

LOTHAR PANICKE¹, MARIAN SCHMIDT², THEODORA KRÓL² und
RUDOLF STAUFENBIEL³

Proteolytische Aktivitäten der lysosomalen Enzyme bei Milchrindern*

1. Mitteilung: Variation der lysosomalen Enzyme bei Milchkühen

Summary

Titel of the paper: Proteolytic activities of lysosomal enzymes in dairy cattle. I. Variation of lysosomal enzymes in dairy cattle

There are no references to be found in the literature dealing with genetic aspects of lysosomal enzyme activities in blood of dairy cows.

The used amino peptidases are connected to the proteolysis.

1011 investigated cows showed variation coefficients of $\approx 50\%$, higher than in milk traits.

In simultaneous samples it reduces to 20-30 % similar to daily milk samples.

The heritability coefficients $h^2 = 0,10-0,20$ is approximately between fertility traits and milk traits.

The investigation of lysosomal enzyme activities might be limited to plasma.

No additional information could be gained using the leukocytes.

Changing activities of enzymes in plasma are aqally directed to the milk performance. It may be concluded that the trait spectrum might be reduced to DP-IV, AGR, ALA, AGLD and EL as well especially to protein yield of milk.

Key words: lysosomal enzymes, dairy cattle, leucocytes, plasma

Zusammenfassung

In der Literatur werden keine genetischen Aspekte zu den lysosomalen Enzymaktivitäten aus dem Blut bei Milchkühen behandelt. Die verwendeten Amino-peptidasen stehen im Zusammenhang mit der Proteolyse. Bei 1011 beprobten Kühen liegen die Variationskoeffizienten am Gesamtmaterial mit 50 % wesentlich höher als bei den Milchleistungsmerkmalen. Bei gleichzeitigen Proben reduziert er sich auf 20-30 % ähnlich den Einzelkontrollergebnissen der Milch.

Die zu erwartenden Heritabilitätskoeffizienten um $h^2 = 0,10$ bis $0,20$ liegen im Bereich zwischen den Fruchtbarkeits- und Milchleistungsmerkmalen.

Die Untersuchung der lysosomalen Enzymaktivität kann auf das Plasma beschränkt werden, da aus den Leukozyten kein zusätzlicher Informationsgewinn nachgewiesen werden konnte.

Veränderte Enzymaktivitäten im Plasma sind gleichgerichtet mit der Milchleistung. Bei zusammenfassender Betrachtung kann das Merkmalspektrum der Enzyme eingeschränkt werden auf DP-IV, ARG, ALA, AGLD und EL sowie vorwiegend auf den Eiweißertrag in der Milchleistung.

Schlüsselwörter: Lysosomale Enzyme, Milchrind, Leukozyten, Plasma

1. Einleitung

Zwischen der in der Zelle vorliegenden Menge der Proteine und den Umsatzraten, welchen sie ständig unterliegen, bestehen enge kinetische Verhältnisse. Die Abbau-

* Mit freundlicher Unterstützung des Kultusministeriums des Landes Mecklenburg-Vorpommern.

ten der Proteine scheinen die Endkonzentration dieser Biomoleküle zu bestimmen. Der individuelle Abbau der Proteine ist recht unterschiedlich. Der Mechanismus des Abbaues der Zellproteine verläuft auf drei verschiedenen Wegen (BIENKOWSKI, 1983), der basalen Degradation im molekularen System, der intralysosomalen Proteolyse und der ubiquitin-abhängigen Degradation (SOMMER und SEUFERT, 1992) im Zellzytoplasma. Es kann davon ausgegangen werden, daß die intrazellulären Proteine einem ständigen Umsatz unterliegen und daß dieser Prozeß von wichtiger physiologischer Bedeutung ist. Im Vergleich zu den heutigen Kenntnissen bezüglich der molekularen Mechanismen in der Proteinsynthese sind die biochemischen Prozesse des Proteinabbaus weniger bekannt (PANICKE et al., 1996).

Der Umsatz der individuellen Proteine wird oft kinetisch beschrieben als ein Resultat zweier Reaktionen der nullten Ordnung der Proteinsynthese und einer Reaktion erster Ordnung der Degradation (MILLWARD, 1978; AMENTA und BROCHER, 1981). Für die degradativen Prozesse bedeutet das, daß für ein Gewebe oder eine Zellpopulation die Abbauraten eines bestimmten Proteins proportional zur Konzentration dieses Proteins sind und weiter, daß alle in der Zelle vorliegenden Moleküle dieses Proteins die gleiche Wahrscheinlichkeit haben, der Degradation zu unterliegen. Eine wichtige Folgerung dieses Prozesses liegt darin, daß die Proteolyse zu jeder Zeit in allen Zellen des Gewebes das gleiche Ausmaß hat (AMENTA und BROCHER, 1981).

Die Degradation verschiedener Eiweißmoleküle reguliert so eine wichtige Funktion der Zelle wie die Gestaltung und Kontrolle vieler Schlüssel-Enzyme und anderer Bioregulatoren, weiter die Ausschleusung abnormaler Eiweißmoleküle, welche durch Fehler in der Biosynthese entstanden sind. Nicht weniger wichtig sind spezielle Konstruktionen von Multikomplexen wie der Ribosomen oder Mitochondrien.

Proteolytische Aktivitäten der lysosomalen Enzyme bei Rindern

Zu den Leistungen des Rindes gehören Milchleistung, Wachstum, Fruchtbarkeit und Gesundheit. Sie sind vom Genotyp des Tieres und den vorhandenen Umweltbedingungen abhängig. Als Ansatz zur methodischen Betrachtung nimmt der Protein- und Energiestoffwechsel eine zentrale Stellung für diese Leistungen ein. Mit der Energiebereitstellung werden der Fett- und Proteinstoffwechsel anabol über die Lipogenese und Proteinsynthese und katabol über die Lipolyse und Proteolyse gesteuert und in Balance gehalten. KNAP (1995) simuliert in einem Computermodell die Relation zwischen beiden mit unterstellten Ausgangswerten ohne Experiment.

Unterschiede in der Proteinleistung als Milch oder Wachstum wurden zwischen den Laktations- und Altersabschnitten nachgewiesen und auch hormonell begründet (PURCHAS et al., 1971; PRITCHARD et al., 1972; AMIR, 1974; SEJRSEN et al., 1982; DAY et al., 1986; FRIEDEL et al., 1986; PANICKE, 1987; PANICKE, 1991; STAUFENBIEL, 1993; LACHMANN, 1994; PANICKE et al., 1995). Die Proteinleistung ist das Ergebnis der Biosynthese als Proteinsynthese und des degradativen Abbaus als Proteolyse. Die Degradation bestimmt mit das Eiweißniveau in den biologischen Einheiten.

Die intralysosomale proteolytische Degradation umfaßt den Abbau der meisten Proteine und Lipide. Sie spielt eine vorrangige Rolle in der Regulation des Eiweißgehaltes in der Zelle. Zwischen der Aktivität der lysosomalen Enzyme und dem Gehalt an Protein in der Zelle besteht eine enge Korrelation nach PFEIFER (1981). Die proteolytische Aktivität ist gehemmt in allen Zellen des wachsenden Organismus bei erhöhter Proteinleistung (SCHMIDT et al., 1992, 1993; KROL et al., 1994). Das betrifft auch die Leukozyten. Damit wäre die proteolytische Aktivität der Leukozyten ein möglicher Parameter für die Begründung und Beurteilung unterschiedlicher Proteinleistungen sowie der Leistungsstabilität.

Zielstellung

Das Ziel der Untersuchung besteht

1. in der Schätzung der Größenordnung der Enzymaktivitäten der einbezogenen Enzyme ihrer Variation
2. in der Quantifizierung des Einflusses systematischer Einflußfaktoren durch die Effektschätzung
3. in der Schätzung des genetischen Varianzanteils an der Gesamtvarianz als Heritabilitätskoeffizient
4. in der Untersuchung des Zusammenhanges zwischen der Proteinleistung in der Milch und den proteolytischen Aktivitäten der lysosomalen Enzyme beim Milchrind.

Darüber wird in gesonderten Beiträgen berichtet.

2. Material

Die proteolytischen lysosomalen Enzymaktivitäten werden wie auch die Leistung durch systematische Umweltfaktoren beeinflusst. Dem wird in der Versuchsanlage und Versuchsplanung weitgehend durch Gleichzeitigkeit und Gleichverteilung der Milchkühe entsprochen (Tab. 1).

Der Stichprobenumfang der untersuchten Tiere ist in der ersten Laktation mit 500 beprobten Kühen und der zweiten Laktation mit 511 beprobten Kühen gut und vergleichbar besetzt. Auch in den Laktationsabschnitten (LA) am Anfang der Laktation bis zum 150. Laktationstag (LA=A) und am Ende der Laktation nach dem 150. Laktationstag (LA=E) sind mit über 200 Kühen je LA ausreichend besetzt. Bei halbjährlicher Beprobung von neun untersuchten Gruppen (Untersuchungsgruppen (Tab. 3)) erreicht die Standardabweichung der Melktage am Anfang der Laktation nur einen Monat und am Ende der Laktation nur weniger als 2 Monate. Damit wurde den Einflußfaktoren wie Laktation, Laktationsverlauf, Alter und differenziertes Wachstum zwischen jungen und älteren Kühen weitgehend entsprochen.

Die Aufteilung auf die Teilpopulation Schwarzbuntes Milchrind und Holstein Frisian (SMR und HF) bei den Laktationskontrollen, Einsatzleistungen und Laktationsleistungen entspricht der Bestandsstruktur (Tab. 1) mit 579 zu 432, 457 zu 329 und 427 zu 260 respektive. Die Beprobung der Kühe erfolgte eine Woche nach der monatlichen Milchleistungsprüfung. Wiederholt einbezogene Kühe im folgenden Laktationsab-

schnitt führen zu mehr Laktationskontrollen von 1011 gegenüber 786 Einsatzleistungen, während Abgänge die abgeschlossenen 305-Tage-Laktationsleistungen auf 687 reduzieren.

Tabelle 1

Stichprobenumfang in den Laktationsabschnitten und Teilpopulationen von 786 Kühen mit 1011 Proben (Sample sizes in parts of lactation and parts of population of 786 cows with 1011 test results)

Lakt.- Nr.	Lakt.- Abschn.*	Teilpopulation		Gesamt	Melktage	
		SMR	HF		\bar{x}	s
1	A	117	100	217	51	32
1	E	158	125	283	224	48
2	A	158	101	259	46	24
2	E	146	106	252	219	57
Proben = Lakt.-Kontr.		579	432	1011	140	96
Einsatzleistung		457	329	786		
Laktationsleistung		427	260	687		

*A = bis 150. Lakt.-Tag

E = nach dem 150. Lakt.-Tag

Der zirkadianen Rhythmik der Tiere wurde durch den Probennahmebeginn um 8.00 Uhr bei etwa 50 Proben in der Regel weitgehend entsprochen. Der einbezogene Versuchstierbestand ist im oberen Leistungsniveau repräsentativ mit Leistungen um 6750 kg Milch, 306 kg Fett und 235 kg Eiweiß bei Einsatzleistungen um 30 kg Milch (Tab. 2).

Die Untersuchungen der Enzymaktivitäten der Milchkühe erfolgte im November und im April bei stabiler Winterfütterung. Durch die Analyse der Eiweiß- und Harnstoffgehalte in der Milch (PANICKE et al., 1999c) konnte eingeschätzt werden, daß 87 % der einbezogenen Milchkühe unterschiedlicher Laktationsabschnitte bedarfsgerecht optimal versorgt waren. Es wurden nur klinisch gesunde Tiere einbezogen.

3. Methode

Den einbezogenen Milchkühen wurde Vollblut aus der *Vena jugularis* entnommen und heparinisiert. Die Isolierung der Leukozyten aus dem Rinderblut erfolgte nach einem verbesserten Isolierungsverfahren von ZEMAN et al. (1988). Dies ist eine einfache und schnelle Methode für die gleichzeitige Reinigung der Lymphozyten und Granulozyten im peripheren Blut.

Die Plasma- und Leukozytenfraktionen werden nach folgendem Verfahren aus dem Blut durch eine Dichtegradientenzentrifugation mittels Gradisol G gewonnen und anschließend bis zur Untersuchung durch Tiefgefrieren konserviert.

- Eingabe von 1,5 ml Gradisol in ein silikonisiertes 12,5 ml-Zentrifugenglas bei 22 bis 25°C
- Überschichtung mit 2,5 ml heparinisiertem Blut
- Zentrifugation über 25 Minuten bei 400 x g mit einer swing-out-Zentrifuge
- Entnahme des klaren Überstandes (Plasma)

- Entnahme der nebligen Phase mit einer Pasteurpipette (Mischpopulation von Lymphozyten und Granulozyten)
- Waschen der Mischphase mit 5 ml 0,9 % NaCl
- Leukozyten werden in 3 ml 0,1 % Triton X-100 suspendiert und eingefroren
- Nach dem Auftauen werden die desintegrierten Leukozyten über 20 Minuten bei 20000 x g zentrifugiert.
- Nutzung des klaren Überstandes für enzymatische Analysen

Die Enzymaktivitäten wurden aus den Blutleukozyten in nmol/mg Protein/h und aus dem Blutplasma in nmol/l Plasma/h als Mittelwert aus Doppelbestimmungen fluorenspektrometrisch für folgende Enzyme bestimmt (BARRETT, 1972):

1. Saure Phosphatase	=	KF	(EC.3.1.3.2)
2. Dipeptidylpeptidase IV	=	DP-IV	(EC.3.4.14.5)
3. Arginylaminopeptidase	=	ARG	(EC.3.4.11.6)
4. Alanylaminopeptidase	=	ALA	(EC.3.4.11.14)
5. Leucylaminopeptidase	=	LEU	(EC.3.4.11.2)
6. N-Azetyl-Glukosaminidase	=	NAGL	(EC.3.2.1.30)
7. α -Glukosidase	=	AGLD	(EC.3.2.1.20)
8. Lysosomale Esterase	=	EL	(EC.3.1.1.2)

Die Amino-peptidasen spalten synthetische Substrate wie Alanin-2-Naphtylamid, Leucin-2-Naphtylamid oder Arginin-2-Naphtylamids mit einer Freisetzung des 2-Naphtylamins. Naphtylamin wird gekoppelt mit diatisierten o-Dianisidin zu einem stabilen Farbkomplex, dessen Intensität bei 530 nm gemessen wird und errechnet aus einer Standardlösung des 2-Naphtylamins. Alle Substrate werden bei einer 1,5 mM Konzentration eingesetzt und auf einen pH von 7,0 eingestellt. Der systematische Fehler beträgt 4,1 %, die Wiederholbarkeit 97 %.

Die Dipeptidylpeptidase IV ist ein spezifisches proteolytisches Enzym, welches Dipeptide mit endständigem Glycin (Gly) und Prolin (Pro) von Polypeptiden abspaltet. Als Substrat für die Bestimmung der Enzymaktivität wird Gly-Pro-2-Naphtylamid (0,25 mM) im Puffer pH 7,5 verwandt. Nach Spaltung wird 2-Naphtylamin spektrometrisch gemessen. Der systematische Fehler liegt bei 3,3 % und die Wiederholbarkeit bei 98 %.

Zur Bestimmung der NAGL wird p-NPh-Glukosaminid genutzt, wobei nach Spaltung das freiwerdende p-Nitrophenol bei 405 nm gemessen wird. Der systematische Fehler beträgt 3,0 %.

Zur Bestimmung der lysosomalen Esterase wird das freiwerdende p-Nitrophenol aus p-Nitrophenylpalmitat (1,0 mM, pH 4,0) gemessen. Der systematische Fehler beträgt 4,4 %.

Das Enzym Alfa-Glukosidase (AGLD) EC.3.2.1.20 wurde am Anfang der Untersuchungen mit einbezogen, weil es ein glycogenspaltendes Enzym ist und in dem Metabolismus der Leukozyten eine wichtige Rolle spielen könnte. Es hatte sich aber gezeigt, daß dieses Enzym thermolabil ist und nach Einfrieren und Auftauen einen großen, nicht berechenbaren Teil seiner Aktivität verliert.

Die Ergebnisse der Milchleistungsprüfung mit der letzten monatlichen Kontrolle (LK) eine Woche vor der Blutprobenentnahme, der Einsatzleistung (EL) zu Laktationsbeginn und der abgeschlossenen 305-Tage-Laktationsleistung wurden für:

die Milchmenge in kg	(MK)		
den Fettertrag in kg	(FK)	den Fettgehalt in %	(FP)
den Eiweißertrag in kg	(EK)	den Eiweißgehalt in %	(EP)

vom VIT Verden Paretz übernommen.

Für die Effektschätzung der systematischen Einflußfaktoren wurde das Programm PEST Version 3.1 von GROENEVELD (1993) verwendet. Die Signifikanz der Differenzen zwischen den Stufen der Einflußfaktoren wurden mit dem t-Test und Tukey-Test aus dem Programmpaket SAS geprüft.

Dem geschätzten Heritabilitätskoeffizienten liegt das Halbgeschwistermodell unter Eingang der Tiereffekte zugrunde. Die Schätzung der Heritabilitätskoeffizienten erfolgte mit dem Programm VCE 3.2 von GROENEVELD (1996).

Die Schätzung erfolgte auf der Grundlage des folgenden Einzelmerkmalsmodells:

$$Y_{ijklmn} = \mu + UG_i + BG_j + GT_k + LG_l + KM_m + A_n + e_{ijklmn}$$

Y = individuelle Leistungsausprägung

μ = allgemeines Mittel

UG_i = i-ter Untersuchungszeitpunkt (9)

BG_j = j-ter Betrieb (3)

GT_k = k-te Teilpopulation: SMR (2)
HF

LG_l = l-te Laktationsgruppe (4)

1 / A = 1. Lakt. Anfang bis 150. Lakt.-Tag

1 / E = 1. Lakt. Ende nach 150. Lakt.-Tag

2 / A = 2. Lakt. Anfang bis 150. Lakt.-Tag

2 / E = 2. Lakt. Ende nach 150. Lakt.-Tag

KM_m = m-te Alterskalbemonat (8)

A_n = zufälliger Effekt der n-ten Kuh

e_{ijklmn} = zufälliger Resteffekt

4. Ergebnisse und Diskussion

Für die lysosomalen Enzymaktivitäten aus dem Plasma und den Leukozyten beim Rind liegen keine vergleichbaren Ergebnisse vor. Zielgerichtete Fütterungsversuche mit begrenzten Tierzahlen sind dafür nicht geeignet. In die vorliegenden Untersuchungen der lysosomalen Enzymaktivitäten aus dem Blutplasma und den Leukozyten bei Milchkühen wurden 786 Kühe einbezogen von denen 687 die Laktationsleistung abgeschlossen haben. Die als „Laktationskontrolle“ bezeichnete amtliche Kontrolle im Laktationsmonat wurde eine Woche vor der Beprobung der Milchkühe durchgeführt.

Die Durchschnittsleistungen der Milchleistung (Tab. 2) zeigen auf ein hohes und re-

präsentatives Leistungsniveau mit 6748 kg Milch, 306 kg Fett und 235 kg Eiweiß in der Laktation bei Einsatzleistungen (1. Kontrolle) um 30 kg Milch bei 4,5 % Fett und 3,2 % Eiweiß übereinstimmend mit einer maximalen Tagesleistung von 53,8 kg Milch. Die Variationskoeffizienten (s-%) der Ertragsmerkmale um 20 % sind erwartungsgemäß.

Tabelle 2

Mittelwerte (\bar{x}), Standardabweichungen (s), Variationskoeffizienten (s-%), Minima und Maxima der Milchleistung und lysosomalen Enzymaktivitäten (Means (\bar{x}), standard deviations (s) coefficients of variation (s-%), minimum and maximum performance and activity of lysosomal enzymes)

Merkmal	n	\bar{x}	s	s %	Min.	Max.
Laktationskontrolle						
MK (Milch-kg)	1011	23,2	8,3	36	3,4	53,8
FP (Fett-%)	1011	4,7	0,79	17	2,4	9,0
FK (Fett-kg)	1011	1,1	0,37	34	0,2	2,7
EP (Eiweiß-%)	1011	3,6	0,46	13	2,4	5,1
EK (Eiweiß-kg)	1011	0,8	0,23	29	0,2	1,5
Einsatzleistung						
MK	786	30,5	6,8	22	9,2	53,8
FP	786	4,5	0,73	16	2,5	8,3
FK	786	1,4	0,37	26	0,4	2,9
EP	786	3,2	0,29	9	2,4	4,7
EK	786	1,0	0,20	20	0,2	1,6
Laktationsleistung						
MK	687	6748	1349	20	2612,0	10946,0
FP	687	4,6	0,55	12	3,2	6,5
FK	687	306	61	20	146,0	476,0
EP	687	3,5	0,22	6	3,0	4,2
EK	687	235	43	18	104,0	366,0
Plasma						
Enzymaktivitäten in nmol/l Plasma/h						
KF	1048	272	177	65	32,8	1640,0
DP-IV	1052	16152	10231	63	57,6	49459,2
ARG	1052	1990	1284	65	8,3	6604,8
ALA	1052	2850	1551	54	134,4	9600,0
LEU	1052	2530	1395	55	76,8	6912,0
NAGL	1035	1237	729	59	131,2	6232,0
AGLD	554	537	271	50	65,6	2033,6
EL	1051	630	332	53	32,8	1590,8
Leukozyten						
Enzymaktivitäten in nmol/mg Protein/h						
KF	1034	407	387	95	9,7	4666,5
DP-IV	919	183	218	119	3,2	1412,2
ARG	882	57	56	98	1,1	334,1
ALA	1024	127	151	119	2,4	962,4
LEU	1036	78	74	95	2,0	518,2
NAGL	919	299	348	116	4,2	2312,0
EL	1030	102	100	98	1,6	609,2

Die Mittelwerte der untersuchten lysosomalen Enzymaktivitäten (Tab. 2) im Untersuchungsmaterial weisen einen breiten Variationsbereich zwischen Minima und Ma-

xima aus. Die Variationskoeffizienten sind für die Enzymaktivitäten aus dem Plasma eineinhalb bis doppelt so hoch im Gesamtmaterial mit etwa 50 bis 60 % wie für die Milchleistung aus der Laktationskontrolle.

Bei den lysosomalen Enzymaktivitäten aus den Leukozyten erreichen sie Werte über 100 %. Dies spricht dafür, daß die Enzymaktivitäten aus dem Plasma für die Untersuchungen geeigneter sind als aus den Leukozyten. Die Ursache mag auch in methodischen Grenzen der Trennung der Leukozyten liegen. Dafür sprechen auch die eventuell geringen Variationskoeffizienten (Tab. 3) innerhalb der Untersuchungsgruppen der lysosomalen Enzymaktivitäten aus dem Plasma für die Aminopeptidasen und die lysosomale Esterase um 20-30 %. Daraus ist auch die Empfehlung der Gleichzeitigkeit vergleichbarer Untersuchungen der lysosomalen Enzyme mit der Milchleistung abzuleiten.

Tabelle 3

Variationskoeffizienten (s %) der lysosomalen Enzyme aus Plasma und Leukozyten in den Untersuchungsgruppen (Coefficients of variation (s-%) of lysosomal enzymes from plasma and leucocytes in tested samples)

Merkmal	Untersuchungsgruppen								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Enzyme Plasma									
KF	32	56	42	45	37	67	42	42	48
DP-IV	43	31	17	24	43	21	30	34	21
ARG	33	49	18	13	37	22	32	26	54
ALA	54	18	16	23	42	19	25	20	32
LEU	54	20	22	10	39	23	25	19	29
NAGL	41	37	29	41	50	43	55	47	53
AGLD	59	51	35	44	42	35	-	-	-
EL	20	18	22	18	36	24	31	31	23
Enzyme Leukozyten									
KF	56	46	67	70	47	48	55	99	55
DP-IV	47	27	56	90	-	60	69	60	34
ARG	88	91	71	67	50	-	59	66	33
ALA	71	132	67	54	50	106	72	74	39
LEU	65	114	55	33	58	93	56	71	45
NAGL		75	45	65	57	95	88	76	35
AGLD		96	100	45	-	-	-	-	-
EL	43	76	40	81	37	59	80	59	52

Die geschätzten Effekte der systematischen Einflußfaktoren (Tab. 4) sind gleichgerichtet auf die Milchleistung und die lysosomalen Enzymaktivitäten. Ausgewiesen sind die halbjährlich aufeinanderfolgenden Untersuchungsgruppen (UG), der Betriebseinfluß, die Teilpopulationen HF und SMR sowie die vier Laktationsgruppen am Anfang und Ende der ersten und weiteren Laktationen. Günstig auf diese Untersuchungen hat sich die positive Leistungsentwicklung des Versuchstierbestandes von UG 1 bis UG 8 um fast 2000 kg Milch von -1096 auf +888 oder um 62 kg Fett bzw. auch 62 kg Eiweiß ausgewirkt. Dies sind 1,5 Standardeinheiten (s) (Tab. 4) bei Milch- und Eiweißleistung und etwa 1 s bei den Fett-kg. Die Ursachen dafür sind in der genetischen

schen und Umweltverbesserung zu sehen. Insbesondere bei den differenzierten Untersuchungsgruppen (UG) als auch bei den schwarzbunten Teilpopulationen (GT) aber auch bei den Herdenunterschieden steigen mit den lysosomalen Enzymaktivitäten die Milchleistungen oder umgekehrt. Dies trifft insbesondere für die Dipeptidase DP-IV, die Aminopeptidasen, ARG und ALA sowie für die lysosomale Esterase EL zu. Das sind die eigentlich wichtigsten Enzyme, welche im Proteinumsatz (DP-IV, ARG, ALA, LEU) und im Lipidstoffwechsel (EL) eng beteiligt sind. Die Differenzen zwischen den Gruppen in Tabelle 4 konnten weitgehend für die Ertragsmerkmale gesichert werden. Die untersuchten Gruppen sind mit mehr als 100 Tieren besetzt bis auf UG 2 mit 79, UG 3 mit 45, UG 4 mit 30 und HL/L 3 mit 78 Kühen.

Die Heritabilitätskoeffizienten (h^2) in Tabelle 5 konnten an 646 Tieren geschätzt werden. Diese Anzahl ist dafür relativ gering. Trotzdem sollte darauf nicht verzichtet werden, da in der Literatur dazu keine Ergebnisse vorliegen. Die geschätzten Heritabilitätskoeffizienten für die lysosomalen Enzyme aus dem Plasma liegen mit $h^2 = 0,10$ bis $0,20$ im Bereich zwischen Fruchtbarkeit und Milchleistung für die Aminopeptidasen DP-IV, ARG, LEU und die Alfa-Glukosidase. Die Fehler liegen mit $0,03$ bis $0,04$ im Bereich der Fehler der Milchleistungsmerkmale, die aber sehr hohe Heritabilitätskoeffizienten um $h^2 = 0,3-0,5$ für die Ertragsmerkmale auswiesen. Die lysosomalen Enzymaktivitäten aus den Leukozyten sind mit Ausnahme von DP-IV und ARG ungeeignet. Sie liegen in der Größenordnung des Fehlers. Damit dürften die Enzymaktivitäten aus dem Plasma auch genetisch für Veränderungen in der Population und als mögliches Stabilitätskriterium nicht uninteressant sein.

Tabelle 5

Geschätzte Heritabilitätskoeffizienten für Milchleistung und lysosomale Enzymaktivitäten an 646 Kühen
(Estimated coefficients of heritability for milk performance and activity of lysosomal enzymes of 646 cows)

Merkmal	h^2	s_h^2	h^2	s_h^2
	Laktationsleistung		Einsatzleistung	
MK	0,30	0,13	0,15	0,11
FP	0,65	0,13	0,31	0,11
FK	0,52	0,04	0,44	0,12
EP	0,57	0,12	0,28	0,14
EK	0,23	0,12	0,15	0,11
	Plasmaenzyme		Leukozytenenzyme	
KF	0,18	0,03	0,00	0,00
DP-IV	0,11	0,03	0,21	0,04
ARG	0,13	0,04	0,12	0,04
ALA	0,00	0,03	0,01	0,02
LEU	0,08	0,02	0,00	0,00
NAGL	0,32	0,03	0,04	0,03
AGLD	0,18	0,05	0,03	0,10
EL	0,00	0,00	0,04	0,03

Tabelle 4a

Geschätzte Effekte der Einflußfaktoren auf die Milchleistung (Estimated effects of factor on milk performance)

Parameter		Merkmale Milchleistung*					Anzahl n
		EK _{LK}	EK _{EL}	MK _{LL}	FK _{LL}	EK _{LL}	
n		1011	786	687	687	687	1011
\bar{x}		0,80	0,96	6748	306,2	235,2	-
s		0,23	0,20	1349	60,7	43,1	-
s %		29	21	20	20	18	-
Effekte der Einflußfaktoren:							
Unter-	1	-0,15	-0,12	-1098	-37,6	-34,6	126
suchungs-	2	-0,08	-0,08	-850	-31,9	-32,2	79
gruppe	3	-0,19	-0,13	-902	-44,1	-28,1	45
	4	-0,04	-0,04	-294	-20,4	-8,1	30
	5	-0,03	-0,02	106	-8,9	2,2	99
	6	0,10	0,04	406	21,7	13,1	141
	7	0,01	0,01	134	16,2	6,6	198
	8	0,10	0,09	888	24,7	27,2	186
	9	0,04	0,09				107
Betrieb:							
AA	1	-0,01	-0,01	-56	-1,4	-3,1	795
DL	2	0,04	0,02	82	1,7	5,0	138
HL	3	0,05	0,06	269	7,4	14,3	78
Teilpopulation:							
HF	1	0,02	0,03	417	5,9	10,6	432
SMR	2	-0,02	-0,02	-254	-3,6	-6,4	579
Laktationsgruppe:							
	1 / A						217
	1 / E						283
	2 / A						259
	2 / B						252

*EK = Eiweiß-kg
MK = Milch-kg
FK = Fett-kg

LK = Laktationskontrolle
EL = Einsatzleistung
LL = Laktationsleistung

Schlußfolgerungen

Die lysosomalen Enzymaktivitäten bei Rindern sind in der Literatur wenig behandelt. Da Protein- und Energieansatz und -umsatz genetisch determiniert sind, erscheinen genetisch-physiologische Untersuchungen mit der Proteinsynthese und Proteolyse auch beim Milchrind begründet. Die Untersuchungen konnten durchgeführt werden aus 1011 Blutproben von 786 Milchkühen mit einem repräsentativen mittleren Leistungsniveau um 6750 kg Milch, über 300 kg Fett und um 235 kg Milcheiweiß im Durchschnitt der einbezogenen Laktationen bei einer maximalen Tagesleistung von 53,8 kg Milch. Die positive Leistungsentwicklung im Untersuchungszeitraum von fast 2000 kg Milch in vier Jahren hat sicherlich die Untersuchungen begünstigt.

Bei zusammenfassender Betrachtung dieser Ergebnisse sowie der Ergebnisse von

Tabelle 4b

Geschätzte Effekte der Einflußfaktoren auf die lysosomalen Enzyme aus dem Plasma (Estimated effects of factor on lysosomal enzymes from plasma)

Parameter	Merkmale								Anzahl	
	Enzymaktivitäten aus dem Plasma									
	KF	DP-IV	ARG	ALA	LEU	NAGL	AGLD	EL	n	
n	1011	1011	1011	1011	1011	1011	554	1011	1011	
\bar{x}	271	16152	1990	2850	2530	1236	537	630	-	
s	177	10231	1284	1551	1395	729	271	332	-	
s %	65	63	65	54	55	59	50	53	-	
Effekte der Einflußfaktoren:										
Untersuchungsgruppe	1	-108	-15944	-1873	-2321	-2197	-90	-50	-386	126
	2	-55	-16401	-1764	-2593	-2341	-118	12	-558	79
	3	345	-1659	-268	757	687	-301	-147	228	45
	4	-5	-1760	-759	359	-187	-491	-121	-194	30
	5	103	4991	571	819	993	-593	-100	112	99
	6	92	8290	-100	428	661	737	-185	70	141
	7	-24	8218	1069	1222	819	252	-	-69	198
	8	-80	-2513	477	652	427	-94	-	193	186
	9	-40	4946	598	-754	-230	-217	-	433	107
Betrieb:										
DA	1	10	-330	-32	-90	-16	-24	-55	-13	795
DL	2	-18	-583	-129	27	116	205	342	77	138
HL	3	-51	3282	412	652	-30	-86	96	-1	78
Teilpopulation:										
HF	1	12	31	-98	2	35	-18	-11	-1	432
SMR	2	-9	-23	71	-1	-26	13	8	1	579
Laktationsgruppe										
1 / A	-23	-1417	31	-177	59	-146	-26	9	217	
1 / E	-2	-324	107	-3	-140	-11	-42	9	283	
2 / A	-8	577	-98	174	143	8	9	10	259	
2 / E	33	1168	-48	-1	-51	149	54	-30	252	

PANICKE et al. (1999b) kann geschlußfolgert werden:

1. Die phänotypische Variation der in nmol/l Plasma/h ausgewiesenen Enzymaktivitäten einschließlich der systemischen Einflußfaktoren liegt höher als bei der Milchleistung (Tab. 2). Mit einem Variationskoeffizienten (s %) um 50-60 % liegen sie im Gesamtmaterial etwa eineinhalb bis doppelt so hoch wie bei der entsprechenden als Laktationskontrolle bezeichneten Einzelkontrolle der Milchleistungsprüfung für die Enzymaktivitäten aus dem Plasma. Innerhalb des Untersuchungszeitpunktes (Tab. 3) realisiert sich der Variationskoeffizient (s %) mit 20-30 % für die wichtigsten Aminopeptidasen auf die Hälfte.
2. Die Veränderungen der lysosomalen Enzymaktivitäten aus dem Plasma sind gleichgerichtet mit der Entwicklung der Milchleistung. Dies ist auch aus den geschätzten Effekten der systematischen Einflußfaktoren (Tab. 4) Untersuchungsgruppe (UG), Betrieb und Genotyp (GT) abzuleiten. Sie, Milchleistung und Enzymaktivität sind zeitgleich zu betrachten.

3. Die geschätzten Heritabilitätskoeffizienten (h^2) liegen mit $h^2 = 0,10-0,20$ für ausgewählte Enzyme in der Größenordnung zwischen denen der Fruchtbarkeit ($h^2 < 0,10$) und denen der Milchleistung ($h^2 > 0,20$).
4. Die Untersuchungen können auf die lysosomalen Enzymaktivitäten aus dem Plasma eingeschränkt werden. Die lysosomalen Enzymaktivitäten aus den Leukozyten bringen keinen höheren Informationsgewinn, weisen einen geringeren Heritabilitätskoeffizienten (h^2) aus und liegen in der phänotypischen Variation weit höher. Letzteres könnte auch mit in den methodischen Grenzen der Leukozytentrennung begründet liegen.
5. Die lysosomalen Enzyme könnten bei zusammenfassender Betrachtung mit den Ergebnissen von PANICKE et al. (1999) als Stabilitätsparameter in Betracht gezogen werden. Dafür können für die Enzyme die Merkmale auf die drei bis vier Aminopeptidasen, Dipeptidylpeptidase IV (DP-IV), Arginylaminopeptidase (ARG), Alanylaminopeptidase (ALA) und Leucylaminopeptidase (LEU) sowie auf die für die Energiebereitstellung bedeutsamen Enzyme Alfa-Glukosidase (AGLD) und lysosomale Esterase (EL) nur aus dem Blutplasma beschränkt werden.
6. Als Milchleistungsmerkmal für die Proteinleistung erscheint der Eiweißertrag in der Laktationskontrolle und auch in der gesamten Laktationsleistung mit mittleren Korrelationskoeffizienten um 0,4 bis 0,5 geeignet (PANICKE et al., 1999). Dabei sollte der Fettertrag nicht unberücksichtigt bleiben.

Literatur

- AMENTA, J.S.; BROCHER, S.C.:
Studies on protein turnover in cell culture: Evidence for the existence of a specific proteolysis state and its relation to cellular proliferation and cellular senescence. *Acta biol.med.germ.* 40 (1981), 1215-1226
- AMIR, J.:
Early breeding of dairy heifers prospects and limitations. 25. EVT, Kopenhagen, 1974
- BARRETT, A.J.; HEATH, M.F.:
„Lysosomal Enzymes“ in „Lysosomes. A Laboratory Handbook“ (Dingle, J.T.Edit.) Elsevier Publ. Co. North-Holland (1977), 19-45
- BIENKOWSKI, R.J.:
Intracellular degradation of newly synthesised secretory proteins. *Biochem. Journ.* 214 S., 1983
- DAY, M.L.; IMAKAWA, K.; ZALESKY, D.D.; KITTEK, R.J.; KINDER, J.E.:
Effect of restriction of dietary energy intake during the prepubertal period. *J. Animal Sci.*, Albany, N.Y. 62 (1986), 1641-1648
- FRIEDEL, R.; PANICKE, L.; FRIEDEL, D.:
Biologische und züchterische Grundlagen für die Steuerung der Jungrinderaufzucht Teil 1. Fortschrittsbericht der Landwirtschaft, Berlin AdL, 1986
- GROENEVELD, E.:
Users manual zum Computerprogrammpaket PEST Version 3.1 (1993)
- GROENEVELD, E.:
REML VCE - a Multivariate Multimodel Restricted Maximum Likelihood (Co) Variance Component Estimation Package, Version 3.2, USER's GUIDE. Mariensee, 1996
- KNAP :
Simulated variation in body composition to generate variation in protein turnover-related maintenance requirements. 46. EVT 04.09.-07.09.1995 in Prag, P 1.5, 281

- KOLATA, G.:
New rule proposed for protein degradation. *Science*, Washington 234 (1986), 151-152
- KRÓL, T.; SCHMIDT, M.; KOLATAJ, A.; WITEK, B.:
Vinblastine - induced autophagy in mouse liver. *Comp. Biochem. Biophys.* 107 C (1994), 165-169
- LACHMANN, J.:
Experimentelle Untersuchungen zum Einfluß der antepartalen Energieversorgung auf die Leistung und Gesundheit der Milchkuh in der Frühaktation. Humboldt-Universität Berlin, Nat.-Math. Fak. I, Diss., 1994
- MILLWARD, D.J.:
Regulation of muscle protein turnover in growth and development. *Biochem. Soc. Trans.* 6 (1978), 494-499
- PANICKE, L.:
Färsenaufzucht. Agra-Broschüre, Leipzig, 1987
- PANICKE, L.:
Wachstumsverlauf der Färsen und Produktionsleistung der Milchkuh. *Mh. Vet.-Med., Jena* 46 (1991) 18, 636-638
- PANICKE, L.; DIETZEL, J.; KÜHN, CH.; FREYER, G.; GERNAND, E.; SCHWERIN, M.; DIETL, G.:
Nutzung genetischer Marker für die Verengung des Eiweiß-Fett-Verhältnisses in der Kuhmilch. Abschlußbericht zum Forschungsvorhaben 1116/92-25, gefördert aus Mitteln der EU, FBN Dummerstorf, 1995
- PANICKE, L.; SCHMIDT, M.; KOLATAJ, A.:
Degradationsrate und Proteinsynthese Kolloquium „Milchprotein und Proteinansatz“ 11./12. April 1996 in Graal Müritz vom FBN Dummerstorf und Agrarwiss.Fakultät der Univ. Rostock. Schriftenreihe des FBN Dummerstorf, 8, 1996, S. 90
- PANICKE, L.; SCHMIDT, M.; KRÓL, T.; STAUFENBIEL, R.:
Proteolytische Aktivitäten der lysosomalen Enzyme bei Milchrindern. 2. Mitt.: Lysosomale Enzymaktivitäten und die Milchleistung der Kühe. *Arch. Tierz., Dummerstorf*, Band 42, 1999b, im Druck
- PANICKE, L.; WEINGÄRTNER, J.; SCHMIDT, M.; KRÓL, T.:
Proteolytische Aktivitäten der lysosomalen Enzyme bei Milchrindern. 3. Mitt.: Beziehungen der Energie- und Eiweißversorgung zur lysosomalen Enzymaktivität beim Milchrind. *Arch. Tierz., Dummerstorf*, Band 42, 1999c, im Druck
- PFEIFER, U.:
Morphological aspects of intracellular protein degradation: Autophagy. *Acta Biol. Med. Germ.* 40 (1981), 1619-1624
- PRITCHARD, D.E.; HAFS, H.D.; TUCKER, H.D.:
Growth mammary, reproductive and pituitary hormone characteristics of Holstein heifers fed extra grain and melingesholocate. *J. Dairy Science*, Champaign, Ill. 55 (1972), 995-1004
- PURCHAS, R.W.; PEARSON, D.M.; PRITCHARD, D.E.:
Some carcass quality and endocrine criteria of Holstein heifers fed melangestrol acetate. *J. Anim. Science*, Champaign, Ill. 32 (1971), 628-635
- SAS:
Computer programme package SAS Institute Inc., North Carolina USA, 1990
- SCHMIDT, M.; KOLATAJ, A.; BULLA, J.; KRÓL, T.:
Activity of some lysosomal enzymes in plasma and leucocytes of rabbits exposed to effect of retinal and by blue cortisone. *Horm. Metab. Res.*, 24 (1992), 21
- SCHMIDT, M.; KOLATAJ, A.; BULLA, J.:
Die lysosomalen Enzyme der Leukozyten als Adaptationsindikator einiger Stresseinwirkungen beim Schwein. FBN-Kolloquium Dummerstorf, Teil 1 / 2, 1993
- SEJRSEN, K.; HUBER, J.T.; TUCKER, H.A.:
Influence of nutrition an mammary development in pre- and postpubertal heifers. *J. Dairy Science*, Champaign, Ill. 65 (1982), 793-800
- SOMMER, T.; SEUFERT, W.:
Genetic analysis of ubiquitin-dependent protein degradation. *Experientia* 48 (1992), 172-178

STAUFENBIEL, R.:

Energie- und Fettstoffwechsel des Rindes. Freie Universität Berlin, Fachbereich Veterinärmedizin, Habil.-Schrift, 1993

ZEMAN, K.; TEHORZEWSKI, H.; MAJEWSKA, E.; POKOCA, L.; PINKOWSKI, R.:

„A simple and rapid method for simultaneous purification of peripheral blood lymphocytes and granulocytes“. Immunol. Polska, XIII, 217-224, 1988

Eingegangen: 18.12.1998

Akzeptiert: 31.05.1999

Anschriften der Verfasser

Prof. Dr. LOTHAR PANICKE

Forschungsinstitut für die Biologie landwirtschaftlicher Nutztiere (FBN)

Wilhelm-Stahl-Allee 2

D-18196 Dummerstorf

Prof. Dr. MARIAN SCHMIDT, Dr. THEODORA KRÓL

Biologisches Institut der Pädagogischen Universität Kielce, Polen

Zeromskiego 5

25-369 Kielce, Polen

Prof. Dr. RUDOLF STAUFENBIEL

Freie Universität Berlin, Klinik für Kleintiere

Königsberg 65

D-14163 Berlin