

Poikimista edeltävän ruokinnan vaikutus lypsylehmien rasvakudoksen energia-aineenvaihduntaan liittyvien geenien toimintaan

Katariina Vara¹, Seija Jaakkola¹, Siru Salin¹, Juhani Taponen², Aila Vanhatalo¹, Tuomo Kokkonen¹ ja Kari Elo¹

¹Maataloustieteiden laitos, PL 27, 00014 Helsingin yliopisto, ²Helsingin yliopisto, Kliinisen tuotantoeläinlääketieteen osasto, 04920 Saarentaus, sähköpostiosoitteet etunimi.sukunimi@helsinki.fi

Aiemmissä tutkimuksissa poikimista edeltävän ruokinnan korkea energian saanti on yhdistetty lisääntyneeseen metaboliseen stressiin poikimisen jälkeen. Lehmillä stressiä ilmentäviä tekijöitä ovat esimerkiksi lisääntynyt kudosten insuliiniresistenssi, lisääntynyt rasvan kertyminen ja mobilisaatio. Tutkimuksen hypoteesina on että ummessaoloajan energian saanti vaikuttaa insuliiniresistenssiin, lipogeneesiin ja lipolyysiin liittyvien geenien toimintaan. Tutkimukseen valittiin 9 geeniä, jotka liittyvät em. ilmiöihin ja joiden toimintaa tutkittiin ihonalaisesta rasvakudoksesta otetuilla näytteillä. Geenitoiminnan eroja arvioitiin kahden energian saanniltaan eri tavoin ruokitun lehmäryhmän välillä sekä eri näytteenottoaikojen välillä.

Ummessaolokaudella kahta kahdeksan ayrshire-lehmän ryhmää ruokittiin joko rajoitetusti tai vapaasti. Lehmät saivat pelkästään säilörehua 6–4 viikkoa ennen odotettua poikimista. Tänä aikana rajoitetusti ruokitut lehmät saivat 100 % (ryhmän keskiarvo 95 MJ/d) ja vapaasti ruokitut käytännössä 150 % (keskiarvo 144 MJ/d) laskennallisesta energiantarpeestaan. Tunnutusruokinnan alkaessa kolme viikkoa ennen odotettua poikimista, vapaasti ruokitun ryhmän energian saantia alettiin rajoittaa siten, että laskennallinen energian saanti aleni vertailuryhmän tasolle ennustettuun poikimapäivään mennessä. Molempien ryhmien ruokintaan sisältyi kolmen viimeisen tiineysviikon aikana väkirehua 30 % rehuannoksen energiasisällöstä. Tunnutusruokinnan aikana ryhmien energian saannin keskiarvot olivat 107 MJ/d rajoitetusti ja 135 MJ/d vapaasti ruokitulla ryhmällä. Poikimisen jälkeen molempien ryhmien ruokinta oli samanlainen. Molemmista ryhmistä jouduttiin poistamaan yksi lehmä ensimmäisellä viikolla poikimisen jälkeen.

Ihonalaisesta rasvakudoksesta kerättiin biopsioimalla näytteet kahdeksan päivää ennen sekä yksi ja yhdeksän päivää jälkeen poikimisen. Kudosnäytteistä eristettiin kokonais-RNA, jonka laatu analysoitiin sekä elektroforeettisesti että spektrofotometrisesti. Geenitoiminnan tutkimus tehtiin kvantitatiivisellä PCR:llä. Tutkitut geenit olivat: adiponektiini (*ADIPOQ*), interleukiini-6 (*IL-6*), insuliinireseptorisubstraatti (*IRS*), leptiini (*LEP*), fosfoenolipyruvaattikarboksikinaasi 1 (*PCK1*), peroksisomiproliferaattoreilla aktivoituva reseptori gamma (*PPAR γ*), retinolia sitova proteiini 4 (*RBP4*), resistiini (*RES*) ja tuumorinekroositekijä-alfa (*TNF α*).

Koko aineistossa lehmien rasvakudoksen geenitoiminnasta löytyi eroja kolmen näytteenottoajan kohdan välillä seuraavilla geneilla: *ADIPOQ*, *LEP*, *RES*, *PPAR γ* , *RBP4* ja *PCK1* ($P < 0,05$). Selkein ajallinen geenitoiminnan ero havaittiin leptiinigeenissä ($P = 0,001$), jonka toiminta oli poikimisen jälkeen 46 % siitä mitä se oli 8 päivää ennen poikimista. Rajoitetusti ja vapaasti ruokittujen ryhmien välillä oli geenitoiminnassa eroja ennen poikimista. Tilastollisesti merkitsevin ero oli insuliinireseptorisubstraattigeenin toiminnassa ($P = 0,021$). Lisäksi suuntaa antavasti ($P < 0,10$) eroja oli adiponektiini- ja resistiinigeenien toiminnassa.

Poikimisen jälkeen (1 ja 9 päivää) kandidaattigeenien toiminnassa tapahtuneita muutoksia analysoitiin yksilöittäin insuliiniresistenssin näkökulmasta. Tällöin geenitoiminnan perusteella kolmella vapaasti ruokitulla lehmällä on suuntaa antavasti ($P < 0,10$) ja yhdellä rajoitetusti ruokitulla lehmällä on tilastollisesti merkitsevästi ($P < 0,05$) insuliiniresistenssin piirteitä.

Asiasanat: energiavaje, metabolinen stressi, ihonalainen rasvakudos, lipolyysi, lipogeneesi, geenitoiminta, lähetti-RNA

Johdanto

Aiemmissä tutkimuksissa erityisesti poikimista edeltävän ruokinnan korkea energian saanti on yhdistetty lisääntyneeseen metaboliseen stressiin poikimisen jälkeen (Kokkonen ym. 2005, Nielsen ym. 2010). Tämä tutkimus on osa laajempaa tutkimushanketta, joka tutkii poikimista edeltävän ruokinnan vaikutusta metaboliseen stressiin ja sen taustalla oleviin fysiologisiin mekanismeihin. Geenitoiminnan tutkimus on osa metabolisen stressin fysiologisten mekanismien tutkimusta. Tutkimushankkeessa analysoidaan geenitoiminnan muutoksia maksassa ja ihonalaisessa rasvakudoksessa, jotka ovat metabolisen stressin kannalta tärkeitä kudoksia.

Lypsylehmän rasvakudoksille sopeutuminen maidontuotannon käynnistymiseen tarkoittaa rasvojen varastoinnin (lipogeneesin) vähenemistä ja jo varastoitujen rasvojen mobilisointia (lipolyysiä). Rasvan mobilisoinnin seurauksena vapaiden rasvahappojen pitoisuus plasmassa lisääntyy. Vapaat rasvahapot hapettuvat joko täydellisesti tai epätäydellisesti ketoaineiksi tai ne varastoidaan triglyserideinä maksaan tai ne käytetään maitorasvan synteesissä. Veren vapaiden rasvahappojen pitoisuuden kohoaminen ja rasvan kertyminen kudoksiin inhiboivat insuliinin stimuloimaa glukoosin käyttöä soluissa ja voimistavat edelleen perifeeristen kudosten insuliiniresistenssiä (Pires ym. 2007, Bossaert ym. 2008, Salin ym. 2010). Lisäksi kroonisena vaikutuksena korkea veren vapaiden rasvahappojen pitoisuus voi heikentää myös glukoosin stimuloimaa insuliinin eritystä haimasta (Bossaert ym. 2008).

Rasvakudoksessa tapahtuvista geenitoiminnan muutoksista lopputiineyden ja alkulaktaation aikana on tehty useita tutkimuksia (Sumner & McNamara 2007, Lemor ym. 2009, Sadri ym. 2010, 2011, Sumner-Thomson ym. 2011). Geenitoiminnan muutokset tunnetaan varsin hyvin vaikka useimmat tutkimuksista keskittyvät muutamien valikoitujen geenien tutkimiseen. Yksittäisten geenien tutkimuksesta poikkeuksena Sumner-Thomson ym. (2011) ovat analysoineet lypsylehmien rasvakudoksen geenitoimintaa genomitasolla. He tutkivat 11 holstein-rotuisella eläimellä geenien toimintaa 30 päivää ennen ja 14 päivää jälkeen poikimisen. Mainitulla ajanjaksolla 433 geenin toiminta lisääntyi vähintään kaksinkertaiseksi ja 30 geenin toiminta väheni vähintään 75 % (Sumner-Thomson ym. 2011). Esimerkiksi rasvahappojen kuljetukseen liittyvien geenien (*FABP4* ja *FABP5*) ja lipolyysiä kontrolloivien geenien (*ADRB2* ja *LIPE*) toiminta voimistui ja lipogeneesiin vaikuttavien entsyymigeenien (*SREBP*, *TSHSP*, *LPL* ja *ACACA*) toiminta väheni (Sumner-Thomson ym. 2011).

Rasvakudos tunnetaan paitsi energiavarastona, myös endokriinisenä elimenä, jolla on immuunivasteeseen ja aineenvaihdunnan säätelyyn liittyviä tehtäviä (Lemor ym. 2009, Mukesh ym. 2010, Sadri ym. 2010). Merkittävä osa rasvakudoksen molekyyli-tason toiminnan ymmärryksestä perustuu ihmisellä ja laboratorioeläimillä tehtyihin tutkimuksiin. Tässä tutkimuksessa tutkittaviksi geeneiksi on valikoitu adiposytokiinien geenejä sekä insuliinin signalointiin ja lipogeneesiin vaikuttavia geenejä. Kaikkien geenien tiedetään vaikuttavan joko suoraan tai välillisesti insuliiniresistenssiin joko lypsykarjalla tai laboratorioeläimillä tehtyjen tutkimusten perusteella.

Adiposytokiinit, *ADIPOQ*, *IL-6*, *LEP*, *RBP4*, *RES* ja *TNF α* , erittyvät rasvakudoksesta ja ne säätelevät aineenvaihduntaa auto- para- tai endokriinisesti (Pittas ym. 2004, Yang ym. 2005). Osa adiposytokiineistä säätelee insuliiniresistenssiä ja glukoosin kuljetusta (Pittas ym. 2004, Lemor ym. 2009, Sadri ym. 2010, Yang ym. 2005). Insuliinireseptorin substraatti (*IRS*) on yksi keskeisistä insuliinin signalointiin vaikuttavista geeneistä (Sadri ym. 2010). Fosfoenolipyruvaattikarboksikinaasi 1 (*PCK1*) osallistuu lipogeneesiin ja sillä on vaikutusta triglyseridien kuljetukseen maksan ja rasvakudoksen välillä (Millward ym. 2010). Peroxisomiproliferaattoreilla aktivoituvaa reseptori gamma (*PPAR γ*) on transkriptiotekijä, joka säätelee useita insuliiniresistenssiin vaikuttavia geenejä (Millward ym. 2010).

Tässä tutkimuksessa edellä mainittujen geenien toimintaa analysoidaan arvioidaan ummessaoloajan energian saannin vaikutusta metaboliseen stressiin. Lisäksi tutkitaan poikimisen yhteydessä tapahtuvia muutoksia geenien toiminnassa.

Aineisto ja menetelmät

Ruokintakokeen eläimet ja koejärjestely on kuvattu Elon ym. (2012) tutkimuksessa. Geenitoiminnan tutkimista varten lehmillä kerättiin biopsioimalla näytteet ihonalaisesta rasvasta 8 päivää ennen poikimista, yksi päivä poikimisen jälkeen ja 9 päivää poikimisen jälkeen. Rasvanäyte jäädettiin näytteenottohetkellä välittömästi nestetyypen avulla ja säilytettiin sen jälkeen -80 °C:ssa pakastimessa.

Kudosnäytteistä eristettiin kokonais-RNA 18 ihonalaisesta rasvakudosnäytepalasta RNeasy Lipid Tissue Mini kit:n (Qiagen GmbH, Hilden Saksa) menetelmän mukaisesti. Leikatut näytepalat homo-

genisoitiin, kokonais-RNA:n määrä kvantitoitiin ja kokonais-RNA:n laatu arvioitiin Elon ym. (2012) tutkimuksessa esitetyillä tavoilla. Lähetti-RNA:sta syntetisoitiin cDNA:ta Roche Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit:n avulla (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Saksa). cDNA:n synteesi tehtiin kahdeksan 200 µl:n putken stripeillä. RNA-alkueseos valmistettiin kokonais-RNA:sta, oligo(dT)- ja heksameeri-alkukeista. Kvantitatiivinen PCR pipetoitiin 384 -levylle Eppendorfin epMotion 5075 -pipetointirobotilla (Eppendorf AG, Hampuri, Saksa). PCR:n reaktiivilavuus oli 10 µl ja käytetty alukekonsentraatio oli 2,5 µM. Kvantitatiiviset PCR:t tehtiin Roche Light Cycler 480 -laitteella Helsingin yliopiston DNA-sekvensoinnin ja genomiikan laboratoriossa.

Alukeparit suunniteltiin Primer3 -ohjelman (Rozen & Skaletsky 2000) avulla seuraaville geeneille: adiponektiini (*ADIPOQ*), eukaryoottien translaation aloitustekijä 3, alayksikkö K (*EIF3K*), interleukiini-6 (*IL-6*), insuliinireseptorisubstraatti (*IRS*), leptiini (*LEP*), fosfoenolipyruvaattikarboksiinaasi 1 (*PCK1*), peroksisomiproliferaattoreilla aktivoituva reseptori gamma (*PPARγ*), retinolia sitova proteiini 4 (*RBP4*), resistiini (*RES*), tuumorinekroositekijä-alfa (*TNFα*). Näistä sisäisenä kontrollina käytettiin *EIF3K*-geeniä.

Kvantitatiivisesta PCR:stä saatu aineisto analysoitiin käyttäen 2-ΔΔCT menetelmää (Livak ja Schmittgen 2001). Geenitoiminnan analysoinnissa käytettiin ei-parametrisiä testejä, sillä aineisto ei kaikkien geenien osalta ollut normaalijakautunut. Kruskal-Wallis testillä analysoitiin ryhmien välisiä eroja. Geenitoiminnan muutokset analysoitiin käyttäen R -tilastopakettien ohjelmia (<http://www.r-project.org/>). Lisäksi poikimisen jälkeen (1 ja 9 päivää) kandidaattigeenien toiminnassa tapahtuneita muutoksia analysoitiin merkkitestillä insuliiniresistenssin näkökulmasta. Tätä varten kirjallisuudesta kerättiin tietoja tutkittujen geenien toiminnan muutoksista ja näistä tiedoista muodostettiin hypoteesit kullekin geenille sen toiminnan muutoksen suunnasta. Merkkitestillä analysoitiin, monellako eläimellä geenitoiminta oli muuttunut hypoteesin mukaiseen suuntaan.

Tulokset ja niiden tarkastelu

Yhdistämällä koe- ja kontrollinäytteet yhdeksi aineistoksi lehmien rasvakudoksen geenitoiminnasta löytyi eroja ($P < 0,05$) kolmen näytteenottohetken välillä seuraavilla geeneillä: *ADIPOQ*, *LEP*, *RES*, *PPARγ* ja *RBP4* (Taulukko 1). Erityisesti leptiini-geenin toiminnan väheneminen poikimisen jälkeen näkyi suurimpana tilastollisena merkitsevyytenä ($P < 0,001$). Leptiini-geenin toiminta väheni poikimisen jälkeen, 1 ja 9 päivää poikimisen jälkeen se oli keskimäärin 46 % toiminnan määrästä 8 päivää ennen poikimista.

Taulukko 1. Geenitoiminnassa havaittavat erot kolmen näytteenottoajankohdan välillä. Testauksessa on käytetty Kruskal-Wallis järjestyssummatestiä.

Geeni	Riskitaso (P)	Testisuure (χ^2)
ADIPOQ	0,021*	7,681
IL6	0,876	0,265
LEP	0,001***	13,510
RES	0,026*	7,308
TNFα	0,678	0,777
IRS1	0,118	4,281
PPARγ	0,018*	8,000
RBP4	0,041*	6,397
PCK1	0,011	8,998

***($P < 0,001$), **($P < 0,01$), *($P < 0,05$) ja o($P < 0,10$)

Sadri ym. (2010) tutkivat osittain samojen geenien toiminnan muutoksia rasvakudoksessa 8 viikkoa ennen, 1 päivä ja 5 viikkoa jälkeen poikimisen. He eivät havainneet muutoksia *IRS*:n toiminnassa mutta *TNFα*:n toiminta lisääntyi tilastollisesti merkitsevästi ($P = 0,006$) poikimisen jälkeen (Sadri ym. 2010). Lemor ym. (2009) eivät löytäneet *ADIPOQ*:n ja *LEP*:n toiminnassa muutoksia verrattessaan viikkoa ennen ja 3 viikkoa jälkeen poikimisen otettuja näytteitä. Sen sijaan Sumner-Thomson ym. (2011) tutkimuksessa *LEP*:n toiminta väheni tilastollisesti merkitsevästi ($P = 0,004$) verrattaessa 30 päivää ennen ja 14 päivää poikimisen jälkeen otettuja näytteitä.

Koe- ja kontrolliryhmien välisiä geenitoiminnan eroja analysoitiin kolmena näytteenottoajankohdalla käyttäen Kruskal-Wallis järjestyssummatestiä. Ainoastaan ennen poikimista otetuissa näytteis-

sä oli ryhmien välisiä eroja, tilastollisesti merkitsevin ero oli insuliinireseptorisubstraattigeenin toiminnassa ($P=0,021$). Lisäksi suuntaa antavasti eroja oli adiponektiini- ja resistiinigeenien toiminnassa (Taulukko 2). Kaikkien kolmen geenin toiminta oli suurempaa rajoitetusti ruokittujen ryhmässä kuin vapaasti ruokittujen ryhmässä.

Taulukko 2. Kontrolli- ja koeryhmien välinen ero geenitoiminnassa eri näytteenottoajankohtina. Testauksessa on käytetty Kruskal-Wallisjärjestyssummatestiä. Ylempi luku on riskitaso (P) ja alempi luku on testisuure (χ^2).

Geeni	-8 päivää	+1 päivä	+9 päivää
ADIPOQ	0,059 o 3,574	0,294 1,103	0,749 0,102
IL6	0,248 1,335	0,834 0,044	0,142 2,159
LEP	0,294 1,103	0,142 2,162	0,749 0,102
RES	0,074 o 3,188	0,834 0,044	0,225 1,474
TNF α	0,916 0,011	0,834 0,044	0,406 0,690
IRS1	0,021 * 5,338	0,834 0,044	0,225 1,474
PPAR γ	0,916 0,011	0,401 0,706	0,338 0,918
RBP4	0,345 0,893	0,916 0,011	0,142 2,159
PCK1	0,338 0,918	0,834 0,044	0,655 0,200

***($P<0,001$), **($P<0,01$), *($P<0,05$) ja o($P<0,10$)

Merkkitestillä analysoitiin yksilöittäin poikimisen jälkeen (1 ja 9 päivää) geenitoiminnassa tapahtuneita muutoksia insuliiniresistenssin näkökulmasta. Tällöin geenitoiminnan perusteella kolmella vapaasti ruokitulla lehmällä on suuntaa antavasti ($P<0,10$) ja yhdellä rajoitetusti ruokitulla lehmällä on tilastollisesti merkitsevästi ($P<0,05$) insuliiniresistenssin piirteitä.

Johtopäätökset

Ruokinnan rajoittaminen vaikutti insuliinireseptorisubstraattigeenin toimintaan ($P=0,021$). Lisäksi rajoitetusti ja vapaasti ruokittujen ryhmien välillä oli suuntaa antavasti eroja adiponektiinigeenin ($P=0,059$) ja resistiinigeenin ($P=0,074$) toiminnassa. Selkein ajallinen geenitoiminnan ero havaittiin leptiinigeenissä ($P=0,001$), jonka toiminta väheni alle puoleen poikimisen jälkeen. Peroxisomiproliferaattoreilla aktivoitua reseptori gamma-, retinolia sitova proteiini 4- ja resistiinigeenien toiminnassa havaittiin ajallinen geenitoiminnan ero riskitasolla $P<0,05$.

Kirjallisuus

Bossaert, P., Leroy, J.L.M.R., De Vlieghe, S. & Opsomer, G. 2008. Interrelations between glucose-induced insulin response, metabolic indicators, and time of first ovulation in high-yielding dairy cows. *Journal of Dairy Science* 91: 3363–3371.

Elo, K., Gulzar, Z., Hoti, F., Jaakkola, S., Salin, S., Sillanpää, M., Taponen, J., Vanhatalo, A. & Kokkonen, T. 2012. Ummessaoloajan ruokintatason vaikutus lypsylehmien maksan geenitoimintaan. Teoksessa *Maataloustieteen päivät 10.-11.1.2012*. Suomen Maataloustieteellisen Seuran julkaisu. Saatavilla Internetissä: <http://www.smts.fi>.

Kokkonen, T., Taponen, J., Anttila, T., Syrjälä-Qvist, L., Delavaud, C., Chilliard, Y., Tuori, M. & Tesfa, A.T. 2005. Effect of body fatness and glucogenic supplement on lipid and protein mobilization and plasma leptin in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 88: 1127-1141.

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: 37-44.

Livak, K.J. & Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 25: 402-408.

Millward, C.A., DeSantis, D., Hsieh, C-H., Heaney, J.D., Pisano, S., Olswang, Y., Reshef, L., Beidelschies, M., Puchowicz, M. & Croniger, C.M. 2010. Phosphoenolpyruvate carboxykinase (Pck1) helps regulate the triglyceride/fatty acid cycle and development of insulin resistance in mice. *The Journal of Lipid Research* 51: 1452-1463.

Mukesh, M., Bionaz, M., Graugnard, D.E., Drackley, J.K. & Looor, J.J. 2009. Adipose tissue depots of Holstein cows are immune responsive: Inflammatory gene expression in vitro. *Domestic Animal Endocrinology* 38: 168-178.

Nielsen, A. Hameleers, A., Young, F.J., Larsen, T. & Friggens, N.C. 2010. Energy intake in late gestation affects blood metabolites in early lactation independently of milk production in dairy cows. *Animal* 4: 52-60.

Pires, A.A.J., Souza, A.H. & Grummer, R.R. 2007. Induction of hyperlipidemia by intravenous infusion of tallow emulsion causes insulin resistance in holstein cows. *Journal of Dairy Science* 90: 2735-2744.

Pittas, A.G., Nandini, J.A. & Greenberg, A.S. 2004. Adipocytokines and insulin resistance. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 89: 447-452.

Rozen, S. & Skaletsky, H.J. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz, S. & Misener, S. (toim.) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, ss. 365-386.

Sadri, H., Bruckmaier, R. M., Rahmani, H. R. Ghorbani, G. R. Morel, I. & van Dorland, H. A. 2010. Gene expression of tumour necrosis factor and insulin signalling-related factors in subcutaneous adipose tissue during the dry period and in early lactation in dairy cows. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 94: 194-202.

Sadri, H., Mielenz, M., Morel, I., Bruckmaier, R.M. & van Dorland, H.A. 2011. Plasma leptin and mRNA expression of lipogenesis and lipolysis-related factors in bovine adipose tissue around parturition. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 95: 790-797.

Salin, S., Kokkonen, T., Kuitunen, M., Taponen, J., Elo, K. & Vanhatalo, A. 2010. Juoksutusmahaan infusoidun rasvalisän vaikutus ummessaolevien lehmien insuliiniresistenssin kehittymiseen. Julkaisussa: *Maataloustieteen Päivät 12.-13.1.2010*. Suomen Maataloustieteellisen Seuran julkaisu no 26. Toim. Anneli Hoppo-nen. Viitattu 29.11.2011. Julkaistu 11.1.2010. Saatavilla Internetissä: <http://www.smts.fi>.

Sumner, J.M. & McNamara, J.P. 2007. Expression of lipolytic genes in the adipose tissue of pregnant and lactating holstein dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 90: 5237-5246.

Sumner-Thomson, J.M., Vierck, J.L. & McNamara, J.P. 2011. Differential expression of genes in adipose tissue of first-lactation dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 94: 361-369.

Yang, Q., Graham, T.E., Mody, N., Preitner, F., Peroni, O.D., Zabolotny, J.M., Kotani, K., Quadro, L. & Kahn, B.B. 2005. Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature* 436: 356-362.