4	HSL-Rev	TGGAGATGGTCTGCAGG AAC (20)	6.8	184	29.6	-	296	59.4	6222	55 %	0.05 µmol	HPSF	-	013047077	-
5	Plin-For	GTCGAGAAGATGGTAGA GTTCTC (24)	5.4	148	19.9	-	199	62.7	7432	50 %	0.05 µmol	HPSF	-	013047078	-
6	Plin-Rev	TGGAAGGTGTGTCTAGA GAGAGTG (24)	7.3	194	25.7	-	257	62.7	7552	50 %	0.05 µmol	HPSF	-	013047079	-
7	PPAR&#amp;#947;-For	AAGAGCCTTCCCACTCCC TCA (21)	4.5	129	20.4	-	204	59.8	6295	52.4 %	0.05 µmol	HPSF	-	013047080	-
8	PPAR&#amp;#947;-Rev	CCGGAAAGAAACCCCTTGC AT (19)	5.5	150	26.0	-	260	56.7	5781	52.6 %	0.05 µmol	HPSF	-	013047081	-
9	PDE3B-For	ACCGTGAAGGGGCTGCGTG AGC (20)	5.7	158	25.4	-	254	63.5	6223	65 %	0.05 µmol	HPSF	-	013047082	-
10	PDE3B-Rev	GTGCAGCAGCCACCACAG GAG (20)	2.7	75	12.2	-	122	65.5	6137	70 %	0.05 µmol	HPSF	-	013047083	-
11	GPR109A-For	CATGAACCGCCAGGGCA GCA (20)	3.4	93	15.2	-	152	63.5	6121	65 %	0.05 µmol	HPSF	-	013047084	-
12	GPR109A-Rev	TGACCGCTCAGGCCGAT GGT (20)	3.4	98	15.9	-	159	63.5	6174	65 %	0.05 µmol	HPSF	-	013047085	-

## Bibliografie

---

1. Nishino, N., Tamori, Y., Kasuga, M. 2007. *Insulin efficiently stores triglycerides in adipocytes by inhibiting lipolysis and repressing PGC-1 $\alpha$  induction*. Kobe J. Med sci., vol 53, pp.99-106
2. Thering, B.J., Graugnard, D.E., Piantoni, P., Loor, J.J. 2009. *Adipose tissue lipogenic gene networks due to lipid feeding and milk fat depression in lactating cows*. J. Dairy Sci.
3. Sheth, S.B., Chaganti, K., Bastepe, M., Ajuria, J., Brennan, K., Biradavolu, R., Colman, W. 1997. *Cyclic AMP phosphodiesterases in human lymphocytes*. British journal of Haematology, 784-789
4. Niiya, T., Osawa, H., Onuma, H., Suzuki, Y., Taira, M., Yamada, K., Makino, H. 2001. *Activation of mouse phosphodiesterase 3B gene promoter by adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells*. FEBS Letters 505, 136-140.
5. Murray, F., MacLean, M.R., Pyne, N.J. 2002. *Increased expression of the cGMP-inhibited cAMP-specific (PDE3) and cGMP binding cGMP-specific (PDE5) phosphodiesterases in models of pulmonary hypertension*. British Journal of Pharmacology 137, 1187-1194
6. Liu, H., Maurice, D.H. 1998. *Expression of cyclic GMP-inhibited phosphodiesterases 3A and 3B (PDE3A and PDE3B) in rat tissues: Differential subcellular localization and regulated expression by cyclic AMP*. British Journal of Pharmacology 125, 1501-1510.
7. Granneman, J.G., Moore, H.P.H., Krishnamoorthy, R., Rathod, M. 2009. *Perilipin controls lipolysis by regulating the interactions of AB-hydrolase containing 5 (Abhd5) and adipose triglyceride lipase (Atgl)*. The journal of biological chemistry vol 284. no. 50. pp.34538-34544
8. Berger, K., Lindh, R., Wierup, N., Zmuda-Trzebiatowska, E., Lindqvist, A., Manganiello, V.C., Degerman, E. 2009. *Phosphodiesterase 3B is localized in caveolae and smooth ER in Mouse hepatocytes and is important in the regulation of glucose and lipid metabolism*. PLoS ONE.
9. Arimura, N., Horibat, T., Imagawa, M., Shimizu, M., Sato, R. 2003. *The peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  regulates the expression of the perilipin gene in adipocytes*. The journal of Biological Chemistry. Vol.279. No. 11. pp. 10070-10076
10. Sumner, J.M., McNamara, J.P. 2007. *Expression of lipolytic genes in the adipose tissue of pregnant and lactating Holstein dairy cattle*. J. Dairy Science. 90:5237-5246
11. McCarthy, S.D., Waters, S.M., Kenny, D.A., Diskin, M.G., Fitzpatrick, R., Patton, J., Wathes, D.C., Morris, D.G. 2010. *Negative energy balance and bovine hepatic gene expression*. PresS. Physiol Genomics.



12. Miyoshi, H., Souza, S.C., Zhang, H.H., Strissel, K.J., Christoffolete, M.A., Kovsan, J., Rudich, A., Kraemer, F.B., Bianco, A.C., Obin, M.S., Greenberg, A.S. 2006. *Perilipin promotes hormone-sensitive lipase-mediated adipocyte lipolysis via phosphorylation-dependent and -independent mechanisms*. Journal of Biological Chemistry Vol. 281, No. 23 pp. 15837-15844
13. Xu, C., Wang, Z., Zhang, R., Zhang, H., Fu, S., Xia, C. 2010. *Effect of NEFA and glucose levels on CPT-1 mRNA expression and translation in cultured bovine hepatocytes*. Journal of Veterinary Medical Science.
14. Lemor, A., Hosseini, A., Sauerwein, H., Mielenz, M. 2009. *Transition period-related changes in the abundance of the mRNAs of adiponectin and its receptors, of visfatin, and of fatty acid binding receptors in adipose tissue of high-yielding dairy cows*. Domestic Animal Endocrinology 37. pp. 37-44.
15. McNamara, J.P., Valdez, F. 2005. *Adipose tissue metabolism and production responses to calcium propionate and chromium propionate*. J. Dairy Sci. 88:2498-2507.
16. Contreras, G.A., O'Boyle, N.J., Herdt, T.H., Sordillo, L.M. 2010. *Lipomobilization in periparturient dairy cows influences the composition of plasma nonesterified fatty acids and leukocyte phospholipid fatty acids*. J. Dairy Sci. 93:2508-2516.
17. Baumgard, L.H., Corl, B.A., Dwyer, D.A., Bauman, D.E. *Effects of conjugated linoleic acids (CLA) on tissue response to homeostatic signals and plasma variables associated with lipid metabolism in lactating dairy cows*. Journal of animal science 80: 1285-1293.
18. Wang, H., Hu, L., Dalen, K., Dorward, H., Marcinkiewicz, A., Russell, D., Gong, D., Londos, C., Yamaguchi, T., Holm, C., Rizzo, M.A., Brasaemle, D., Sztalryd, C. 2009. *Activation of hormone-sensitive lipase requires two steps, protein phosphorylation and binding to the PAT-1 domain of lipid droplet coat proteins*. Journal of Biological Chemistry vol. 284, no. 46 pp. 32116-32125.
19. Sztalryd, C., Xu, G., Dorward, H., Taney, J.T., Contreras, J.A., Kimmel, A.R., Londos, C. 2003. *Perilipin A is essential for the translocation of hormone-sensitive lipase during lipolytic activation*. Journal of Cell Biology vol 161, no. 6 pp. 1093-1103.
20. Seifi, H.A., LeBlanc, S.J., Leslie, K.E., Duffield, T.F. 2010. *Metabolic predictors of postpartum disease and culling risk in dairy cattle*. The veterinary journal.
21. Brasaemle, D.L., Subramanian, V., Garcia, A., Marcinkiewicz, A., Tothenberg, A. 2009. *Perilipin A and the control of triacylglycerol metabolism*. Mol. Cell. Biochem. 326:15-21
22. Harvatine, K.J., Perfield II, J.W., Bauman, D.E. 2009. *Expression of enzymes and key regulators of lipid synthesis is upregulated in adipose tissue during CLA-induced milk fat depression in dairy cows*. The Journal of Nutrition 139: 849-854.

23. Drackley, J.K. 1999. *Biology of dairy cows during the transition period: the final frontier?* J. Dairy Sci. 82:2259-2273.
24. Grummer, R.R. 1993. *Etiology of lipid-related metabolic disorders in periparturient dairy cows.* J. Dairy Sci. 76:3882-3896.
25. Holtenius, P. Holtenius, K. 1996. *New aspects of ketone bodies in energy metabolism of dairy cows.* J. Vet. Med. A 43, 579-587.
26. Roche, J.R., Friggens, N.C., Kay, J.K., Fisher, M.W., Stafford, K.J., Berry, D.P. 2009. *Body condition score and its association with dairy cow productivity, health and welfare.* J. Dairy Sci. 92:5769-5801.
27. Doepel, L., Lapierre, H., Kennelly, J.J. 2002. *Peripartum performance and metabolism of dairy cows in response to prepartum energy and protein intake.* J. Dairy Sci. 85:2315-2334.
28. Large, V., Peroni, O., Letecier, D., Ray, H., Beylot, M. 2004. *Metabolism of lipids in human white adipocyte.* Diabetes Metab. 30:294-309.
29. Saltiel, A.R., Kahn, C.R. 2001. *Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism.* Nature. Vol. 414.
30. Kershaw, E.E., Hamm, J.K., Verhagen, L.A.W., Peroni, O., Katic, M., Flier, J.S. 2006. *Adipose Triglyceride Lipase function, regulation by insulin, and comparison with adiponutrin.* Diabetes, Vol. 55.
31. Shen, W., Patel, S., Miyoshi, H., Greenberg, A.S., Kraemer, F.B. 2009. *Functional interaction of hormone-sensitive lipase and perilipin in lipolysis.* Journal of lipid research. Vol. 50.
32. Desvergne, B., Wahli, W. 1999. *Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism.* Endocrine Reviews 20(5): 649-688.
33. Greenberg, A.S., Egan, J.J., Wek, S.A., Garty, N.B., Blanchette-Mackie, E.J., Londos, C. 1991. *Perilipin, a major hormonally regulated adipocyte-specific phosphoprotein associated with the periphery of lipid storage droplets.* The Journal of Biological Chemistry. Vol. 266. No. 17. pp. 11341-11346.
34. Blanchette-Mackie, E.J., Dwyer, N.K., Barber, T., Coxey, R.A., Takeda, T., Rondinone, C.M., Theodorakis, J.L., Greenberg, A.S., Londos, C. 1995. *Perilipin is located on the surface layer of intracellular lipid droplets in adipocytes.* Journal of lipid research. Vol. 36.
35. Contreras, J.A., Karlsson, M., Østerlund, T., Laurell, H., Svensson, A., Holm, C. 1996. *Hormone-sensitive lipase is structurally related to acetylcholinesterase, bile salt-stimulated lipase, and several fungal lipases.* The Journal of Biological Chemistry. Vol. 271, No. 49, pp. 31426-31430.

36. Samiei, A., Liang, J.B., Ghorbani, G.R., Hirooka, H., Yaakub, H., Tabatabaei, M. 2010. *An evaluation of beta-hydroxybutyrate in milk and blood for prediction of subclinical ketosis in dairy cows*. Pl. J. Vet. Sci. 13(2):349-56.
37. Deiullis, J., Shin, J., Murphy, E., Kronberg, S.L., Eastridge, M.L., Suh, Y., Yoon, J., Lee, K. 2010. *Bovine adipose triglyceride lipase is not altered and adipocyte fatty acid-binding protein is increased by dietary flaxseed*. Lipids 45:963-973.
38. Zimmerman, R., Strauss, J.G., Haemmerle, G., Schoiswohl, G., Birner-Gruenberger, R., Riederer, M., Lass, A., Neuberger, G., Eisenhaber, F., Hermetter, A., Zechner, R. 2004. *Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase*. Science vol. 306:1383-1386.
39. Smirnova, E., Goldberg, E.B., Makarova, K.S., Lin, L., Brown, W.J., Jackson, C.L. 2006. *ATGL has a key role in lipid droplet/adiposome degradation in mammalian cells*. EMBO reports 7, 106-113.
40. Miyoshi, H., Perfield II, J.W., Souza, S.C., Shen, W., Zhang, H., Stancheva, Z.S., Kraemer, F.B., Obin, M.S., Greenberg, A.S. 2007. *Control of adipose triglyceride lipase action by serine 517 of perilipin A globally regulates protein kinase A-stimulated lipolysis in adipocytes*. J. Biol. Chem. 282:996-1002.
41. Haemmerle, G., Zimmermann, R., Hayn, M., Theussl, C., Waeg, G., Wagner, E., Sattler, W., Magin, T.M., Wagner, E.F., Zechner, R. 2002. *Hormone-sensitive lipase deficiency in mice causes diglyceride accumulation in adipose tissue, muscle and testis*. J. Biol. Chem. 277:4806-4815.
42. Yonezawa, T., Haga, S., Kobayashi, Y., Katoh, K., Obara, Y. 2008. *Regulation of hormone-sensitive lipase expression by saturated fatty acids and hormones in bovine mammary epithelial cells*. Biochemical and Biophysical Research Communications 376 36-39.
43. Xu, J.X., Albrecht, E., Viergutz, T., Nürnberg, G., Zhao, R.Q., Wegner, J. 2009. *Perilipin, C/EBP $\alpha$ , and C/EBP $\beta$  mRNA abundance in longissimus muscle and different adipose tissue of Holstein and Charolais cattle*. J. Meat Sci. 83 120-126.
44. Fernyhough, M.E., Hausman, G.J., Dodson, M.V. 2007. *Progeny from dedifferentiated bovine adipocytes display protracted adipogenesis*. Cells Tissues Organs 188:359-372.
45. Taniguchi, M., Guan, L.L., Zhang, B., Dodson, M.V., Okine, E., Moore, S.S. 2008. *Adipogenesis of bovine perimuscular preadipocytes*. BBRC 336 54-59.
46. Everts, R.R., Jorritsma, R., Houweling, M., van Leengoed, L.A.M.G., Tielens, A.G.M. 2008. *New insights in the pathogenesis of ovine pregnancy ketosis*. Thesis Honours Program, Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University.
47. Pérez, R., Tupac-Yupanqui, I., Dunner, S. 2008. *Evaluation of suitable reference genes for gene expression studies in bovine muscular tissue*. BMC Molecular Biology 9:79

48. Janovick-Guretzky, N.A., Dann, H.M., Carlson, D.B., Murphy, M.R. Loor, J.J., Drackley, J.K. 2007. *Housekeeping gene expression in bovine liver is affected by physiological state, feed intake, and dietary treatment*. J. Dairy Sci. 90:2246-2252
49. Hosseini, A., Sauerwein, H., Mielenz, M. 2010. *Putative reference genes for gene expression studies in proprionate and  $\beta$ -hydroxybutyrate treated bovine adipose tissue explants*. Journal of animal physiology and animal nutrition 94 e178-e184
50. Robinson, T.L., Sutherland, I.A., Sutherland, J. 2007. *Validation of candidate bovine reference genes for use with real-time PCR*. Veterinary Immunology and Immunopathology 115 160-165