

Aus dem Department für Nutztiere und öffentliches Gesundheitswesen
der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Institut für Tierernährung und funktionelle Pflanzenstoffe

Arbeitsgruppe Nutrigenomik

(Leitung Assistenz Professorin Dr. rer. agr. Susanne Kreuzer-Redmer)

**Eigenschaften und Bewertung von miRNA in Pansenpapillen zur
Analyse der lokalen Reaktion auf Futtermittelzusatzstoffe in einem
SARA Tiermodell**

Diplomarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von

Floriana Sajovitz

Wien, im Juli 2021

Betreuerin: Ass.-Prof.ⁱⁿ Dr.ⁱⁿ Susanne Kreuzer-Redmer

AG Nutrigenomik

Institut für Tierernährung und funktionelle Pflanzenstoffe

Department für Nutztiere und öffentliches Gesundheitswesen

Veterinärmedizinische Universität Wien

Gutachterin: Dr.ⁱⁿ med. vet. Priv.-Doz.ⁱⁿ Daniela Klein-Jöbstl, Dipl.ECBHM

Universitätsklinik für Wiederkäuer, Abteilung Bestandsbetreuung

Department für Nutztiere und öffentliches Gesundheitswesen

Veterinärmedizinische Universität Wien

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei dieser Diplomarbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Ass.-Prof. Dr. Susanne Kreuzer-Redmer für die Betreuung dieser Arbeit und ihre großartige Unterstützung dabei. Weiters möchte ich DVM Sara Ricci, sowie Catia Santos Pacifico MSc. PhD. danken, die mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen.

Abschließend bedanke ich mich bei meinen Eltern, die stets ein offenes Ohr für mich hatten und mich zu jeder Zeit motiviert und ermutigt haben, sowie bei meinen Freunden und meinem Partner für den emotionalen Rückhalt, die Geduld und die Korrekturvorschläge zu dieser Arbeit.

Vielen Dank euch allen!

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG.....	1
2. LITERATURÜBERSICHT	3
2.1 Der Pansen, seine Papillen und der Einfluss der Fütterung	3
2.1.1 Ruminaler pH-Wert.....	5
2.2 Subakute Pansenazidose (SARA)	7
2.2.1 Vorkommen	8
2.2.2 Pathogenese	10
2.2.3 Auswirkungen.....	11
2.2.4 Nachweismethoden und Diagnosestellung	13
2.3 MicroRNA	14
2.3.1 MicroRNAs als diagnostische und therapeutische Hilfe bei Erkrankungen.....	15
3. MATERIAL UND METHODE	17
3.1 Tiere und Aufstallung.....	18
3.2 Fütterung	18
3.2.1 Fütterung Woche 1 (Grundfutter).....	19
3.2.2 Adaptionstwoche	19
3.2.3 Fütterung Woche 2 (Konzentratfutter).....	19
3.2.4 Phyto gener Futtermittelzusatzstoff.....	19
3.3 Ruminale pH-Wert-Messung.....	20
3.4 Probengewinnung und Lagerung	20
3.5 RNA Isolation.....	22
3.5.1 Materialien.....	22
3.5.2 Vorbereitung.....	23
3.5.3 Homogenisierung der Proben	23
3.5.4 Isolation	24

3.5.5	Lagerung der Proben nach der Isolation	26
3.6	Quantitätskontrolle mit dem DeNovix Spectrophotometer	27
3.7	Qualitätskontrolle	28
3.8	Sequenzierung	28
3.9	Analyse und Auswertung der MicroRNA-Daten	28
4.	ERGEBNISSE	32
4.1	Quantitätskontrollen DeNovix Spectrophotometer	32
4.1.1	Ergebnisse der Woche 1	32
4.2	MicroRNA Auswertung	33
4.2.1	Vergleich zwischen Fütterungs- und Behandlungsgruppen.....	33
4.2.2	Vergleich der MicroRNA-Expression zwischen Grundfütterration und konzentratreicher Ration.....	36
4.2.3	Vergleich der MicroRNA-Expression zwischen Kontroll- und Behandlungsgruppe	38
4.2.3.1	MicroRNAs der Kontrollgruppe.....	39
4.2.3.2	MicroRNAs der Gruppe mit phytoenen Zusatzstoffen.....	42
4.2.4	Top fünf der am meist exprimierten MicroRNAs pro Kuh	46
4.2.5	Top zehn der am meist exprimierten MicroRNAs in allen Kühen.....	49
5.	DISKUSSION	51
5.1	RNA-Isolation und Quantitätsbestimmung	51
5.2	MicroRNA-Auswertung	51
5.2.1	Micro-RNA-Auswertung in Bezug auf die zwei unterschiedlichen Diäten	52
5.2.2	Micro-RNA-Auswertung unter Berücksichtigung des phytoenen Futtermittelzusatzstoffes	54
5.2.3	MicroRNA-Auswertung in Bezug auf die meist exprimierten MicroRNAs	56
6.	FAZIT	60

7. ZUSAMMENFASSUNG	62
8. SUMMARY	64
9. ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	66
10. TABELLENVERZEICHNIS.....	68
11. LITERATURVERZEICHNIS	70
12. ANHANGSVERZEICHNIS.....	86
13. ANHANG.....	87

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
cm	Centimeter
et al.	und andere
g	Gramm
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HCO ₃ ⁻	Bicarbonat
kg	Kilogramm
KG	Kontrollgruppe
mRNA	Messenger-RNA
miRNA	MicroRNA
ml	Mililiter
mm	Milimeter
NDF	Neutrale Detergenzfaser (Neutral-Detergent-Fiber)
NFC	Nicht-Faser-Kohlenhydrate (Non-Fiber-Carbohydrate)
ng	Nanogramm
PG	Gruppe mit phytoenen Zusatzstoffen
pH	potentia hydrogenii
SARA	Subakute Pansenazidose (subacute ruminal acidosis)
SCFA	Kurzkettige Fettsäuren (short chain fatty acids)
Tab.	Tabelle

TMR

Totalmischung

1. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG

Eine hohe Leistung in Milchviehherden spielt für Landwirte weltweit eine zentrale Rolle. Um diese zu erreichen wird sehr oft auf konzentratreiche, energiebringende Rationen zurückgegriffen (Abdela 2016, Krause und Combs 2003, Krause und Oetzel 2006, Mao et al. 2013). Dadurch steigt zwar vorübergehend der Ertrag der Herde, aber auch das Risiko, an einer subakuten Pansenazidose (SARA) zu erkranken (Abdela 2016, Krause und Oetzel 2006). SARA ist eine Herdenerkrankung, gekennzeichnet durch den (übermäßigen) Konsum einer energiereichen faserarmen Diät, die zu einer Akkumulation freier Fettsäuren führt. Durch unzureichende Pufferung kommt es zu einer intermittierenden Absenkung des pH-Wertes unter den physiologischen Bereich (Krause und Oetzel 2006, Nagaraja und Titgemeyer 2007, Oetzel 2000, Plaizier et al. 2008, Wetzels et al. 2017, Zebeli und Metzler-Zebeli 2012). Sie zählt zu den wichtigsten Erkrankungen in hochleistenden Milchviehherden und ist maßgeblich für das Wohlergehen und die Rentabilität von Milchviehherden (Abdela 2016, Krause und Oetzel 2006). Da sich SARA nicht nur auf die Tiergesundheit negativ auswirkt, sondern auch hohe wirtschaftliche Verluste nach sich zieht, ist eine gute Überwachung der Herde und ein gutes Herdenmanagement unerlässlich (Abdela 2016, Enemark 2008, Krause und Oetzel 2006). Klinische Anzeichen sind häufig nur schwach ausgeprägt, gar nicht vorhanden oder geben sich erst Wochen bis Monate später zu erkennen (Enemark et al. 2004, Enemark 2008, Oetzel 2000). Neben einer reduzierten Futteraufnahme, Ruminitis, reduzierter Ballaststoffverdauung, Durchfall, Milchfettdepression, Leberabszesse oder Laminitis (Neubauer et al. 2018, Nordlund et al. 1995, Oetzel 2000, Plaizier et al. 2008) kommt es unter anderem zu einer Verschiebung der Pansenmikroben und einer Akkumulation bakterieller Endotoxine, welche die Gesundheit und Produktivität der Tiere beeinträchtigt (Zebeli und Metzler-Zebeli 2012).

Studien konnten zeigen, dass phyto gene Futtermittelzusatzstoffe unter anderem antimikrobielle Effekte haben und sich positiv auf die mikrobielle Verdauung und Pansengesundheit auswirken können (Calsamiglia et al. 2007, Cobellis et al. 2016, Neubauer et al. 2018). In Verbindung mit einer konzentratreichen Fütterung fand man heraus, dass die Wiederkau- und Kauaktivität bei der Zufütterung phyto gener Produkte im Vergleich zur Kontrollgruppe angestiegen ist (Kröger et al. 2017). Dadurch wird die Speichelproduktion gefördert, die rationsbedingte Übersäuerung gepuffert und der pH-Wert steigt (Kaske 2015, Tafaj et al. 2006). Phyto gene Produkte können also in der Lage sein, gegen die negativen Auswirkungen einer hochkonzentrierten energiereichen Ration zu wirken (Kröger et al. 2017).

Daher soll nun anhand von Pansenpapillenproben untersucht werden, ob phyto gene Futtermittelzusatzstoffe im Zusammenhang mit einer Diät, welche das Risiko an SARA zu erkranken deutlich erhöht, das Expressionsmuster von MicroRNAs verändern. MicroRNAs sind kurze, nicht kodierende RNAs, welche bei der Genexpression als posttranskriptionelle regulatorische Elemente fungieren und verschiedene zelluläre Aktivitäten regulieren (Saliminejad et al. 2019). MicroRNAs spielen eine bedeutende Rolle bei der Modulation von physiologischen und pathologischen Prozessen (Bhaskaran und Mohan 2014). So konnten bereits zahlreiche Krankheiten damit assoziiert werden (Bhaskaran und Mohan 2014, Saliminejad et al. 2019). Außerdem spielen sie eine Rolle bei der Gewebeentwicklung und -differenzierung, können apoptotische Prozesse regulieren und werden daher auch mit verschiedenen neoplastischen Prozessen in Verbindung gebracht (Bhaskaran und Mohan 2014). In Abhängigkeit von der Funktion der Zielproteine können miRNAs jedoch nicht nur als Tumorsuppressoren sondern auch als Onkogene fungieren (Bhaskaran und Mohan 2014). Sie sind zum einen in der Lage die Manifestation und Pathogenese von Infektionskrankheiten zu beeinflussen und werden zum anderen aber auch mit nicht-infektiösen Krankheiten, wie Autoimmunerkrankungen, Stoffwechselstörungen und genetischen Erkrankungen in Verbindung gebracht oder werden als Biomarker für bestimmte Krankheiten verwendet (Bhaskaran und Mohan 2014, Mohr und Mott 2015, Zendjabil et al. 2017).

Das Ziel dieser Arbeit ist entsprechend,

- i.) ob miRNAs in Pansengewebe nachzuweisen sind, und
- ii.) zu identifizieren ob phyto gene Futtermittelzusatzstoffe in der Ration und/oder
- iii.) eine konzentratreiche, faserarme Fütterung, die bei den Versuchstieren das Risiko eines SARA Status wesentlich erhöht, das Expressionsprofil der miRNAs verändern.

Dazu werden nicht nur die Resultate zweier verschiedener Diäten (Grundfutter vs. Konzentratfutter) untersucht, sondern auch anhand einer Kontroll- und Verumgruppe das Wirken phyto gener Futtermittelzusatzstoffe innerhalb beider Diäten.

2. LITERATURÜBERSICHT

2.1 Der Pansen, seine Papillen und der Einfluss der Fütterung

Die Innenseite des Pansens ist mit einem mehrschichtigem Plattenepithel ausgekleidet, welches als Schutz dient und zuständig für Absorption, Transportmechanismen und Stoffwechselaktivitäten ist (Gálfi et al. 1991). Luminal bildet die Schleimhaut Pansenzotten (*Papillae ruminis*) aus (Abbildung 1), welche bis zu 10 mm hoch werden. Durch sie erhöht sich die resorbierende Schleimhautoberfläche (Vollmerhaus und Roos 2004). Ihre Größe, sowie auch ihre Anzahl unterliegt fütterungsbedingten Einflüssen (Salomon 2015). Die Schleimhaut passt sich also der Ernährung sowie der Art und dem Zeitpunkt der Fütterung an. Somit haben bestimmte Futterbestandteile und deren Fermentationsprodukte Einfluss auf die Zellteilung (Gálfi et al. 1991). Energiereiches, rohfaserarmes Futter führt innerhalb von ca. vier bis fünf Wochen zu Wachstum sowie Proliferation und im Gegensatz dazu führt energiearmes, rohfaserreiches Futter zu einer Verkürzung der Pansenzotten (Liebich 2004, Salomon 2015). Dies ist auf die Konzentration der kurzkettigen Fettsäuren zurückzuführen (Salomon 2015). Kurzkettige Fettsäuren (Essigsäure, Propionsäure, Buttersäure) werden durch mikrobielle Fermentation pflanzlicher Zellwandbestandteile gebildet. Sie werden durch die Pansenschleimhaut bzw. Pansenzotten absorbiert und dienen dem Wiederkäuer in weiterer Folge als Hauptenergiequelle (Breves et al. 2015, König et al. 2019, Salomon 2015). Steigt die Konzentration an kurzkettigen Fettsäuren, so kommt es zu einer Zottenproliferation. Dadurch können wiederum vermehrt Fettsäuren resorbiert werden, was in weiterer Folge bis zu einem gewissen Grad einen zu starken Abfall des Pansen-pH-Wertes verhindert (Salomon 2015). Um eine große Resorptionsfläche bzw. ein hohes Maß an Proliferation schrittweise zu erreichen braucht das Pansenepithel vier bis fünf Wochen zur Adaption (Dirksen 2002).



Abbildung 1: Rasterelektronenmikroskopische Ansicht auf Pansenzotten eines Rindes. Vergr. 10fach (Liebich 2004)

Eine Voraussetzung für die Wiederkäuerverdauung ist eine im Pansensaft enthaltende intakte mikrobielle Population, bestehend aus Protozoen (Infusorien), Bakterien und Pilze. Sie siedeln sich unmittelbar bis einige Tage nach der Geburt im Vormagensystem an und sind essentiell für die mikrobielle Verdauung, die Synthese von mikrobiellem Protein und Aminosäuren sowie die Synthese wasserlöslicher Vitamine. Protozoen sind nicht nur in der Lage Kohlenhydrate, Proteine und Fette zu spalten, sondern besitzen zudem auch die Funktion leicht verdauliche Kohlenhydrate zu speichern. Wird ein hoher Gehalt dieser Kohlenhydrate gefüttert, führt dies zu einem Anstieg kurzkettiger Fettsäuren (Propionat und Butyrat) und zum anderen resultiert durch die fütterungsbedingte verringerte Wiederkauaktivität eine verminderte Produktion von Speichel, was zu einem drastischen Abfall des pH-Wertes im Pansen führt. Durch die zuvor erwähnte Möglichkeit der Kohlenhydratspeicherung verhindern Protozoen so, dass diese zu rasch abgebaut werden und wirken somit einer Pansenazidose entgegenwirken (Breves et al. 2015). Eine zu schnelle Umstellung auf eine andere Ration oder ein zu hoher Anteil an Kraftfutter wirkt sich negativ auf die Population aus. Verschiedene Futtermittelkomponenten oder eine starke Absenkung des pH-Wertes können zu einer Defaunierung, einer Abtötung der Protozoen, führen. Die Qualität und Quantität der im Pansensaft enthaltenden Bakterien werden unter anderem durch anaerobe Bedingungen und durch Futter bestimmt. Die Umstellung von rohfaserreicherem Futter auf stärkereicherem Futter kann zur Reduktion von cellulolytischen Bakterien führen. Gleichzeitig nehmen amylolytische Bakterien, Streptokokken, Laktobazillen und laktatverwertende Bakterien zu. Sie spalten Kohlenhydrate sowie Proteine und leisten den größten Teil an der mikrobiellen Stoffwechselaktivität (Breves et al. 2015). Die Hauptaufgabe des Pansens besteht also darin, pflanzliches Futter mechanisch zu bearbeiten und mithilfe von Mikroorganismen aufzuspalten (Salomon 2015).

Die Wiederkauaktivität, welche durch vermehrte Gabe von Strukturfutter erhöht wird, beeinflusst durch die wiederholte Zerkleinerung großer Futterpartikel indirekt die mikrobielle Fermentation, da durch die Oberflächenvergrößerung eine intensive Besiedelung von Mikroben und der Abbau von Zellinhaltsstoffen gegeben ist. Die hohe Bicarbonatkonzentration im Speichel, dessen Produktion durch die Wiederkauaktivität angeregt wird, beeinflusst so maßgeblich den pH-Wert im Reticulorumen (Kaske 2015). Die Hälfte des Bicarbonats, welches im Pansen ist, gelangt durch Speichel dorthin. Die andere Hälfte gelangt durch den Austausch ionisierter Säuren gegen Bicarbonat in den Pansen (Owens et al. 1998).

Wird strukturreiches Raufutter gefüttert, nimmt das Wiederkauen acht bis elf Stunden am Tag ein. Es kommt vor allem zu einer cellulolytischen Aktivität der Mikroorganismen, einer

langsameren Fermentation und einer niedrigen Passagerate. Dadurch ergibt sich ein schwach saurer Pansen pH-Wert von 6,5-7,0 (Kaske 2015). Wird jedoch kraffutterreiches Futter oder gemahlene Raufutter mit geringem Anteil an Struktur verfüttert so sinkt die Wiederkauaktivität und damit auch die Speichelproduktion. Hier kommt es vor allem zu einer amylolytischen und saccharolytischen Aktivität der Mikroorganismen, zu einer schnellen Fermentation und einer hohen Passagerate (Dirksen 2002, Kaske 2015). In weiterer Folge sinkt der pH-Wert des Pansens (Kaske 2015). Zu tiefe Werte führen zu einer Inaktivierung cellulolytischer Bakterien und beeinträchtigen dadurch den Abbau von Pflanzenfasern (Zebeli und Metzler-Zebeli 2012).

2.1.1 Ruminaler pH-Wert

Der physiologische pH-Wert des Pansens liegt, je nach Autor, bei 6,2 – 6,8 (Hofmann et al. 2005), 6,5 – 7,2 (Baumgartner 2014), 5,5 – 7,0 (Dirksen 2002, Krause und Oetzel 2006).

Abhängig von der Rationszusammensetzung und der Menge der darin enthaltenden leicht fermentierbaren Kohlenhydraten unterscheiden sich die Werte im Laufe des Tages erheblich (Dirksen 2002, Krause und Oetzel 2006). Schwankungen des pH-Wertes im Bereich von 0,5 – 1 innerhalb eines Tages können durchaus vorkommen und werden als üblich angesehen (Dado und Allen 1993, Krause und Oetzel 2006). Unterschiede ergeben sich auch in Bezug auf den Zeitpunkt der letzten Fütterung. Da es kurz nach der Futteraufnahme zu einer vermehrten Produktion an Fettsäuren kommt ist der pH-Wert zwei bis drei Stunden nach der Futteraufnahme am tiefsten (Baumgartner 2014). Man darf also nicht außer Acht lassen, dass der Zeitpunkt der Messung einen maßgeblichen Einfluss auf den pH-Wert hat (Plaizier et al. 2008) und der Wert im Laufe des Tages Schwankungen aufweist (Zebeli et al. 2008). Bei der Beurteilung ist es von entscheidender Bedeutung nicht nur den mittleren pH-Wert zu berücksichtigen, sondern auch den pH-Wert nach einer Fütterung, sowie die Zeitdauer, in welcher der Wert unter dem physiologischen Bereich gelegen ist (Nagaraja und Titgemeyer 2007).

Unter normalen ruminale Bedingungen besteht ein Gleichgewicht zwischen der Produktion von freien Fettsäuren und deren Neutralisation (Abbildung 2). So sind Rinder bis zu einem gewissen Grad in der Lage den Pansen-pH-Wert innerhalb des physiologischen Bereichs zu halten (Krause und Oetzel 2006). Hierbei korrelieren die Regulierung der Futteraufnahme, die Konzentration an kurzkettigen Fettsäuren, die Menge an Speichel, die produziert wird, die Sekretion von Bicarbonat aus der Pansenwand und die Elimination der kurzkettigen Fettsäuren (durch Resorption und Abfluss) (Breves et al. 2015, Krause und Oetzel 2006).

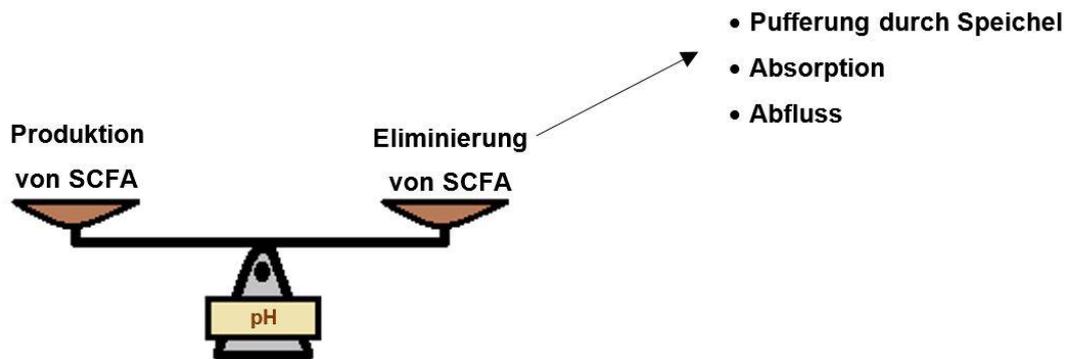


Abbildung 2: Veranschaulichung des Gleichgewichtes, das zu einem stabilen Pansen-pH-Wert führt (Abbildung adaptiert nach Neubauer, Kröger et al. 2018)

Eine besondere Bedeutung in der Regulation des ruminalen pH-Wertes werden vor allem dem Speichel, welcher hohe Mengen an Bicarbonat und Phosphat enthält, und dem Austausch von kurzkettigen Fettsäuren (SCFA) mit HCO_3^- über die Pansenwand zugeschrieben (Aschenbach et al. 2011, Breves 2015, Breves et al. 2015). Die Resorption der SCFA steigt mit sinkendem Pansen-pH-Wert und mit vergrößerter Resorptionsfläche durch die induzierte Zottenproliferation, welche wiederum durch die hohe Konzentration an kurzkettigen Fettsäuren bedingt ist (Dirksen 2002, Salomon 2015). Das Verhältnis zwischen der Konzentration an kurzkettigen Fettsäuren und der Pufferkapazität kann durch eine übermäßige Aufnahme leicht verdaulicher Kohlenhydrate (stärkereiche Ration) und der daraus folgenden vermehrten Bildung an kurzkettigen Fettsäuren gestört werden. Die Folge ist eine Abnahme der Wiederkauaktivität durch den Strukturmangel im Futter und die Abnahme der Speichelbildung (Breves et al. 2015). Der Mechanismus schlägt fehl: Die Übersäuerung kann nicht mehr ausreichend kompensiert werden und der Pansen-pH-Wert sinkt massiv (Krause und Oetzel 2006).

Der pH-Wert ist somit ein wichtiger Faktor für einen funktionierenden und gesunden Pansen. Er übt starken Einfluss auf die Pansenmikroben (Abbildung 3), deren Fermentationsprodukte, und die Pansenphysiologie, vor allem in Hinblick auf die Motilität und Absorption, aus (Nagaraja und Titgemeyer 2007).

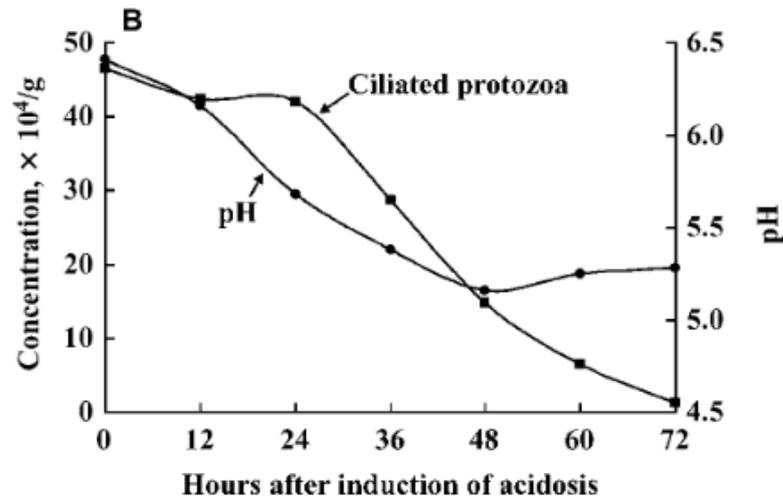


Abbildung 3: Ruminale cilierte Protozoenpopulation (■) und Pansen-pH (●) bei Rindern mit experimentell induzierter subakuter Azidose (Nagaraja und Titgemeyer 2007) (B; Daten von Goad et al., 1998)

2.2 Subakute Pansenazidose (SARA)

Die Subakute Pansenazidose (SARA) ist definiert als eine subklinisch verlaufende, über längere Zeit bestehende bzw. periodisch vorkommende Erkrankung (Dirksen 2002, Krause und Oetzel 2006), die durch einen Pansen-pH-Schwellenwert von $< 5,5$ (Dirksen 2002, Garrett et al. 1999, Kleen et al. 2003, Krause und Oetzel 2006) bzw. $< 5,8$ (Beauchemin et al. 2003, Maekawa et al. 2002, Morgante et al. 2009) charakterisiert wird. Kleen und Kollegen beschreiben SARA als intermittierenden Abfall des Pansen-pH-Wertes nach Aufnahme einer strukturarmen und konzentratreichen Ration, zurückzuführen auf die unzureichende Adaptation der Pansenflora und -schleimhaut (Kleen et al. 2003).

Im Gegensatz zur einer ausgewogenen Rationszusammensetzung erhöhen sich bei der subakuten Pansenazidose die Anteile der Propionsäure und Buttersäure, sowie stoßweise auch die Milchsäurekonzentration (Dirksen 2002). Der Pansen-pH-Wert verschiebt sich aufgrund der erhöhten Produktion bzw. Ansammlung von flüchtigen Fettsäuren in einen abnorm sauren Bereich (Krause und Oetzel 2006, Maulfair et al. 2013). Laut Kleen et al. manifestiert sich die subakute Pansenazidose in einer Abnahme des pH-Wertes auf 5,5 und niedriger. Diese Tiere werden als SARA-positiv bezeichnet. SARA-negativ sind demnach Tiere, welche einen ruminalen pH-Wert von über 5,8 aufweisen (Kleen et al. 2003). Einige Autoren berücksichtigen auch die Zeitspanne, in der der pH-Wert unter einem gewissen

Schwellenwert liegt (Tab. 1). So definieren beispielsweise Gozho und Kollegen SARA mit einem Pansen-pH von $< 5,6$, der für über drei Stunden am Tag anhält (Gozho et al. 2005, Plaizier et al. 2008). Für Zebeli et al. gilt ein pH-Wert von $< 5,8$ für über 5,24 Stunden am Tag zu vermeiden (Zebeli et al. 2008). Auch Humer et al. kommen zu dem Entschluss, dass die Berücksichtigung der Dauer unter einem bestimmten pH-Wert wichtiger ist, als einzelne Messungen niedriger pH-Werte (Humer et al. 2018).

Tabelle 1: Verschiedene Definitionen von SARA

Autor	pH
Dirksen 2002 Garrett et al. 1999 Kleen et al. 2003 Krause und Oetzel 2006	$< 5,5$
Beauchemin et al. 2003 Maekawa et al. 2002 Morgante et al. 2009	$< 5,8$
Gozho et al. 2005	$< 5,6$ für über drei Stunden/Tag
Zebeli et al. 2008	$< 5,8$ für über 5,24 Stunden/Tag

2.2.1 Vorkommen

Die subakute Pansenazidose ist eine häufige und ökonomisch wichtige Erkrankung, die vor allem in ertragreichen Milchviehherden und Feedlot-Herden auftritt. Das ist darauf zurückzuführen, dass hier oft Rationen verfüttert werden, welche einen hohen Anteil an leichtverdaulichen Kohlenhydraten beinhalten (Dirksen 2002, Enemark 2008, Garrett et al. 1999, Maulfair et al. 2013, Morgante et al. 2009, Oetzel 2000). Sie ist wohl eine der wichtigsten metabolischen Erkrankungen in intensiv geführten Milchviehbetrieben (Morgante et al. 2007) und im Gegensatz zur akuten Pansenazidose eine Herdenerkrankung (Enemark et al. 2004).

Oetzel vermutete 2000 eine ungefähr gleich hohe Prävalenz bei Milchvieh und Rindern mit Feedlots (Oetzel 2000). Milchvieh erkrankt vor allem um die Zeit der Abkalbung bis vier Monate *post partum* an SARA (Oetzel 2000). Auch Nordlund und Kollegen erwähnen, dass besonders für peripartale Rinder ein erhöhtes Risiko besteht (Nordlund et al. 1995). Dies ist damit

begründet, dass zum einen eine gewisse Zeit erforderlich ist für die Verschiebung der Pansenmikroflora (Änderungen in der Bakterienkonzentration und Änderungen der vorherrschenden Art) und Proliferation der Pansenpapillen und zum anderen, dass die Tiere im Zeitraum um die Geburt eine geringere Trockenmasseaufnahme aufweisen (Nordlund et al. 1995). Außerhalb dieser Zeiten wird das Risiko als gering eingeschätzt (Oetzel 2000). So erstreckt sich die Azidose selten auch über das zweite Drittel der Laktation hinaus, da sich hier der Pansen meist schon an den Fasermangel in der Ration angepasst hat (Nordlund et al. 1995). Im Gegensatz zum Milchrind ist jedoch bei Feedlot-Rindern ein dauerhaft anhaltender ruminaler pH-Wert von 5,0 – 5,5 nicht ungewöhnlich (Oetzel 2000). Enemark und Kollegen vermuten, dass primipare Rinder ein höheres Risiko haben an SARA zu erkranken als Multipare (Enemark et al. 2004). Für die Erkennung einer SARA-positiven Herde schlugen Garrett et al. ein Schema vor, bei dem der Pansensaft durch Rumenozentese gewonnen und untersucht werden soll. Weisen von zwölf Rindern drei oder mehr einen ruminalen pH-Wert von unter 5,5 auf, ist SARA in der Herde präsent (Garrett et al. 1999). In einer italienischen Studie (Morgante et al. 2007) wurde die Prävalenz von SARA anhand von zehn kommerziell geführten Milchviehherden untersucht. Die beprobten Kühe waren alle zwischen 5 und 60 Tage in Laktation. In drei der zehn Betriebe wurde SARA diagnostiziert. Hierbei hatten über 33 % der untersuchten Tiere der Herden einen pH von $< 5,5$. Als kritisch wurden fünf Herden eingestuft, bei denen über 33 % einen pH von $< 5,8$ aufwiesen. Eine andere Studie (Kleen et al. 2009) befasste sich mit der Beprobung von 197 Kühen aus 18 Herden in den Niederlanden. Daraus ergab sich eine Prävalenz von 13,7 % ($\text{pH} \leq 5,5$). In 16,8 % wurde ein ruminaler pH-Wert von 5,6 oder 5,7 vorgefunden. Im Iran konnten Tajik und Kollegen in zehn Herden eine Prävalenz von 27,6 % feststellen (Tajik et al. 2009). In Griechenland (Kitkas et al. 2013) wurden von zwölf untersuchten Herden vier als SARA-positiv klassifiziert. Dabei hatten 15,69 % einen pH-Wert von $\leq 5,5$ (Kitkas et al. 2013). In Deutschland wurde durch Kleen und Kollegen eine Prävalenzstudie in 26 Milchviehbetrieben durchgeführt (Kleen et al. 2013). 20 % der 315 beprobten Kühe wiesen einen pH-Wert von $\leq 5,5$ auf. Aus den 26 Betrieben wurden elf Betriebe gefunden, in denen sich mindestens drei Tiere befanden, die einen $\text{pH} \leq 5,5$ aufwiesen. Die Studie wies auch darauf hin, dass größere Herden eher zu SARA tendieren als kleinere Herden (Kleen et al. 2013). Zusammenfassend ist SARA ein länderübergreifendes Problem in Milchviehherden.

2.2.2 Pathogenese

Krause und Oetzel nennen drei Hauptursachen für die Entstehung einer subakuten Pansenazidose (Krause und Oetzel 2006). Dazu zählen eine ausbleibende bzw. mangelhafte Pufferung durch Speichel aufgrund einer unzureichenden Zufuhr von Strukturfutter, eine übermäßige Aufnahme von leichtverdaulichen Kohlenhydraten und eine unzureichende Anpassung des Pansens an eine konzentratreiche Ration (Krause und Oetzel 2006). Die Folge ist eine intensive Fettsäuregärung (Dirksen 2002). Dadurch verschieben sich die Fettsäureanteile zugunsten der Propion- und Buttersäure (Abbildung 4). Je nach vorherrschenden Bedingungen ist auch ein Anstieg der Milchsäurekonzentration möglich (Dirksen 2002). Ist eine ausreichende Adaptation des Pansens ausgeblieben, kann die hohe Konzentration an freien Fettsäuren nicht adäquat eliminiert werden (Dirksen 2002, Kleen et al. 2003). Da die Elimination freier Fettsäuren unter anderem durch Absorption stattfindet, spielt das Pansenepithel eine zentrale Rolle. Gerade in der Übergangsphase von der Trockenstehzeit zur frühen Laktation sind die Papillen wegen der zuvor gefütterten meist konzentratarmen Ration nicht ausreichend lang und die resorbierende Oberfläche ist zu klein, um gegen große Mengen an kurzkettigen Fettsäuren (SCFA) anzukommen. Die Fettsäurekonzentration übersteigt die Absorptionsrate. Dies führt zu einer Akkumulation und in weiterer Folge zu einer Abnahme des ruminalen pH-Wertes (Nordlund et al. 1995). Typisch ist die Erreichung des pH-Tiefpunktes zwei bis drei Stunden nach Aufnahme konzentratreichen Futters (Baumgartner 2014). Danach steigt er wieder in den physiologischen Wert (Dirksen 2002, Kleen et al. 2003). Vor allem Kühe in der frühen Laktationsphase kurz *post partum* sind gefährdet (Kleen et al. 2003).

Aber auch die Hochlaktation kann das Risiko an SARA zu erkranken erhöhen (Kleen et al. 2003). Dies ist jedoch vor allem auf Managementfehler, wie eine falsch vorbereitete bzw. zu lange gemischte Totalmischration (TMR), Fehler bei der automatisierten Fütterung oder auf Fehler bei der Komponentenfütterung zurückzuführen (Kleen et al. 2003, Krause und Oetzel 2006, Nordlund et al. 1995). Das Problem liegt hierbei bei einer zu geringen Aufnahme an Strukturfutter und/oder einer zu hohen Aufnahme an Konzentratfutter (Kleen und Cannizzo 2012). Die ausbleibende Anpassung des Epithels ist hier von geringer Bedeutung, da der Pansen in der Mitte der Laktation normalerweise schon ausreichend Zeit hatte sich an die Ration zu gewöhnen (Kleen et al. 2003, Nordlund et al. 1995).

Im Gegensatz zur akuten Pansenazidose ist bei SARA die Senkung des pH-Wertes auf die alleinige Ansammlung von SCFA und nicht auf eine Akkumulation von Milchsäure

zurückzuführen (Goad et al. 1998, Oetzel 2000). Dies kommt daher, dass obwohl Laktat produziert wird, es bis zu einem gewissen pH-Wert von laktatverwertenden Bakterien umgebaut werden kann (Kaufmann und Rohr 1966). Die Akkumulation von Laktat findet erst ab einem pH-Wert von $\leq 5,0$ statt (Oetzel 2007).

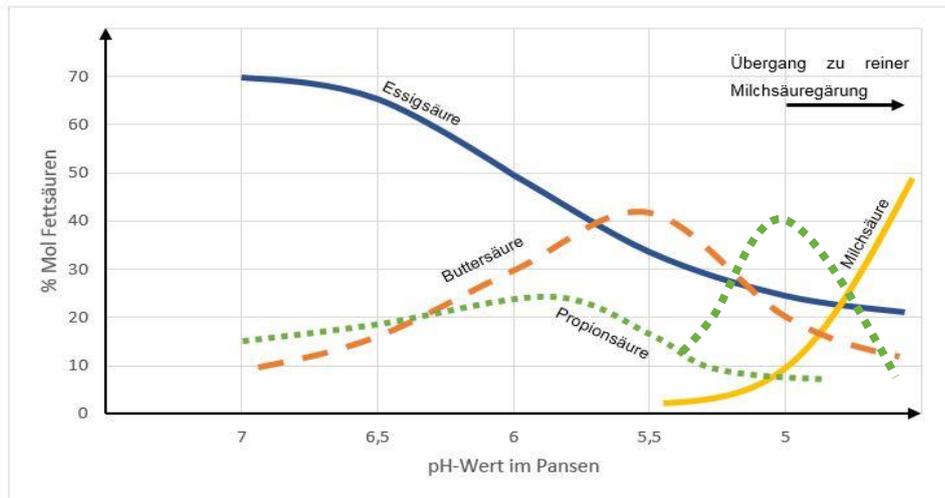


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Zusammenhanges zwischen dem Pansen-pH und dem Kohlenhydratabbau (% Mol Fettsäuren), nach Kaufmann und Rohr 1966

2.2.3 Auswirkungen

Die Diagnose der subakuten Pansenazidose ist arbeitsaufwändig und oft auch sehr schwierig. Die klinischen Anzeichen bzw. Auswirkungen einer SARA sind sehr breit gefächert, eher subtil und zeigen sich oft erst Wochen bis Monate nach dem Eintritt der Erkrankung. Trotz der recht ähnlichen Ätiologie im Vergleich zur akuten Pansenazidose weist die subakute Form deutliche Unterschiede in der Klinik auf (Enemark 2008, Oetzel 2000).

Da SARA eine Herdenerkrankung ist, sind klinische Anzeichen weniger auf das individuelle Tier sondern eher auf die gesamte Herde zu beziehen (Enemark 2008). Eine der am häufigsten erwähnten Symptome sind eine reduzierte Futtermittelaufnahme, Ruminitis und Laminitis (Enemark 2008, Nordlund et al. 1995, Oetzel 2000). SARA-krankte Rinder setzen häufig dünnbreiigen Kot ab oder leiden an intermittierenden Durchfall (Dirksen 2002, Kleen et al. 2003). Auffallend ist die vermehrte Präsenz unverdauter Faserpartikel und Getreide, welche durch die hohe Passagerate und eine inadäquate Verdauung erklärt werden können (Enemark 2008). Der Kot erscheint schaumig, heller als normal und hat eine gelbliche Farbe (Kleen et al. 2003).

Typisch für Herden mit einer hohen SARA-Prävalenz ist, dass ältere Kühe durchschnittlich eine geringere Milchproduktion aufweisen als Kühe der ersten Laktation (Oetzel 2000). Weitere klinische Symptome einer SARA-positiven Herde sind Milchfettdepression, sowie auch ein schlechter Body Condition Score, der durch eine verringerte Trockenmasseaufnahme, beeinträchtigte Pansenfunktion oder auch aufgrund von Leberabszessen hervorgerufen wird (Nordlund et al. 1995, Oetzel 2000). Da die oft mit SARA in Verbindung gebrachte reduzierte Futteraufnahme schnell übersehen werden kann, kann die Wiederkauaktivität, welche bei SARA deutlich reduziert ist, als Maßstab herangezogen werden (Enemark 2008). Hier gilt der Grundsatz, dass eine Herde als pansengesund anzusehen ist, wenn mindestens 40 % der Kühe einer Herde zu jeder Zeit mit Wiederkauen beschäftigt sind (DeVries et al. 2009, Maekawa et al. 2002).

Die erhöhte Säurekonzentration im Pansen führt häufig zu einer Entzündung der Schleimhaut, Parakeratose, Erosionen und schlussendlich zu Ulzerationen (Garry und McConnel 2015, Krause und Oetzel 2006). Bakterien, welche die entzündete Pansenwand besiedeln, können durch die Schädigung des Epithels in den Pfortaderkreislauf gelangen. Dies kann Leberabszesse und lokale Peritonitis nach sich ziehen. Diese bekannte Komplikation wird auch Ruminitis-Leberabszess-Komplex genannt (Enemark 2008, Nordlund et al. 1995, Oetzel 2000, Scanlan und Hathcock 1983). Breitet sich die Infektion weiter aus, können auch Lunge, Herzklappen, Nieren und Gelenke mit davon betroffen werden (Krause und Oetzel 2006, Oetzel 2000). In solchen Fällen bereitet eine Diagnosestellung *ante mortem* oft Schwierigkeiten (Krause und Oetzel 2006). So ist es nicht selten, dass erst *post mortem* neben Leberabszessen auch diffuse Lungenabszesse oder Abszesse in anderen Körperregionen gefunden werden, aus denen dann meist *Trueperella pyogenes* und/oder *Fusobacterium necrophorum* isoliert werden können (Nordlund et al. 1995). In diesen Zusammenhang wird auch das Vena-Cava-Syndrom gebracht, bei dem ein Leberabszess in unmittelbarer Nähe der *Vena cava caudalis* liegt und in diese einbricht (Braun 2002). Ein dadurch entstandener Thrombus gelangt aufgrund des Blutflusses in die Lunge und kann dort zu einer septischen Embolie führen, welche in weiterer Folge zu einer Ruptur von Lungengefäßen führt. Durch die Rupturen entstehen Lungenblutungen und nachfolgend Epistaxis. In den meisten Fällen endet dies mit dem Tod der Tiere (Braun 2002, Enemark 2008, Nordlund et al. 1995, Oetzel 2000). SARA birgt außerdem ein erhöhtes Risiko für die Entstehung einer aseptischen Entzündung der Klauenlederhaut (Laminitis) (Bergsten 2003). Der Grund für die Laminitis ist eine gestörte Hämodynamik terminaler Gefäße (Boosman et al. 1989, Nocek 1997). Durch den niedrigen pH-Wert im Pansen kommt es zu einer Zerstörung von Gewebe und bestimmter Bakterien.

Vasoaktive Substanzen, wie Histamin und Endotoxine, werden frei und führen durch Vasokonstriktion und -dilatation zu einer Schädigung der Mikrovaskularisation des *Coriums* (Brent 1976, Mgassa et al. 1984, Nocek 1997). Dies bewirkt eine Sauerstoff- und Nährstoffunterversorgung der Lederhaut. Die Konsequenz daraus ist eine Absenkung und Rotation des Klauenbeins (Nocek 1997). Weitere mit SARA bzw. Laminitis assoziierte Klauenerkrankungen sind Sohlenblutungen bzw. gelb verfärbtes Horn an der Sohle, Doppelsohlen, Weiße-Linie-Erkrankungen, Sohlengeschwüre und Sohlenabszesse (Kofler 2015, Nordlund et al. 1995, Oetzel 2000).

Nicht selten fällt die subakute Pansenazidose durch nicht erklärbare Todesfälle oder vermehrte Keulung als Folge chronischer Erkrankungen auf (Nordlund et al. 1995, Oetzel 2000). Die meisten Herden, in denen die subakute Pansenazidose ein länger andauerndes Problem darstellt, weisen eine jährliche Abgangsrate von über 45 % und eine Keulungsrate von über 31 % auf (Nordlund et al. 1995).

2.2.4 Nachweismethoden und Diagnosestellung

Obwohl klinische Symptome einer subakuten Pansenazidose meist die ganze Herde oder zumindest bestimmte Gruppen einer Herde betreffen, werden sie häufig übersehen. In manchen Fällen treten auch gar keine klinischen Anzeichen auf. Um finanzielle Verluste zu vermeiden, ist es daher umso wichtiger Herden regelmäßig zu überwachen, sowie Krankheitsfälle, Symptome und andere Herdendaten zu dokumentieren. Es gibt ein paar Möglichkeiten, um SARA in einer Herde zu detektieren. Dazu zählen die Pansensaftuntersuchung, die Überwachung von Milchleistung und -fett, Trockenmasseaufnahme, Wiederkauaktivität, Kotbeschaffenheit und -pH und das Auftreten von SARA-spezifischen Folgeerkrankungen, sowie die Beurteilung des Fütterungsmanagements und die Rationszusammensetzung. Auch die Abgangsrate sollten nicht außer Acht gelassen werden (Enemark 2008, Garrett et al. 1999, Nordlund et al. 1995, Owens et al. 1998).

2.3 MicroRNA

MicroRNAs (miRNAs) sind kleine nicht-kodierende RNAs mit einer Länge von 21-25 Nucleotiden, die eine wichtige Rolle in der Genregulation einnehmen (Wienholds und Plasterk 2005, Xu et al. 2003). Sie kontrollieren die Expression von proteinkodierenden Genen und nehmen eine bedeutende Rolle in der Regulation zahlreicher zellulärer Prozesse in Tieren ein (Do et al. 2021). MicroRNAs regulieren die Genexpression posttranskriptionell, indem sie den Abbau von mRNA induzieren können oder die Translation von mRNA hemmen (Correia de Sousa et al. 2019).

Produziert werden miRNAs von zwei RNase-III-Proteinen, Drosha und Dicer, und interagieren mit ihren Seed-Sequenzen mit dem 3'-Ende, seltener mit dem 5'-Ende, der von den Zielgenen transkribierten mRNA und degradieren dann die Ziel-mRNA (Gulyaeva und Kushlinskiy 2016, Ha und Kim 2014). Dadurch wird die Menge einer bestimmten mRNA reduziert (Gulyaeva und Kushlinskiy 2016). Eine Vielzahl von mRNAs können allein von einer einzelnen miRNA reguliert werden, welche die Expression zahlreicher Gene, die oft an einem funktionellen Interaktionsweg beteiligt sind, beeinflussen kann (Lu und Rothenberg 2018). MiRNAs, welche eine sehr ähnliche Sequenz und Sekundärstruktur aufweisen, bezeichnet man als Familie. Aufgrund ihrer Ähnlichkeiten haben Familienmitglieder oft überlappende Ziele. Dies ermöglicht eine robustere Unterdrückung der Zielwege (Mohr und Mott 2015).

MiRNAs haben eine essentielle regulatorische Rolle, indem sie Zellproliferation, Wachstum, Differenzierung und Apoptose einer Zelle, sowie auch zelluläre Interaktionen und die Homöostase kontrollieren (Ranganathan und Sivasankar 2014). Viele physiologische wie auch pathologische Prozesse (z.B. Autoimmunerkrankungen, Virusinfektionen oder auch die Onkogenese) im Organismus werden durch miRNAs reguliert (Correia de Sousa et al. 2019, Ranganathan und Sivasankar 2014). Schätzungsweise werden etwa 30 % der Säugetiergene durch miRNAs reguliert (Munker und Calin 2013).

Die meisten miRNAs werden innerhalb von Zellen exprimiert. Durch unterschiedliche Transportmöglichkeiten, wie durch Exosomen, sind zirkulierende MicroRNAs stabil und können in Körperflüssigkeiten, wie in Blut, Speichel, Liquor oder auch in Urin gefunden werden. Zirkulierende MicroRNAs sind vor allem als potenzielle nicht invasive Biomarker für diverse Erkrankungen von Interesse (Gareev et al. 2020).

2.3.1 *MicroRNAs als diagnostische und therapeutische Hilfe bei Erkrankungen*

Zahlreiche Studien haben sich bereits mit der qualitativen und quantitativen Erfassung von MicroRNA-Expressionen beschäftigt und konnten erhebliche Veränderungen der miRNA-Expressionsprofile bei verschiedenen Erkrankungen zeigen, weshalb die Profilierung der miRNA-Expression wichtig für die Diagnostik und die Behandlung von Krankheiten sein kann (Gulyaeva und Kushlinskiy 2016). Generell wird angenommen, dass ihr Expressionsprofil als Biomarker fungieren kann (Bopp und Klein 2012, Coenen-Stass et al. 2018). Um jedoch den Wert eines Biomarkers zu verstehen, ist es notwendig, die pathophysiologische Beziehung zwischen Biomarker und klinischem Endpunkt zu kennen (Aronson und Ferner 2017).

In der Humanmedizin konnten bereits Veränderungen im miRNA-Expressionsmuster bei unterschiedlichen Erkrankungen beobachtet werden. Zudem gibt es Untersuchungen in Bezug auf die Auswirkung veränderter miRNA-Expressionsprofile auf die Entwicklung und das Fortschreiten verschiedener Krankheiten. Es wird postuliert, dass miRNAs helfen könnten eine neue Plattform für Therapeutika von bisher unheilbaren Krankheiten zu schaffen (Ullah et al. 2014). In der Humanmedizin liegt der Fokus hierbei vor allem auf der Krebsforschung. Da bereits bekannt ist, dass miRNAs bei Tumoren dysreguliert werden, wird davon ausgegangen, dass sie auch an der Initiierung und dem Fortschreiten von Krebserkrankungen beteiligt sind (Munker und Calin 2013). So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass die Expression von miRNAs bei krebserkranktem Gewebe anders ist als bei gesundem Gewebe (Meltzer 2005). Jedoch abhängig von der Funktion der Zielproteine können miRNAs nicht nur als Onkogene sondern auch als Tumorsuppressoren angesehen werden (Bhaskaran und Mohan 2014). Aber auch in vielen anderen Bereichen erwiesen sich MicroRNAs als relevant, wie in etwa bei allergischen (Dissanayake und Inoue 2016), kardiovaskulären (Wojciechowska et al. 2017), neurologischen (Goh et al. 2019, Ma 2018) oder metabolischen Erkrankungen (Fernández-Hernando et al. 2013), sowie auch bei viralen (Cullen 2011, Keshavarz et al. 2018, Trobaugh und Klimstra 2017) oder bakteriellen Infektionen (Eulalio et al. 2012, Maudet et al. 2014, Staedel und Darfeuille 2013) - um nur ein paar Beispiele zu nennen.

Studien haben gezeigt, dass miRNA auch bei ruminierenden Tieren eine wichtige Rolle bei den unterschiedlichsten biologischen Prozessen spielen, wie z.B. bei der Entwicklung des Pansens bzw. Gastrointestinaltraktes (Do et al. 2019, Liang et al. 2014, Zhong et al. 2017), der Entwicklung (Li et al. 2012, Xuan et al. 2020) oder Infektion (Jin et al. 2014, Lawless et al. 2013, Luoreng et al. 2018) der Milchdrüse, bei der Reproduktion (Huang et al. 2011, Mazzarella et al. 2021, Salilew-Wondim et al. 2014, Shangquan et al. 2020), metabolischen

Stoffwechselproblemen (Hailay et al. 2019), sowie bei Infektionskrankheiten (Do et al. 2021, Dong et al. 2017, Malvisi et al. 2016, Singh et al. 2020, Vegh et al. 2015) oder bei der Immunität (Coutinho et al. 2007, Lawless et al. 2014).

Zum jetzigen Zeitpunkt sind jedoch keine kommerziellen miRNA-Biomarker für den Einsatz im Krankheitsmanagement von Nutztieren erhältlich (Do et al. 2021).

Daher ist die Forschung in Hinblick auf die Expression und Verteilung von MicroRNAs nicht nur für ein besseres Verständnis der physiologischen und pathologischen Mechanismen bei Rindern, sondern auch um nachfolgend bessere Strategien für eine nachhaltige Produktion und Tiergesundheit zu entwickeln, von wichtigem Interesse (Sun, Hui-Zeng et al. 2019). So könnten erfolgreich entwickelte miRNA-Biomarker aktuelle Methoden verbessern oder aber auch zur Entwicklung neuer Methoden oder Therapien führen, um Nutztierkrankheiten zu managen. Um jedoch miRNA-Therapeutika für Nutztierkrankungen zu entwickeln, müssen erst spezifische Funktionen der miRNAs, sowie deren Interaktionen mit anderen Biomolekülen bei der Krankheitspathogenese verstanden werden (Do et al. 2021).

Obwohl bereits zahlreiche Studien über den Zusammenhang von MicroRNA-Expressionen und diversen physiologischen Prozessen und Erkrankungen publiziert wurden, ist die Funktion der meisten miRNAs auf biologischer Ebene aufgrund ihrer Komplexität bisher jedoch noch unbekannt (Correia de Sousa et al. 2019, Wienholds und Plasterk 2005).

Aufgrund dessen konzentriert sich die Forschung zunehmend auf das Verständnis der biologischen Funktionen von miRNAs und ihre Funktion als potentielle Biomarker, die mit diversen Erkrankungen in Verbindung gebracht werden können.

Um zu klären, ob miRNAs auch bei der Entstehung von SARA beteiligt sind und phyto gene Futtermittelzusatzstoffe diese beeinflussen können, soll in der vorliegenden Arbeit in einem SARA Tiermodell mit neun multiparen Holstein Friesian Kühen anhand zwei verschiedener Diäten und das Zufüttern eines phyto genen Futtermittelzusatzes das miRNA-Expressionsprofil untersucht werden.

3. MATERIAL UND METHODE

Diese Studie ist Teil des PhD Projektes „Identification of biomarkers of rumen health“ von Oyindamola Esther Osinowo, welches von Ass. Prof. Susanne Kreuzer-Redmer geleitet und beaufsichtigt wird. Dieses Projekt ist dem “Christian Doppler Laboratory for Innovative Intestinal Health Concepts in Livestock” zugehörig und wird durch Prof. Qendrim Zebeli koordiniert. Der Tierversuch wurde durch die Ethikkommission der Veterinärmedizinischen Universität Wien genehmigt. Die Tierversuchsgenehmigungsnummer lautet BMBWF-68.205/0033-V/3b/2019.

Der Versuch bestand aus zwei Durchgängen, sogenannten Runs. Innerhalb dieser Runs gab es jeweils eine Woche in der eine Grundfütterration (siehe Punkt 3.2.1) gefüttert wurde, welche als Woche 1 bezeichnet wurde. In den Wochen 2-4 gab es eine konzentratreiche Ration (siehe Punkt 3.2.3). Zwischen der Woche 1 und der Woche 2 gab es eine „Adaptionswoche“ (siehe Punkt 3.2.2). Innerhalb der Runs wurden die an der Studie teilnehmenden Kühe in zwei Gruppen geteilt (Abbildung 5). Zum einen gab es eine Kontrollgruppe und zum anderen eine Gruppe, welche mit einem phytogenen Zusatzstoff (siehe Punkt 3.2.4) gefüttert wurde. Zwischen den Durchgängen erfolgte ein Wechsel, sodass sich ein sogenanntes „Cross-Over-Design“ ergab. Zudem gab es Ruhephasen zwischen den Durchgängen, sodass sich die Tiere von dem vorherigen Run erholen konnten.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit Run 2, Woche 1, in welcher die Kühe eine rohfaserreiche Grundfütterration erhielten und mit Run 2, Woche 2, in welcher die Kühe eine Diät mit 65% Konzentrat gefüttert bekommen haben. In jeder Woche gab es eine eigene Probenentnahme.

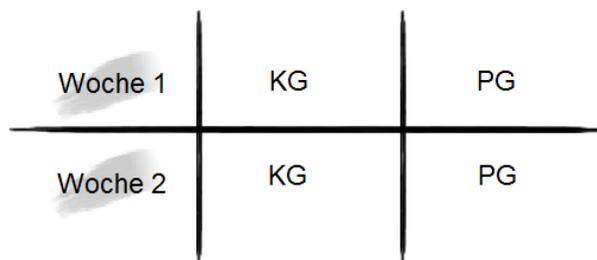


Abbildung 5: Vereinfachte graphische Darstellung des Versuchschemas der ersten Wochen eines Runs. Die Adaptionswoche wurde hier nicht miteinbezogen. Woche 1: Grundfutter-Fütterung, Woche 2: Konzentratfutterfütterung, KG: Kontrollgruppe, PG: Gruppe mit phytogenem Futtermittelzusatzstoff

Nachdem die Proben entnommen, die RNA isoliert, sowie die Quantitäts- und Qualitätsbestimmung hausintern gemacht wurde, wurden die Proben an die CeGaT GmbH in Tübingen, Deutschland versendet, wo sie sequenziert wurden.

3.1 Tiere und Aufstallung

Für den Versuch wurden neun multipare nicht laktierende Holstein Friesian Kühe, alle in Österreich geboren, verwendet. Die Kühe waren im Durchschnitt $11,3 \pm 2,29$ Jahre alt und $909,75 \pm 98,17$ kg schwer. Alle Kühe waren mit einer Pansenfistel versehen.

Die Gruppe wurde in zwei Untergruppen geteilt. Vier der neun Kühe (Elfi, Edit, Newada und Elsa) bekamen zusätzlich zur Diät phyto gene Zusatzstoffe. Die andere Untergruppe fungierte in dem Zusammenhang als Kontrollgruppe (Bergrose, Nelda, Banane, Narbe, Ricky).

Die Kühe waren während der gesamten Dauer des Versuches an der VetFarm Kremesberg der Vetmeduni Vienna aufgestallt. Der Stall ist mit Tiefeinstreuboxen (2,6 x 1,25 m) mit einer Strohmatratze ausgestattet.

3.2 Fütterung

Minerallecksteine standen zu jeder Zeit nach freier Wahl zur Verfügung. Außerdem hatten die Tiere Wasser *ad libitum*, außer während der kontrollierten ersten Fütterung am Morgen, da die Kühe dazu angebunden wurden. Die Totalmischration (TMR) wurde einmal täglich, um 6 Uhr morgens, unter Verwendung eines automatisierten Fütterungssystems (Trioliet Triomatic T15, Oldenzaal, Niederlande) gemischt und dann in den jeweiligen Futtertrögen vorgelegt. Durch spezielle Futtertröge, welche mit elektronischen Waagen und computergesteuerten Zugängen (Insentec B.V., Marknesse, Niederlande) ausgestattet sind, konnte die individuelle Futteraufnahme kontinuierlich kontrolliert und aufgezeichnet werden. Aufgrund der geringen Feuchtigkeit in der Ration wurde der TMR während des Mischens Wasser mit einem Ziel von ungefähr 46 % des Trockenmasse-Gehalts zugesetzt.

Einzelne Futterproben, die den Tieren angeboten wurden, wurden gesammelt, wöchentlich gepoolt und unter Verwendung offizieller Protokolle analysiert. Die Trockensubstanzkonzentrationen von Maissilage und Grassilage wurden wöchentlich durch 24-stündiges Erhitzen der Futterproben auf 100 °C bestimmt. Durch die dadurch erhobenen

Trockenmasse-Anteile wurden die Fütterungen angepasst, um die ordnungsgemäße Einbeziehung der Inhaltsstoffe in die TMR sicherzustellen.

3.2.1 Fütterung Woche 1 (Grundfutter)

Die Zusammensetzung des Grundfutters bestand aus 45 % Grassilage, 45 % Maissilage und 10 % Heu.

3.2.2 Adaptionstwoche

Während des Überganges von Woche 1 (Grundfutter) zu Woche 2 (Konzentratfutter) wurde eine zusätzliche Woche zur Anpassung eingefügt. Diese Adaptionstwoche betrug ebenso wie die anderen Wochen genau sieben Tage. Während dieser Woche wurde die Konzentratmischung (siehe Punkt 3.2.3) an den Tagen 1-7 um 10 %, 10 %, 10 %, 10 %, 10 %, 10 % und 5 % erhöht. Folglich wurden alle anderen Bestandteile der Diät im Ausgleich dazu kontinuierlich verringert. Somit wurde mit dem Ende der Adaptionstwoche die gewünschten 65,0 % Konzentratmischung für die Woche 2 (Konzentratfütterung) erreicht. In der Adaptionstwoche konnte bei den Tieren bereits eine SARA mittels pH-Verweilsystem festgestellt werden.

3.2.3 Fütterung Woche 2 (Konzentratfutter)

In der Woche 2 wurden die Tiere mit einer konzentratreichen Ration gefüttert. Diese setzte sich zusammen aus 26,25 % Grassilage, 8,75 % Maissilage und 65,0 % Konzentratmischung. Die Konzentratmischung enthielt: Weizen (30,36 %), Triticale (18,06 %), Bäckerei-Nebenprodukten (23,02 %), Rapsmehl (23,94 %), Melasse (2,99 %), Mineral-Vitamin-Vormischung für Milchvieh (1,53 %) und Kalkstein (1,0 %).

3.2.4 Phyto gener Futtermittelzusatzstoff

Der phyto gene Futtermittelzusatzstoff wurde von BIOMIN zur Verfügung gestellt und der Verumgruppe zusätzlich verabreicht. Da Informationen über die Zusammensetzung des phyto genen Futtermittelzusatzstoffes nicht zugänglich waren, wurden die Inhaltsstoffe nicht genauer beschrieben.

3.3 Ruminale pH-Wert-Messung

Die Messung des ruminalen pH-Wertes während des Versuches wurde nicht selbstständig durchgeführt und wird daher nicht näher in der Arbeit als wie folgt beschrieben. Die pH-Wert-Messung wurde mit einem pH-Verweilsystem (Dascor Inc., Kalifornien) durchgeführt, welches in den ventralen Pansensack platziert wurde. Der ruminale pH-Wert wurde kontinuierlich in 15-Minuten-Intervallen aufgezeichnet. Die Daten wurden einmal in der Woche über eine spezielle Software derselben Firma ausgelesen. Als pH-Wert-Grenze für SARA wurde die Publikation von Zebeli et al. von 2008 herangezogen. In dieser wird SARA ab einem pH-Wert von $< 5,8$ für mehr als 320 min (5,24 Stunden) am Tag definiert (Zebeli et al. 2008). Aus den gesammelten Daten ging hervor, dass die Kühe bereits am fünften Tag der Adaptionswoche an SARA erkrankt waren und somit während der gesamten Zeit, in der die konzentratreiche Diät gefüttert wurde, an der Erkrankung litten (unveröffentlichte Daten von CDL LiveGut). Daher wird an manchen Stellen in der Arbeit jene Woche, in welcher das Konzentratfutter gefüttert wurde, auch als SARA-Woche bezeichnet.

3.4 Probengewinnung und Lagerung

Für die Gewinnung der *Papilla*-Proben und für die Lagerung wurde ein eigenes Protokoll angefertigt.

Vorab wurde das benötigte Material vorbereitet. Es wurden zumindest zwei Kryoröhrchen für jedes Tier benötigt, da jede Probe doppelt entnommen wurde. Die Röhrchen wurden dem Tier entsprechend gekennzeichnet. Außerdem wurden sterile Pinzetten, sterile Scheren, 70%iger Ethanol, Papiertücher, Handschuhe sowie Rektalhandschuhe benötigt. Es wurden 20 ml Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) mit einer 20 ml Spritze aufgezogen und in ein 10 ml Behältnis mit Schraubverschluss wurden weitere 10 ml PBS gefüllt. Ein größeres Dewar-Gefäß mit flüssigem Stickstoff, eine Kelle sowie mehrere blaue Petrischalen wurden vorbereitet, sowie ein großes Fass mit Deckel mit heißem Wasser befüllt, um es anzuwärmen und warm zu halten.

Für die Entnahme der Probe waren mehrere Personen erforderlich. Die Kuh wurde so angebunden, dass sie sich nicht bewegen konnte, man aber genügend Platz hatte um den Pansen zu entleeren. Der Panseninhalt wurde dann mit den Händen durch die Pansenfistel entleert und direkt in das zuvor angewärmte Fass verbracht, da der Inhalt weiterhin Körpertemperatur haben sollte. Nachdem dreiviertel des Pansens über die Fistelöffnung

entleert wurden, wurde die Öffnung mit Papiertüchern gereinigt. Danach erfolgte die Probenentnahme. Um keine Schmutzpartikel in den Pansen einzubringen wurden frische Handschuhe angezogen. Die Entnahmestelle befand sich ungefähr 20 cm unter der Fistel im ventralen Pansensack. Die Pansenwand wurde an der besagten Stelle durch die Pansenfistel nach außen verlagert. Eine zweite Person ergriff an dieser Stelle die Pansenwand mit sauberen Handschuhen und hielt sie fest. Hierbei wurde beachtet, dass die nach außen verlagerte Pansenwand weder mit der äußeren Bauchwand in Berührung kam, noch die zentrale Stelle, wo die Probe entnommen wurde, von der zweiten Person berührt wurde. So wurde eine saubere Entnahme gewährleistet. Durch eine weitere Person wurde nun die vorbereitete Petrischale bis zur Hälfte mit flüssigem Stickstoff gefüllt. Der zentrale Bereich der vorverlagerten Pansenwand (circa 4 x 4 cm) wurde mit 15-20 ml PBS gewaschen. Durch vorsichtiges Reiben konnten Futterpartikel entfernt werden. An dieser Stelle nahm man nun Schere, Pinzette und Klemme zur Hand, hielt die zuvor gekennzeichneten Probenröhrchen griffbereit und öffnete den 10 ml Behälter mit PBS. Für die Entnahme wurden die Pansenpapillen mit der sterilen Klemme möglichst an der Basis ergriffen. Mit der Pinzette wurde dann eine einzelne Papille erfasst, welche so nah an der Klemme wie möglich abgeschnitten wurde. Wichtig war, dass weder in das Epithel zwischen zwei Papillen, noch in die Muskelschicht geschnitten wurde. Die abgeschnittene Papille wurde sofort in das 10 ml Gefäß mit PBS überführt und umgerührt, um das daran haftende Blut wegzuwaschen. Nun wurde die Papille in mehrere Teile (je nach Größe der Papille) zerschnitten und in die Petrischale mit flüssigem Stickstoff gegeben. Wenn keine Blasen mehr aufstiegen konnte die Papille in ein Probenröhrchen überführt werden. Auf die gleiche Art und Weise wurde mit mehreren Papillen verfahren. Es wurde darauf geachtet, dass in einem Probenröhrchen circa 0,5 g Papillenmaterial enthalten waren und die Entnahmestelle sich auf 1 cm³ beschränkte. Die Probenröhrchen wurden dann in die Aufbewahrungsbox gestellt und so schnell wie möglich bei -80 °C gelagert. Nachdem alle Proben entnommen wurden, konnte die Pansenwand losgelassen werden und durch die Fistelöffnung wieder in den Bauchraum verbracht werden. Danach wurde der Pansen wieder mit dem zuvor entnommenen warm gehaltenen Panseninhalt aufgefüllt. Die Öffnung wurde gereinigt und die Pansenfistel verschlossen. Schere, Pinzette und Klemme wurden zuerst mit Papiertüchern und anschließend mit 70%igen Ethanol gereinigt. Wichtig war, dass das auf dem Instrumentarium verbleibende Ethanol an der Luft trocknet. Da öfters Proben entnommen wurden, wurde darauf geachtet, dass niemals dieselbe Stelle verwendet wurde. Nachdem die Kuh fertig beprobt war

und der Pansen aufgefüllt wurde, wurde das gleiche Prozedere bei den verbliebenen Kühen angewandt.

3.5 RNA Isolation

Die Isolation wurde mit dem NucleoSpin® miRNA-Kit von Macherey-Nagel (Katalognummer 740971.50) durchgeführt.

3.5.1 Materialien

Kit-Inhalt:

- 30 ml Lysis Buffer ML
- 20 ml Protein Precipitations Buffer MP
- 60 ml Binding Buffer MX
- 25 ml Membrane Desalting Buffer MDB
- 7 ml Reaction Buffer for rDNase
- 2 Fläschchen rDNase, RNase-free
- 35 ml Wash Buffer MW1
- 12 ml Wash Buffer MW2 (Konzentrat)
- 13 ml RNase-free H₂O
- 50 Stück NucleoSpin® Filter (lila)
- 50 Stück NucleoSpin® RNA Membranen (blau)
- 50 Stück NucleSpin® Protein Removal Membranen (weiß)
- 50 Tubes 1,5 ml
- 50 Tubes 2 ml
- 150 Tubes 2 ml, mit Deckel

Da in den ersten Durchläufen nach Originalprotokoll teilweise ungenügende Ergebnisse nach den einzelnen Schritten erzielt wurden, wurde es an manchen Stellen abgeändert. Das nachfolgende Protokoll weicht somit dem Original ab.

Für die Homogenisierung der Proben, beschrieben unter dem Punkt 3.5.3, wurden eigene Homogenisierungs-Tubes (Abbildung 6) zusammengestellt. In zuvor ausgewählte Tubes (VWR, Katalognummer 525-0650) wurde eine Mischung aus Zirkonia-Kügelchen, 0,7 mm (Roth Lactan, RN037.1) und Zirkonia-Kügelchen, 2,0 mm (Roth Lactan, RN039.1) gegeben.

Diese zusammengestellten Röhrchen wurden dann in einem Becherglas, mit Aluminiumfolie bedeckt, autoklaviert.

3.5.2 Vorbereitung

Vor dem Öffnen des Kits wurde der Arbeitsplatz gereinigt und mit 75%igen Alkohol desinfiziert. Für das Arbeiten wurden Einweghandschuhe, welche ebenfalls mit 75%igen Alkohol desinfiziert werden, verwendet. Danach wurde die Zentrifuge eingeschaltet und auf 4 °C gekühlt.

Die Proben wurden nach dem Vorbereiten des Arbeitsplatzes aus dem -80 °C kalten Gefrierschrank entnommen und in ein Styroporbehältnis mit Eis überführt. Das Arbeiten erfolgte auf Eis.

Nach dem Öffnen des NucleoSpin miRNA-Kit mussten als erstes die DNase und der Waschpuffer 2 (MW2) vorbereitet werden. Der DNase wurde 3 ml Reaction Buffer for rDNase zugefügt. Diese wurde dann für eine Minute lang gemischt, aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Zu den 12 ml Waschpuffer 2 (MW2) wurden 48 ml unvergällter 96-100%iger Alkohol pipettiert. Der fertig vorbereitete MW2 konnte bei Raumtemperatur gelagert werden.

Für jede Probe wurden vier 2 ml Eppendorf Tubes vorbereitet, indem sie am Deckel und seitlich mit einem Kürzel, welches der jeweiligen Probe zugeordnet wurde, beschriftet wurden. Zudem wurden für jede Probe jeweils ein 1,5 ml Eppendorf Tube, sowie ein 0,6 ml Eppendorf Tube vorbereitet und ordnungsgemäß beschriftet. Zuletzt mussten Boxen für die Lagerung der 1,5 ml und 0,6 ml Tubes vorbereitet und beschriftet werden.

3.5.3 Homogenisierung der Proben

Es wurden je 20 ng *Papilla* Probe abgewogen und sofort in ein Homogenisations-Tube (Abb. 6), welches mit Keramik-Beads versehen war, gegeben, in welche bereits zuvor 300 µl Lysis Buffer (ML) pipettiert wurden. Die Probe wurde nun für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss daran erfolgte die Homogenisierung mit dem FastPrep-24 Instrument mit folgenden Einstellungen: 30 Sekunden, Speed 6,0, Adapter MP. Dies wurde dreimal wiederholt. Zwischen den Wiederholungen wurden die Tubes für fünf Minuten auf Eis gestellt. Da sich nach der Homogenisierung Schaum in den Tubes gebildet hat, wurden diese zusätzlich zweimal für zwei Minuten bei 11.000 x g zentrifugiert.



Abbildung 6: selbst zusammengestellte Homogenisierungstubes

3.5.4 Isolation

Für jede Probe wurde ein frisches, zuvor vorbereitetes Eppendorf Tube genommen. Auf diese wurden jeweils eine lila Membran vom Kit (Abbildung 8) darauf gesetzt. Die homogenisierte Probe wurde vom Boden her mit einer Pipette aufgesaugt und auf die lila Membran pipettiert. Hierbei war unbedingt darauf zu achten, dass die Pipettenspitze die Membran keinesfalls berührt, da diese ansonsten beschädigt werden könnte. Die Proben wurden dann in die gekühlte Zentrifuge gestellt und für zwei Minuten bei 11.000 x *g* zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren konnte die lila Membran verworfen werden.

Zu jeder Probe wurden unvergällter 96-100%iger Alkohol im Verhältnis 1:2 hinzugefügt. Dieses Gemisch wurde im Anschluss für 5-10 Sekunden gevortext und danach für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Im nächsten Schritt wurden die großen RNA-Stücke auf eine Membran gebunden, die miRNA befand sich im Durchfluss, weswegen das Eppendorfgefäß nicht verworfen werden durfte. Um die große RNA zu binden wurden die blauen Membranen genommen und jeweils eine auf ein frisches, vorbereitetes Eppendorf Tube gesetzt. Die Probe wurde auf die blaue Membran pipettiert und wie zuvor musste darauf geachtet werden, die Membran nicht mit der Pipettenspitze zu berühren. Die Probe wurde dann für eine Minute bei 14.000 x *g* zentrifugiert. Der Durchfluss wurde auf die Seite gestellt, wurde jedoch nicht verworfen.

Die blaue Membran wurde nun zum Entsalzen auf ein neues Eppendorf Tube gesetzt. Das Entsalzen erfolgte durch das Pipettieren von 350 μ l Membrane Desalting Buffer (MDB) auf die blaue Membran und durch das anschließende einminütige Zentrifugieren bei 11.000 x *g*.

Für den DNA-Verdau wurde nach dem Entsalzen 100 μ l DNase Reagenz auf die blaue Membran (Abbildung 7) pipettiert. Die Proben wurden für mindestens 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Während die Proben inkubierten konnten die zuvor beiseite gestellten Tubes mit der miRNA weiterbearbeitet werden. Es wurden jeweils 300 μ l Protein Precipitations Buffer (MP) zu den miRNA-Proben pipettiert, das Gemisch dann fünf Sekunden lang gevortext und für drei Minuten bei 11.000 x *g* zentrifugiert.

Nun wurde jeweils eine weiße Membran auf ein frisches, zuvor vorbereitetes Eppendorf Tube gesetzt und der Überstand der Probe vorsichtig auf die frische Membran pipettiert. Das Tube mit der weißen Membran wurde dann in die Zentrifuge gestellt und die Probe für eine Minute bei 11.000 x *g* zentrifugiert. Die weiße Membran konnte verworfen werden, da sich die miRNA im Durchfluss befand.

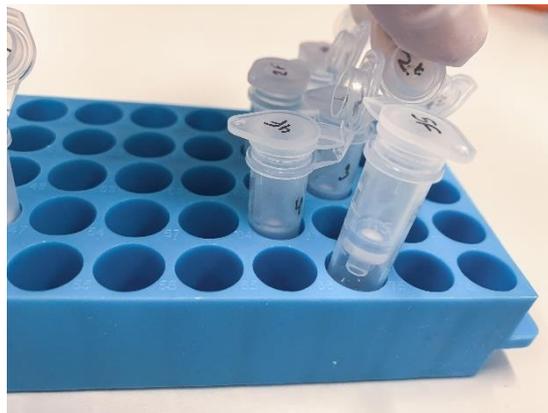


Abbildung 7: Tubes mit eingesetzter blauer Membran

Im Anschluss daran wurden 800 μ l Binding Buffer (MX) zu den Proben pipettiert und diese dann für fünf Sekunden durch Vortexen vermischt. Um nun die miRNA ebenso auf die blaue Membran zu binden, wurde die Probe nun stufenweise in 600 μ l-Schritten auf die blaue Membran pipettiert und danach für eine Minute bei 11.000 x *g* zentrifugiert. Dies wurde so lange wiederholt, bis die Probe vollständig pipettiert wurde. Der Durchfluss wurde jedes Mal verworfen, um ein Übergehen der Tubes zu verhindern.

Als nächstes wurden die blauen Membranen gewaschen und getrocknet. Dazu wurden 600 μ l Wash Buffer MW1 auf die Membran pipettiert und für eine Minute bei 11.000 x *g* zentrifugiert.

Der Durchfluss wurde verworfen. 700 µl von dem vorbereiteten Wash Buffer MW2 wurden pipettiert und für eine Minute bei 11.000 x *g* zentrifugiert. Der Durchfluss konnte wiederum verworfen werden. Der dritte Waschschrift wurde mit 250 µl MW2 durchgeführt. Nachdem diese auf die Membran pipettiert worden war, wurde die Probe drei Minuten lang bei 11.000 x *g* zentrifugiert. Danach konnte der Durchfluss wieder verworfen werden. Nach dem Waschen wurden die Membranen getrocknet, indem sie für fünf Minuten geöffnet stehen gelassen wurden.

Zum Schluss wurde die RNA von der Membran gelöst. Dazu nahm man ein frisches Eppendorf Tube und setzte die blaue Membran darauf. Es wurden jeweils 40 µl RNase-free H₂O auf die Membranen pipettiert. Dies wurde nun für zwei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und danach zwei Minuten lang bei 11.000 x *g* zentrifugiert. Sobald die Zentrifuge fertig war, mussten die Proben sofort auf Eis gestellt werden, da die RNA ansonsten abgebaut werden würde.

Nun wurden die Proben in die zuvor beschrifteten 1,5 ml und 0,6 ml Tubes aliquotiert. Dazu wurden jeweils 5 µl für die Qualitäts- und Quantitätsbestimmung in die 0,6 ml Tubes pipettiert und jeweils 35 µl der Probe in die 1,5 ml Eppendorf Tubes.



Abbildung 8: Membranen

3.5.5 Lagerung der Proben nach der Isolation

Die aliquotierten 5 µl Proben wurden in Boxen bei -20 °C gelagert, wenn sie nicht sofort für die Qualitäts- bzw. Quantitätsbestimmung verwenden wurden. Die Lagerung der Proben in den 1,5 ml Tubes erfolgte so schnell wie möglich bei -80 °C in den dafür vorbereiteten Boxen.

3.6 Quantitätskontrolle mit dem DeNovix Spectrophotometer

Mit dem DeNovix Spectrophotometer (Abbildung 9) wurde am VetCore der Veterinärmedizinischen Universität Wien nach der Isolation gemessen, wie viel totalRNA in der Probe enthalten war. Die aliquotierten 5 µl Proben wurden auf Eis transportiert und kurz vor der Messung in der Hand aufgetaut. Jede Probe wurde zweimal gemessen.

Zuerst wurde das Micropodest mit 2 µl Wasser und einem Kimtech-Tuch gereinigt, indem das Kimtech-Tuch aufgelegt wurde und der Arm des DeNovix kurz geschlossen wurde. Dann wurde mit 2 µl Eluationspuffer (hierfür wurde RNase-free H₂O verwendet) auf dem Micropodest die Blank-Messung gestartet. Zur Kontrolle wurde die erste Messung wieder mit dem RNase-free H₂O gemacht. Der Blindwert (Blank) sollte um den Wert 0 liegen, um die weitere Messung ohne Folgefehler durchführen zu können. Sollte das Gerät dies nicht anzeigen, empfahl es sich die erwähnten ersten Schritte so oft zu wiederholen, bis die erste Messung mit RNase-free H₂O den Wert 0 bzw. annähernd den Wert 0 angezeigt hat. War dies erledigt, wurde 1 µl der Probe auf das Micropodest pipettiert und mit *Measure* die Messung gestartet. Der Wert wurde in ng/µl angegeben. Das Podest wurde mit einem Kimtech-Tuch gereinigt, indem das Tuch auf das Podest gelegt und der Arm geschlossen wurde. Es wurde eine Doppelmessung durchgeführt, das heißt, jede Probe wurde zweimal pipettiert und neu gemessen. Nach der letzten Messung wurde das Micropodest mit 2 µl RNase-free H₂O gereinigt und mit einem Kimtech-Tuch getrocknet.



Abbildung 9: DeNovix Spectrophotometer

3.7 Qualitätskontrolle

Die Qualitätskontrolle wurde mit dem Bioanalyzer 2100 von Agilent am VetCore der Veterinärmedizinischen Universität Wien durchgeführt. Hier wurde mittels eines Chips aus dem Agilent 6000 RNA Nano Kit die Integrität der RNA gemessen und mit dem Chip des Agilent Small RNA Kit das Vorhandensein von MicroRNA.

3.8 Sequenzierung

Die Sequenzierung der MicroRNA erfolgte durch die CeGaT GmbH in Tübingen, Deutschland. Hier fand außerdem eine weitere Qualitätskontrolle mit dem Bioanalyzer RNA (Agilent) statt.

Für die Erstellung der RNA-Library wurde bei allen *Papilla*-Proben eine RNA Menge von 200 ng verwendet, welche dann mit dem Kit NEXTflex Small RNA-Seq (Bioo Scientific) für die Sequenzierung aufbereitet wurde. Die Sequenzierung wurde mit dem NovaSeq 6000 Sequencing System (Illumina), 2 x 100 bp durchgeführt. Das Demultiplexen der sequenzierten Reads erfolgte mit der Software bclfastq (2.20) von Illumina. Die Qualität der FASTQ-Dateien wurde mittels FastQC (Version 0.11.5-cegat) analysiert.

CeGaT GmbH stellte die Rohdaten der Sequenzierung in einem FASTQ-Format zur Verfügung.

3.9 Analyse und Auswertung der MicroRNA-Daten

Die Auswertung und Analyse der Daten erfolgte mit dem Programm RStudio, Microsoft Excel und Venny 2.1.0.

Zuerst wurden die Rohdaten mit RStudio (Version 1.3.1093) bearbeitet. Der Code, der verwendet wurde, wird in Abbildung 10 dargestellt. Wichtig war, dass man den Code von der Zeile 1-66 (Abbildung 10) für jede einzelne Probe in R durchlaufen lässt. Somit wurde für jede Probe ein eigenes Textdokument erstellt. Ließ man nun den Code von der Zeile 68-81 (Abbildung 10) in R durchlaufen, erhielt man ein Exceldokument (Abbildung 11), in welchem die miRNAs aller Proben gemeinsam in der Tabelle erschienen. In dieser Tabelle waren nun aufgrund des Codes Duplikate ausgeschlossen. Außerdem wurden nur jene miRNAs dargestellt, welche einen read count von mindestens zehn in mindestens einer Probe hatten.

```

1 setwd("G:/miRNA/output_papillae/zipdateien/_Results_mature_All")
2 library(tidyr)
3 library(tidyverse)
4
5 table<-read.table("S2502Nr25mature_sense.grouped", sep = "\t", header=T)
6 head(table)
7 glimpse(table)
8
9 #arrange by higher read.count (already done, but double check)
10 table<-arrange(table, desc(read.count))
11
12 # Separate the "name" column making 2 new columns: species and miR name
13 table_sep<-table %>%
14   mutate(species=str_sub(name, 1,3),
15          miR=str_sub(name, 5,-1))
16
17 # --- Not needed - Just to explore the dataset -----
18 # Select only humans
19 h<-filter(table_sep, species=="hsa")
20
21 # Select only bovine
22 b<-filter(table_sep, species=="bta")
23 #-----
24
25 #Find duplicates (adds new column = duplicate, T or F)
26 table_dupl<-table_sep %>%
27   mutate(duplicate=duplicated(miR)|duplicated(miR, fromLast = T))
28
29 #Filter unique miRNAs
30 unique_mir<- table_dupl %>%
31   filter(!duplicate)
32
33 #Filter all duplicate miRNAs
34 shared_mir<- table_dupl %>%
35   filter(duplicate)
36
37 #select only bovine and remove duplicates (select highest read.count and first chromosome)
38 select_bovine<-filter(shared_mir, species=="bta") %>%
39   group_by(miR) %>%
40   slice_max(read.count) %>%
41   distinct(name, .keep_all = T)
42
43 #select only human and remove duplicates (select highest read.count and first chromosome)
44 select_hum<-filter(shared_mir, species=="hsa") %>%
45   group_by(miR) %>%
46   slice_max(read.count) %>%
47   distinct(name, .keep_all = T)
48
49 #Find miRNAs mapped only against human genome
50 only_human<-anti_join(select_hum, select_bovine, by="miR")
51
52 # Merge all subsets to obtain the final table
53 final_table<-rbind(unique_mir, select_bovine, only_human)
54
55
56 #-----
57 # Separate the name and precursors
58 tab_precursors<- final_table %>%
59   separate(name, c("species", "miR", "number", "precursor", "add.number"), "-")
60
61 # A warning message will appear: all the miRNAs that don't have precursors will have "NA" in the
62 # corresponding column
63
64 # write new table (in different formats) to export
65 write.csv(final_table, file="miRNAs-S2502Nr25.1.csv", quote = F, row.names = F)
66 write.table(final_table, file="miRNAs-S2502Nr25.1.txt", sep="\t", quote = F, row.names = F)
67
68 #SHARED miRNAs
69 library(edgeR)
70
71 #Merge read.count per sample
72 samples=list.files(pattern = "*.txt" )
73 read_count <- readDGE(samples, columns=c(1,3))
74 read_counts_dataset=as.data.frame(read_count$counts)
75 read_counts_filt10 <- read_counts_dataset[rowSums(read_counts_dataset >= 10) >= 1, ]
76
77 #write new table to export
78
79 #Create a new folder called shared
80 write.csv(read_counts_filt10, file="shared/reads_per_sample_filt10.csv", quote = F, row.names = T)
81 write.table(read_counts_filt10, file="shared/reads_per_sample_filt10.txt", sep="\t", quote = F, row.names = T)

```

Abbildung 10: Verwendeter Code im Programm RStudio (erstellt von Sara Ricci), hier anhand des Beispiels Probe Nr. 25 (Bergrose, Woche 1)

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1		miRNAs-S25C										
2	bta-miR-143	1561848	3547819	1543763	1450465	1489614	855500	1312341	1099636	1369199	650481	1244
3	bta-miR-27b	601997	675382	421247	511703	470183	260909	412533	256231	500253	297468	486
4	bta-miR-205	342342	360835	264233	362860	326018	174977	283063	169317	287754	159232	297
5	hsa-let-7g-5p	269437	320430	239585	242527	230400	128992	183311	127461	253368	131325	228
6	bta-let-7g	269437	320430	239585	242527	230400	128992	183311	127461	253368	131325	228
7	bta-miR-27a	234526	244476	195333	179764	268464	130231	214869	124296	195707	146880	210
8	bta-miR-23a	211681	203665	94492	172033	221246	96462	116883	76357	158175	56984	105
9	hsa-miR-23a	211681	203660	94487	172031	221238	96460	116883	76355	158173	56984	105
10	bta-miR-30a	166786	474989	166619	251524	170895	108711	176269	159432	259273	126669	444

Abbildung 11: Ausschnitt aus dem finalen Excelldokument nach dem Durchlaufen des Codes von Abb. 10 in R

In Excel wurde die Tabelle wiederum sortiert und geordnet. Verschiedenste Parameter konnten so in Excel miteinander verglichen werden. Im Folgenden wird das Vorgehen der Auswertung der exklusiv exprimierten MicroRNAs der Woche 1 (Grundfutterdiät) (Tab. 7, linke Spalte) und der Woche 2 (Konzentratreiche Diät) (Tab. 7, rechte Spalte) erläutert. Zu Beginn wurden alle vorhandenen miRNAs in der Woche 1 und alle vorhanden miRNAs in der Woche 2 in jeweils ein neues Blatt kopiert. In dem Blatt mit den miRNAs der Woche 1 wurde nun am Ende der Tabelle eine weitere Spalte hinzugefügt, in welcher die Funktion „=ZÄHLENWENN(Bereich;0)“ angewandt wurde. In der ersten Zeile konnten nun die read counts der ersten angeführten miRNA ausgewählt werden (Abbildung 12). Danach wurde die Funktion für die gesamte Tabelle durch die Übertragung der Funktion nach unten bis zur letzten miRNA angewandt. Nach aufsteigendem Sortieren konnte nun jene miRNAs herausgefiltert werden, welche in allen Kühen vorhanden waren. Das waren alle miRNAs mit einer Null in der Spalte der Zählenwenn-Funktion. Analog dazu wurde in dem Blatt mit den miRNAs der Woche 2 vorgegangen.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1		miRNAs-S	miRNAs-S2502Nr33	Zählenwenn								
2	bta-miR-143	1561848	3547819	1543763	1450465	1489614	855500	1312341	1099636	1369199	=ZÄHLENWENN(B2:J2;0)	
3	bta-miR-27b	601997	675382	421247	511703	470183	260909	412533	256231	500253		
4	bta-miR-205	342342	360835	264233	362860	326018	174977	283063	169317	287754		
5	hsa-let-7g-5p	269437	320430	239585	242527	230400	128992	183311	127461	253368		

Abbildung 12: Auswahl des Bereiches für die „Zählenwenn“-Funktion

Dann wurden jene miRNAs des Blattes der Woche 1 in ein weiteres Blatt kopiert, welche in allen Kühen vorhanden waren. Dies wurde auch für die miRNAs des Blattes der Woche 2 gemacht. Somit erhielt man eine Tabelle mit miRNAs, welche in der Woche 1 in jeder Kuh vorhanden waren bzw. in der Woche 2 in jeder Kuh vorhanden waren. Diese miRNAs wurden nun in das Onlineprogramm Venny 2.1.0 kopiert (Abbildung 13). Venny ermöglicht die

Darstellung der Anzahl der miRNAs der jeweiligen Gruppe in einem Venn-Diagramm. Außerdem zeigt es durch Anklicken der jeweiligen Ergebnisse im Diagramm die darin enthaltenen miRNAs unter „Results“. In der Abbildung 13 wird somit ersichtlich, dass 31 miRNAs exklusiv in der Woche 1 exprimiert wurden, 18 miRNAs exklusiv in der Woche 2 exprimiert wurden und 527 miRNAs in der Woche 1 sowie in der Woche 2 exprimiert wurden. Anhand dieser Schritte wurden mehrere Datensätze miteinander verglichen.

Da innerhalb der gruppenspezifischen/kategorischen Auswertung (Grundfutter/Woche 1, konzentratreiches Futter/Woche 2, Kontrollgruppe, Gruppe mit phyto-genen Futtermittelzusatzstoffen) nicht jede miRNA bei jedem Tier einer bestimmten Kategorie exprimiert wurde, wurde jedes Mal vor einer Gegenüberstellung der Gruppen nur jene miRNAs ausgewählt, welche bei jedem Tier der Gruppe/Kategorie vorhanden waren, um die Aussagekraft des Ergebnisses zu verstärken. Die Bedingung für die Auswertung war also, dass jede miRNA mindestens zehn read counts aufweisen musste und innerhalb einer bestimmten Kategorie bei jeder Kuh exprimiert sein musste.

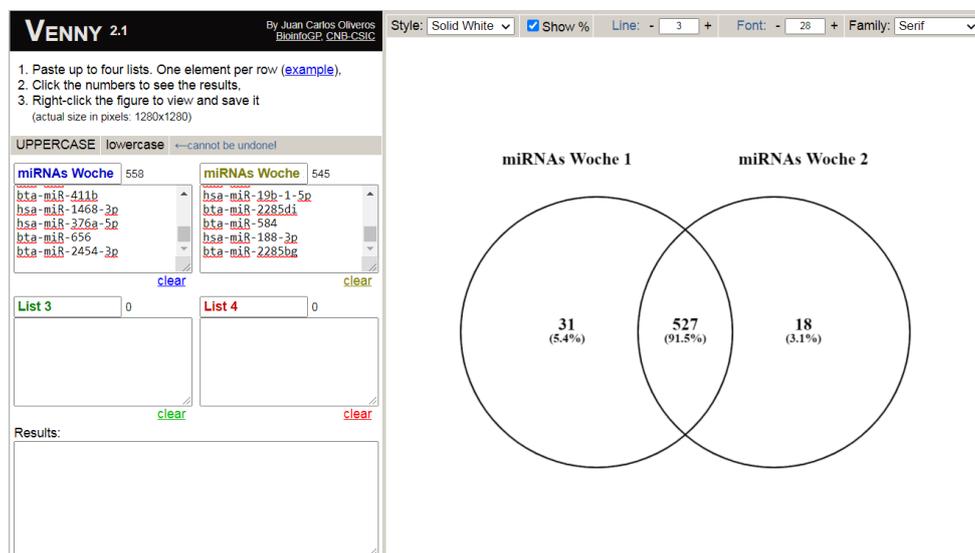


Abbildung 13: Verarbeitung der Daten im Onlineprogramm Venny 2.1.0

4. ERGEBNISSE

4.1 Quantitätskontrollen DeNovix Spectrophotometer

Vergleicht man die Ergebnisse der Woche 1 (Grundfütterration) und der Woche 2 (Konzentratreiche Ration) miteinander, wird ersichtlich, dass bei beiden Diäten bei jeder Probe der Peak der Wellenlänge bei 260 lag (Tabelle 2). In der Woche 1 lag der Blindwert (Blank) bei 0,040 ng/µl, in der Woche 2 bei -0,036 ng/µl. In den Proben von Bergrose, Narbe, Elfi, Edit, Newada und Elsa wurden quantitativ mehr miRNAs (ng/µl) in der Woche 1 als in der Woche 2 gefunden. Hingegen wurden bei Nelda, Banane und Ricky mehr miRNAs (ng/µl) in der SARA-Woche gefunden.

4.1.1 Ergebnisse der Woche 1

Blindwert (Blank) Woche 1: 0,040 ng/µl

Blindwert (Blank) Woche 2: -0,036 ng/µl

Tabelle 2: Ergebnisse der Quantitätskontrolle mittels DeNovix Spectrophotometer Run 2, Woche 1 und Woche 2. Hier wird der (gerundete) Mittelwert der beiden Messungen angegeben

Name	miRNA Konzentration (ng/µl) Woche 1	miRNA Konzentration (ng/µl) Woche 2	Peak (Wellenlänge)
Bergrose (A)	231,41	189,20	260
Nelda (B)	223,14	242,92	260
Banane (C)	294,50	302,10	260
Narbe (D)	388,96	233,00	260
Ricky (E)	417,22	423,37	260
Elfi (F)	322,26	188,33	260
Edit (G)	364,46	203,06	260
Newada (H)	414,24	292,50	260
Elsa (I)	356,67	301,26	260

4.2 MicroRNA Auswertung

4.2.1 Vergleich zwischen Fütterungs- und Behandlungsgruppen

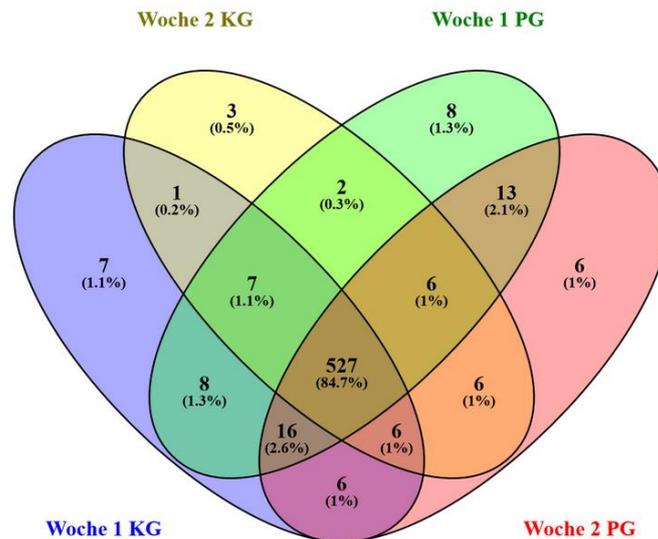


Abbildung 14: Venny-Diagramm des Vergleichs der Woche 1 der Kontrollgruppe (Woche 1 KG) vs. der Woche 2 der Kontrollgruppe (Woche 2 KG) vs. der Woche 1 der Gruppe mit phytoenen Zusatzstoffen (Woche 1 PG) vs. der Woche 2 der Gruppe mit phytoenen Zusatzstoffen (Woche 2 PG)

Insgesamt wurden 673 miRNAs exprimiert. Diese sind jedoch zum Teil nur in einzelnen Proben vorhanden und erfüllen somit nicht die Bedingung, dass alle miRNAs bei allen Proben innerhalb einer bestimmten Kategorie vorhanden sein müssen.

Es konnten 527 miRNAs gefunden werden, welche in allen Kategorien (Kontrollgruppe mit Grundfütterration, Kontrollgruppe mit Konzentratfutter, Gruppe mit phytoenen Zusatzstoffen mit Grundfütterration, Gruppe mit phytoenen Zusatzstoffen mit Konzentratfutter) exprimiert wurden. Das bedeutet, dass rund 85 % der miRNAs in allen Kategorien und allen Kühen gefunden werden konnten (Abbildung 14).

In der Tab. 3 werden MicroRNAs angeführt, welche rein nur mit der Grundfütterration und der Kontrollgruppe in Verbindung gebracht werden konnten. Sie wurden weder zu irgendeinem Zeitpunkt bei allen Kühen in der Gruppe mit phytoenem Zusatzstoff exprimiert, noch wurden sie in der Zeit, in der konzentratreich gefüttert wurde, bei allen Kühen der Kontrollgruppe exprimiert. Es handelt sich hierbei um sieben miRNAs (Abbildung 14).

Tabelle 3: miRNAs, welche nur innerhalb der Grundfutterwoche und gleichzeitig innerhalb der Kontrollgruppe vorkamen. Diese miRNAs konnten in der Gruppe mit phytoenen Zusatzstoffen zu keinem Zeitpunkt gefunden werden. Außerdem konnten sie nicht während der konzentratreichen Diät in der Kontrollgruppe gefunden werden

	Exklusive miRNAs (Grundfutter + Kontrollgruppe)
1	bta-miR-2285ag-3p
2	hsa-miR-204-3p
3	hsa-miR-92a-1-5p
4	bta-miR-2403
5	bta-miR-11990
6	bta-miR-6527
7	hsa-miR-138-2-3p

MicroRNAs, welche nur mit der konzentratreichen Diät und der Kontrollgruppe in Verbindung gebracht werden konnten, werden in der Tab. 4 aufgelistet. Diese drei MicroRNAs wurden weder zu irgendeinem Zeitpunkt bei allen Kühen in der Gruppe mit phytoenen Zusatzstoffen exprimiert, noch wurden sie während der Gabe von Grundfutter bei allen Kühen der Kontrollgruppe exprimiert (Abbildung 14).

Tabelle 4: miRNAs, welche nur während der konzentratreichen Diät und gleichzeitig innerhalb der Kontrollgruppe vorkamen. Sie wurden weder in der Gruppe mit phytoenem Zusatzstoff noch in der Kontrollgruppe während der Grundfütteration bei allen Kühen exprimiert.

	Exklusive miRNAs (Konzentratreiches Futter + Kontrollgruppe)
1	bta-miR-1291
2	bta-miR-2483-3p
3	bta-miR-2349

MicroRNAs, welche rein nur innerhalb der Konstellation Woche 1 und Gruppe mit phytoenem Futtermittelzusatzstoff exprimiert wurden, wurden in der Tab. 5 aufgelistet. Diese acht miRNAs wurden weder zu irgendeinem Zeitpunkt bei allen Kühen in der Kontrollgruppe exprimiert, noch wurden sie in der Woche 2 bei allen Kühen mit phytoenen Zusatzstoffen exprimiert (Abbildung 14).

Tabelle 5: miRNAs, welche nur während der Grundfutterfütterung und gleichzeitig innerhalb der Gruppe mit phyto-genen Zusatzstoffen vorkamen

	miRNAs (Grundfütterration + Gruppe mit phyto-genem Zusatzstoff)
1	bta-miR-11985
2	bta-miR-11982
3	bta-miR-10164-3p
4	bta-miR-2285v
5	bta-miR-2400
6	bta-miR-2425-5p
7	bta-miR-2285cu
8	bta-miR-2475

In Tab. 6 werden MicroRNAs angeführt, welche nur mit der Verfütterung der konzentratreichen Diät und gleichzeitig mit der Gruppe mit phyto-genem Futtermittelzusatzstoff in Verbindung gebracht werden konnten. Hierbei wurden sechs MicroRNAs gefunden, welche weder zu irgendeinem Zeitpunkt bei allen Kühen in der Kontrollgruppe exprimiert wurden, noch wurden sie während der Grundfutterfütterung bei allen Kühen mit phyto-genen Zusatzstoffen exprimiert (Abbildung 14).

Tabelle 6: miRNAs, welche nur während der konzentratreichen Fütterung und gleichzeitig innerhalb der Gruppe mit phyto-genen Zusatzstoffen vorkamen

	miRNAs (Konzentratreiche Diät + Gruppe mit phyto-genem Zusatzstoff)
1	bta-miR-2419-3p
2	bta-miR-2285at
3	bta-miR-2285cq
4	bta-miR-11984
5	bta-miR-12008
6	bta-miR-2313-3p

4.2.2 Vergleich der MicroRNA-Expression zwischen Grundfütterration und konzentratreicher Ration

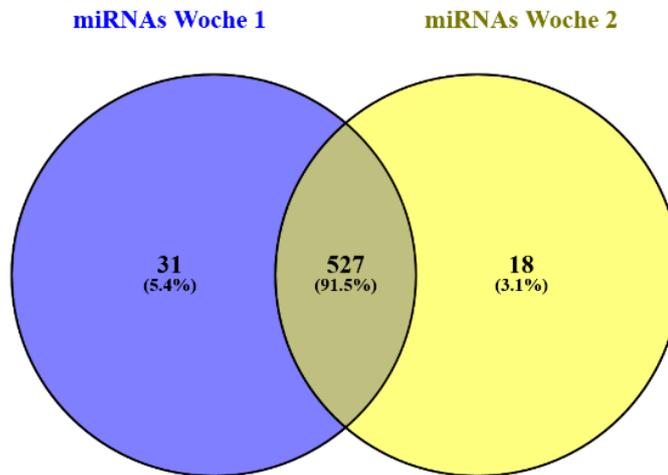


Abbildung 15: Venn-Diagramm des Vergleiches der MicroRNAs der Woche 1 und Woche 2, welche bei allen Kühen exprimiert wurden. In der Mitte des Diagramms werden jene miRNAs dargestellt, welche sowohl in der Woche 1 als auch in der Woche 2 vorhanden sind.

Hier wurden jene miRNAs, welche bei jeder Kuh während der Fütterung der Grundfütterration vorhanden waren mit jenen miRNAs, welche bei jeder Kuh während der konzentratreichen Fütterung exprimiert wurden, verglichen. Das heißt, die Bedingung war, dass jede dieser miRNAs bei jeder Kuh gleichzeitig und während der jeweiligen Diät vorhanden sein musste.

Somit wurde festgestellt, dass 527 miRNAs sowohl in Woche 1 (Grundfutter) als auch in Woche 2 (Konzentratfutter) bei allen neun Kühen exprimiert wurden (Abbildung 15). 31 miRNAs (Tabelle 7, linke Spalte) wurden exklusiv in der Woche 1, also während der Grundfutterfütterung, und gleichzeitig bei allen Tieren exprimiert. In der Woche 2 wurden 18 miRNAs (Tabelle 7, rechte Spalte) exklusiv exprimiert. Diese 18 MicroRNAs waren bei allen Kühen vorhanden und konnten nur mit der Woche, in welcher das Konzentratfutter gefüttert wurde, assoziiert werden.

Tabelle 7: links: Exklusiv exprimierte MicroRNAs während der Grundfutterfütterung, bei allen neun Tieren vorhanden; rechts: miRNAs nur in der Konzentratfütterwoche, aber bei jeder der neun Kühe gleichzeitig exprimiert

	Exklusive miRNAs während der Grundfütterration	Exklusive miRNAs während der konzentratreichen Ration
1	bta-miR-6516	hsa-miR-412-5p
2	bta-miR-10167-3p	bta-miR-2320-5p
3	bta-miR-2285cd	bta-miR-2474
4	bta-miR-2285ai-5p	hsa-miR-15a-3p
5	bta-miR-2284ac	bta-miR-2427
6	bta-miR-2316	bta-miR-431
7	bta-miR-449a	bta-miR-2285ar
8	bta-miR-2285au	bta-miR-2285bd
9	bta-miR-2339	bta-miR-9851
10	bta-miR-2440	bta-miR-411c-3p
11	bta-miR-154b	bta-miR-2483-5p
12	bta-miR-2285bz	bta-miR-545-3p
13	bta-miR-2382-3p	bta-miR-11971
14	bta-miR-33b	hsa-miR-19b-1-5p
15	bta-miR-487a	bta-miR-2285di
16	bta-miR-2431-3p	bta-miR-584
17	bta-miR-11974	hsa-miR-188-3p
18	bta-miR-323b-3p	bta-miR-2285bg
19	bta-miR-10162-5p	
20	bta-miR-7180	
21	bta-miR-2285be	
22	bta-miR-502b	
23	bta-miR-6536	
24	bta-miR-545-5p	
25	bta-miR-2320-3p	
26	bta-miR-665	
27	bta-miR-411b	
28	hsa-miR-1468-3p	
29	hsa-miR-376a-5p	
30	bta-miR-656	
31	bta-miR-2454-3p	

4.2.3 Vergleich der MicroRNA-Expression zwischen Kontroll- und Behandlungsgruppe

527 MicroRNAs wurden in der Kontrollgruppe und der Gruppe mit phytoenen Zusatzstoffen gleichzeitig und somit bei allen neun Kühen exprimiert (Abb. 16). Es wurden 14 MicroRNAs gefunden, welche nur der Kontrollgruppe zuzuschreiben sind (Tab. 8). Hingegen wurden 35 MicroRNAs gefunden, welche nur in der Gruppe mit phytoenen Zusatzstoffen exprimiert wurden (Tab. 9). Hierbei muss beachtet werden, dass in diesem Vergleich beide Wochen berücksichtigt worden sind. Somit lässt sich hiermit noch nicht sagen, welche der 14 bzw. 35 MicroRNAs während der Grundfütterration und welche während der konzentratreichen Ration exprimiert wurden.

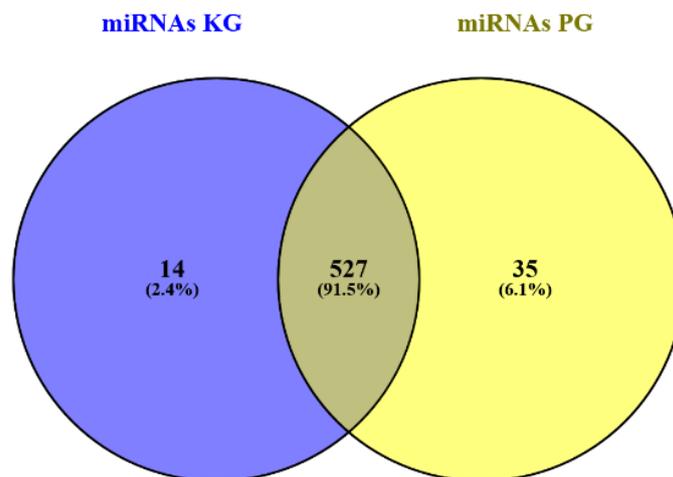


Abbildung 16: Venn-Diagramm des Vergleiches der MicroRNAs der Kontrollgruppe und der Gruppe mit phytoenen Zusatzstoffen, welche bei allen Kühen in der jeweiligen Gruppe exprimiert wurden. In der Mitte des Diagramms werden jene miRNAs dargestellt, welche in beiden Gruppen und somit bei allen neun Kühen vorhanden waren.. miRNAs KG sind jene miRNAs, welche exklusiv der Kontrollgruppe zuzuordnen waren. miRNAs PG sind miRNAs, welche exklusiv der Gruppe mit phytoenen Zusatzstoffen zuzuordnen waren.

4.2.3.1 MicroRNAs der Kontrollgruppe

In der Kontrollgruppe wurden insgesamt 541 miRNAs gefunden (Abbildung 16), welche bei allen Kühen der Kontrollgruppe exprimiert wurden. Hierbei wurden beide Diäten berücksichtigt.

EXKLUSIV EXPRIMIERTE MIRNAs DER KONTROLLGRUPPE

14 miRNAs wurden exklusiv der Kontrollgruppe zugeordnet (Tab. 8). Die Ergebnisse wurden ausgewertet, indem alle MicroRNAs der Kontrollgruppe, welche bei allen Kühen vorhanden sind, mit den MicroRNAs der Gruppe mit den phytoenen Zusatzstoffen, welche bei allen Kühen vorhanden sind, verglichen wurden. Hierbei war zu beachten, dass man bei diesem Vergleich jene MicroRNAs auswertet, welche zwar nur in der Kontrollgruppe vorhanden waren, diese 14 miRNAs aber sowohl in der Woche mit Grundfutterfütterung und/oder in der Woche mit konzentratreicher Fütterung vorkamen.

Tabelle 8: miRNAs, nur exprimiert in der Kontrollgruppe (während beider Diäten). Aufgelistete miRNAs fanden sich nicht in der Gruppe mit phytoenen Zusatzstoffen wieder

	Exklusiv exprimierte miRNAs der Kontrollgruppe während beider Diäten
1	bta-miR-2316
2	bta-miR-449a
3	bta-miR-2440
4	bta-miR-2474
5	hsa-miR-15a-3p
6	bta-miR-2431-3p
7	bta-miR-11974
8	bta-miR-2285ar
9	bta-miR-2285bd
10	bta-miR-9851
11	bta-miR-323b-3p
12	bta-miR-2285bb
13	bta-miR-545-3p
14	bta-miR-6536

Grundfütterration

Um herauszufinden, welche MicroRNAs während der Grundfütterration nur in der Kontrollgruppe exprimiert wurden, wurden alle MicroRNAs, die der Kontrollgruppe während der Grundfütterfütterung zuzuordnen waren und bei allen Kühen vorhanden waren, mit jenen MicroRNAs der Gruppe mit den phytoenen Zusatzstoffen mit den gleichen Bedingungen, verglichen (Abbildung 17).

20 miRNAs, die während der Grundfütterration nur von der Kontrollgruppe exprimiert wurden, wurden in der linken Spalte der Tab. S1 (siehe Anhang) angeführt und in der Abb. 17 graphisch dargestellt. Es gilt zu beachten, dass MicroRNAs dieser Spalte jedoch auch während der konzentratreichen Diät in der Kontrollgruppe vorkommen könnten, da hier nur der Vergleich der Kontrollgruppe und der Gruppe mit phytoenen Zusatzstoffen in Bezug auf die Grundfütterration aufgestellt wurde.

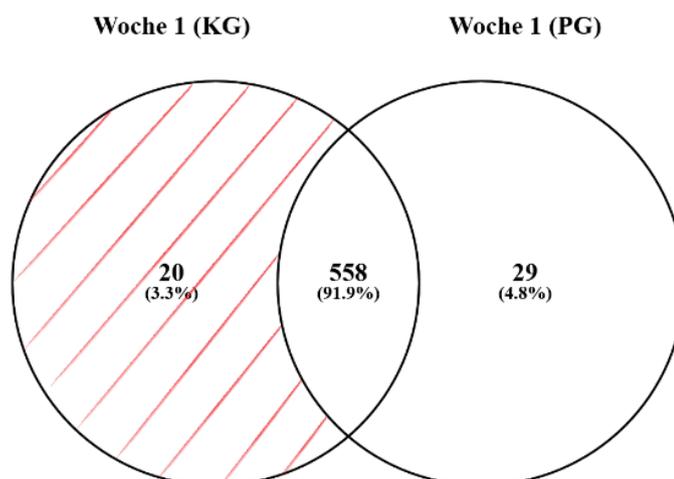


Abbildung 17: Venn-Diagramm des Vergleichs der miRNAs der Kontrollgruppe (KG) in Woche 1 und der Gruppe mit phytoenem Zusatzstoff (PG) in Woche 1 mit Fokus auf die Kontrollgruppe. Die schraffierte Fläche stellt jene 20 miRNAs dar, welche innerhalb der Woche 1 nur in der Kontrollgruppe exprimiert wurden.

Konzentratreiche Ration

Jene 13 MicroRNAs, welche während der konzentratreichen Fütterung nur der Kontrollgruppe und nicht der Gruppe mit phytoenen Zusatzstoffen zuzuordnen waren, sind in der Tab. S1 in der rechten Spalte (siehe Anhang) angeführt und in der Abb. 18 graphisch dargestellt. Die MicroRNAs dieser Spalte könnten jedoch auch von der Kontrollgruppe während der Grundfütterration exprimiert worden sein, da hier nur der Vergleich zwischen beiden Gruppen aufgestellt wurde.

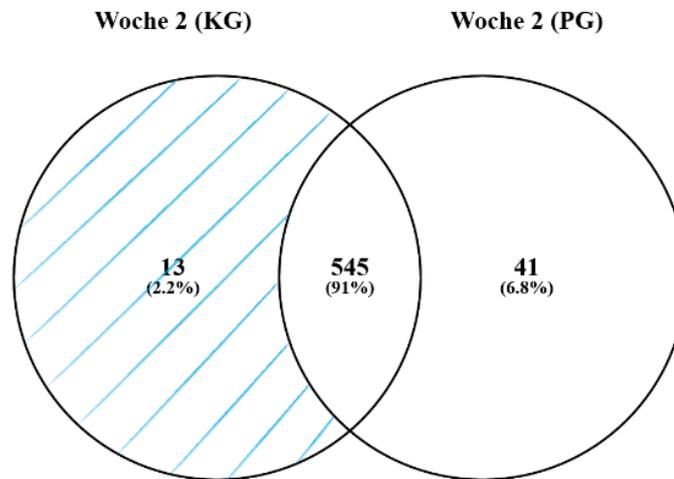


Abbildung 18: Venn-Diagramm des Vergleichs der miRNAs der Kontrollgruppe (KG) in Woche 2 und der Gruppe mit phytohemem Zusatzstoff (PG) in Woche 2 mit Fokus auf die Kontrollgruppe. Die schraffierte Fläche stellt jene 13 miRNAs dar, welche innerhalb der Woche 2 (konzentratreiche Ration) nur in der Kontrollgruppe exprimiert wurden. Diese finden sich in der Tab. S1, in der rechten Spalte wieder.

VERGLEICH ZWISCHEN GRUNDFUTTERRATION UND KONZENTRATREICHER RATION

Hier wurden jene MicroRNAs miteinander verglichen, welche in der Kontrollgruppe während der Grundfutterfütterung exprimiert wurden und welche während der konzentratreichen Diät. Es wurde wieder darauf geachtet, nur jene MicroRNAs miteinzubeziehen, welche bei allen Kühen der Kontrollgruppe innerhalb der jeweiligen Wochen vorhanden waren.

541 miRNAs waren sowohl in der Woche 1 als auch in der Woche 2, also in beiden Rationen, vorhanden (Abb. 19). 37 miRNAs kamen nur während der Grundfütterration (siehe Tabelle S2 „Grundfütterration“ im Anhang) und 17 miRNAs nur während der Konzentratfütterung (siehe Tabelle S2 „konzentratreiche Ration“ im Anhang) vor. Dabei ist zu beachten, dass diese MicroRNAs nicht nur in der Kontrollgruppe vorkamen. Da hier nur die Kontrollgruppe während der Grundfütterration und die Kontrollgruppe während der konzentratreichen Ration verglichen wurde, können auch miRNAs vorhanden sein, welche in der Gruppe mit phytohemem Zusatzstoffen exprimiert wurden.

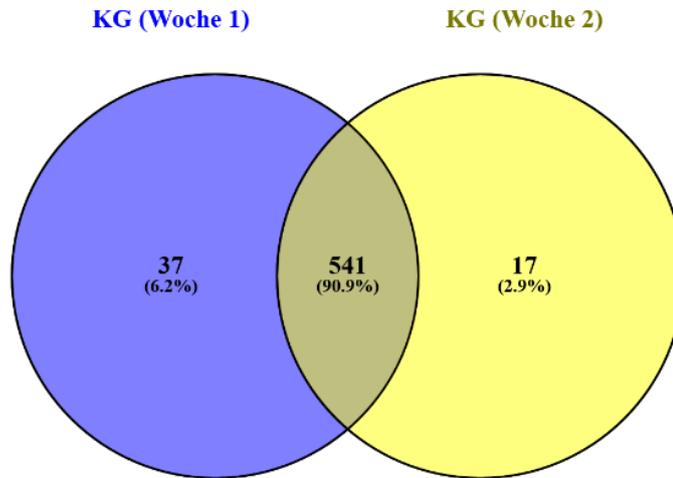


Abbildung 19: Venn-Diagramm des Vergleiches der MicroRNAs der Kontrollgruppe (KG) zwischen der Woche 1 und Woche 2.

4.2.3.2 MicroRNAs der Gruppe mit phytoenen Zusatzstoffen

In der Gruppe mit phytoenen Zusatzstoffen wurden insgesamt 562 miRNAs gefunden (Abb. 16), welche in allen Kühen dieser Gruppe exprimiert wurden. Hierbei wurden beide Diäten berücksichtigt.

EXKLUSIV EXPRIMIERTE MIRNAs DER GRUPPE MIT PHYTOGENEN ZUSATZSTOFFEN

35 miRNAs wurden exklusiv der Gruppe mit phytoenen Futtermittelzusatzstoffen zugeordnet (Tab. 9). Diese exklusiv exprimierten MicroRNAs wurden ausgewertet, indem alle MicroRNAs dieser Gruppe, welche bei allen Kühen vorhanden waren, mit den MicroRNAs der Kontrollgruppe, welche bei allen Kühen vorhanden waren, verglichen wurden. Hierbei ist zu beachten, dass man bei diesem Vergleich jene MicroRNAs ausgewertet hat, welche zwar nur in der Gruppe mit phytoenen Zusatzstoffen vorhanden waren, diese 35 miRNAs aber sowohl während der Grundfutterfütterung und/oder während der konzentratreichen Fütterung vorkamen.

Tabelle 9: MiRNAs, welche nur in der Gruppe mit phytoenen Zusatzstoffen exprimiert wurden. Vergleich aller miRNAs beider Wochen der Kontrollgruppe und alle miRNAs beider Wochen der Gruppe mit phytoenen Zusatzstoffen. Aufgelistete miRNAs wurden nicht in der Kontrollgruppe gefunden.

	Exklusive miRNAs der Gruppe mit dem phytoenem Futtermittelzusatzstoff während beider Diäten
1	bta-miR-6516
2	bta-miR-10167-3p
3	hsa-miR-412-5p
4	bta-miR-2285cd
5	bta-miR-2285ai-5p
6	bta-miR-2284ac
7	bta-miR-2285au
8	bta-miR-2339
9	bta-miR-2320-5p
10	bta-miR-154b
11	bta-miR-2285bz
12	bta-miR-2382-3p
13	bta-miR-33b
14	bta-miR-487a
15	bta-miR-2427
16	bta-miR-431
17	bta-miR-7180
18	bta-miR-11975
19	bta-miR-11976
20	bta-miR-411c-3p
21	bta-miR-6122-3p
22	bta-miR-502b
23	hsa-miR-376a-3p
24	bta-miR-376a
25	bta-miR-191b
26	bta-miR-2285ac
27	bta-miR-545-5p
28	bta-miR-2285bx
29	bta-miR-584
30	bta-miR-665
31	bta-miR-376b

32	bta-miR-2397-5p
33	bta-miR-2285ak-5p
34	bta-miR-2285bu
35	bta-miR-2457

Grundfütterration

Um herauszufinden, welche MicroRNAs während der Grundfütterration nur in dieser Gruppe exprimiert wurden, wurden alle MicroRNAs der Gruppe mit den phytoenen Zusatzstoffen mit der Grundfütterfütterung, welche bei allen Kühen vorhanden waren, mit jenen MicroRNAs der Kontrollgruppe mit Grundfütterfütterung, welche bei allen Kühen vorhanden waren, verglichen. Jene miRNAs, welche nur von der Gruppe mit phytoenen Zusatzstoffen während der Grundfütterfütterung exprimiert wurden, werden in der linken Spalte der Tabelle S3 (siehe Anhang) angeführt und in der Abb. 20 graphisch dargestellt. Hierbei handelte es sich um 29 miRNAs.

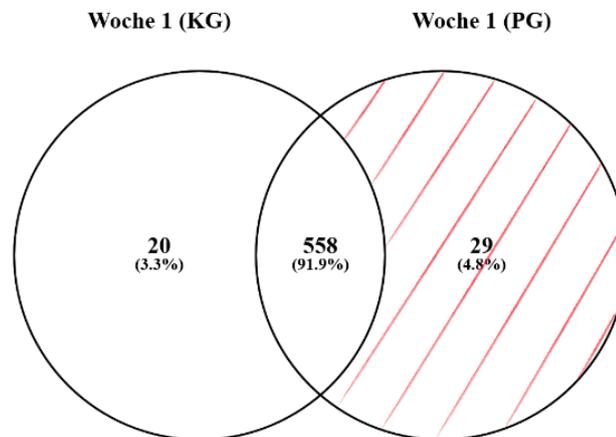


Abbildung 20: Vergleich der miRNAs der Kontrollgruppe (KG) in Woche 1 und der Gruppe mit phytoenem Zusatz (PG) in Woche 1 mit Fokus auf die Gruppe mit phytoenem Futtermittelzusatzstoff. Die schraffierte Fläche stellt jene 29 miRNAs dar, welche innerhalb der Woche 1 nur in der Gruppe mit phytoenem Futtermittelzusatzstoff exprimiert wurden.

Konzentratreiche Ration

Jene 41 MicroRNAs, welche nur der Gruppe mit phytoenen Zusatzstoffen während der konzentratreichen Diät zuzuordnen waren, wurden in der Tabelle S3 in der rechten Spalte (siehe Anhang) angeführt und in der Abb. 21 graphisch dargestellt.

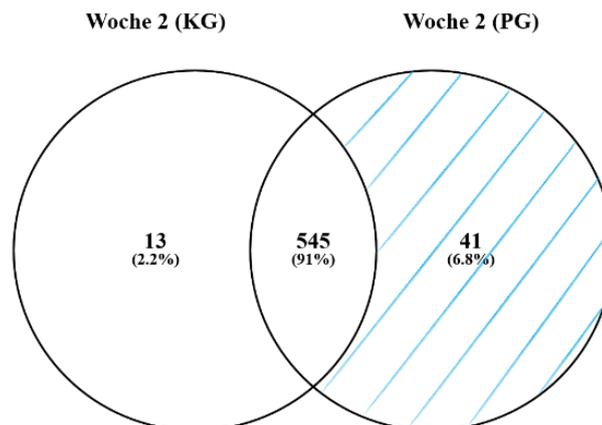


Abbildung 21: Vergleich der miRNAs der Kontrollgruppe (KG) in Woche 2 und der Gruppe mit phytoenem Futtermittelzusatzstoff (PG) während der konzentratreichen Diät mit Fokus auf die Gruppe mit phytoenem Futtermittelzusatzstoff. Die schraffierte Fläche stellt jene 41 miRNAs dar, welche innerhalb der Woche 2 nur in der Gruppe mit phytoenem Futtermittelzusatzstoff exprimiert wurden.

VERGLEICH ZWISCHEN GRUNDFUTTERRATION UND KONZENTRATREICHER RATION

Hier wurden MicroRNAs ausgewertet, welche in der Gruppe mit den phytoenen Zusatzstoffen während der Woche, in welcher das Grundfutter gefüttert wurde, exprimiert worden sind und welche in jener Woche, in welcher die konzentratreiche Diät gefüttert wurde. Es wurde darauf geachtet, nur jene MicroRNAs einzubeziehen, welche bei allen Kühen innerhalb der jeweiligen Wochen vorhanden waren.

562 MicroRNAs wurden von allen Kühen der Gruppe sowohl während der Grundfutterfütterung als auch während der konzentratreichen Fütterung exprimiert (Abb. 22). 25 MicroRNAs kamen nur während der ersten Woche bei allen Kühen der Gruppe vor (siehe Anhang, Tab. S4, linke Spalte). 24 MicroRNAs wurden nur während der zweiten Woche exprimiert (siehe Anhang, Tab. S4, rechte Spalte). Zu beachten ist dabei jedoch, dass diese MicroRNAs nicht nur in der Gruppe mit phytoenen Zusatzstoffen vorkamen. Da hier nur beide Diäten innerhalb der Gruppe verglichen wurde, könnten auch miRNAs vorhanden sein, welche in der Kontrollgruppe exprimiert wurden.

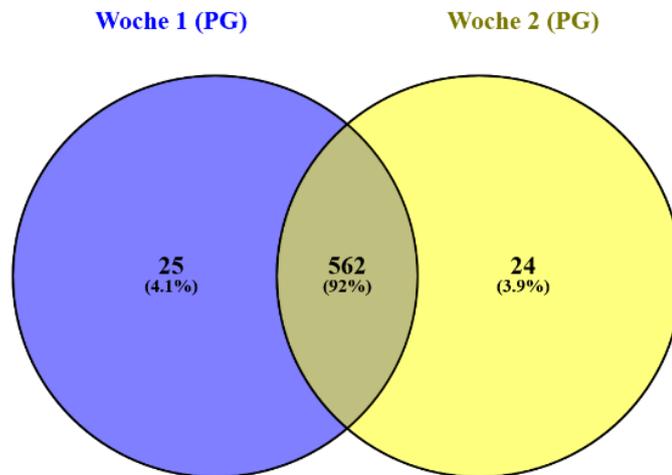


Abbildung 22: Venn-Diagramm des Vergleichs der MicroRNAs der Gruppe mit phytohemem Futtermittelzusatzstoff (PG) zwischen beiden Diäten (Woche 1 = Grundfutterfütterung; Woche 2 = konzentratreiche Fütterung)

4.2.4 Top fünf der am meist exprimierten MicroRNAs pro Kuh

Nachfolgend wurde für jede Kuh eine eigene Tabelle angeführt, welche jeweils fünf MicroRNAs enthält (Tab. 10-18). Diese fünf MicroRNAs wurden beim jeweiligen Tier am häufigsten exprimiert. Sie wurden in absteigender Reihenfolge sortiert.

Generell wurde beobachtet, dass bta-miR-21-5p, bta-miR-143 und bta-miR-24-3p bei jeder Kuh, außer bei Nelda Woche 1, Banane Woche 2 und Newada Woche 2, während beider Diäten an der Spitze standen. Bta-miR-21-5p ist jene MicroRNA, welche bei jeder Kuh, außer bei Nelda Woche 1, die meisten read counts aufwies. Bta-miR-143 wurde in jeder Probe, abgesehen von der Probe von Nelda Woche 1, am zweithäufigsten exprimiert.

Bergrose und Elsa wiesen in der Woche mit Grundfutter-Fütterung und in der Woche mit Konzentratfutter-Fütterung bei vier dieser MicroRNAs eine gleiche Reihung auf. Narbe und Edit wiesen während beider Diäten bei allen fünf MicroRNAs die gleiche Reihung auf. Die gleiche Reihung wie in Tab. 13 (Narbe) und Tab. 16 (Edit) (bta-miR-21-5p, bta-miR-143, bta-miR-24-3p, bta-miR-26a und hsa-miR-26a-5p) kann auch bei Nelda während der konzentratreichen Diät und bei Banane, Elfi und Newada während der Grundfütterung beobachtet werden.

Tabelle 10: Die fünf meist exprimierten miRNAs bei Bergrose

Bergrose		
Reihung	Grundfütterration	Konzentratreiche Ration
1	bta-miR-21-5p	bta-miR-21-5p
2	bta-miR-143	bta-miR-143
3	bta-miR-24-3p	bta-miR-24-3p
4	bta-miR-27b	bta-miR-27b
5	bta-let-7a-5p	bta-miR-26a

Tabelle 11: Die fünf meist exprimierten miRNAs bei Nelda

Nelda		
Reihung	Grundfütterration	Konzentratreiche Ration
1	bta-miR-143	bta-miR-21-5p
2	bta-miR-21-5p	bta-miR-143
3	bta-miR-26a	bta-miR-24-3p
4	hsa-miR-26a-5p	bta-miR-26a
5	bta-miR-27b	hsa-miR-26a-5p

Tabelle 12: Die fünf meist exprimierten miRNAs bei Banane

Banane		
Reihung	Grundfütterration	Konzentratreiche Ration
1	bta-miR-21-5p	bta-miR-21-5p
2	bta-miR-143	bta-miR-143
3	bta-miR-24-3p	bta-miR-26a
4	bta-miR-26a	hsa-miR-26a-5p
5	hsa-miR-26a-5p	bta-miR-24-3p

Tabelle 13: Die fünf meist exprimierten miRNAs bei Narbe

Narbe		
Reihung	Grundfütterration	Konzentratreiche Ration
1	bta-miR-21-5p	bta-miR-21-5p
2	bta-miR-143	bta-miR-143
3	bta-miR-24-3p	bta-miR-24-3p
4	bta-miR-26a	bta-miR-26a

5	hsa-miR-26a-5p	hsa-miR-26a-5p
----------	----------------	----------------

Table 14: Die fünf meist exprimierten miRNAs bei Ricky

	Ricky	
Reihung	Grundfutterration	Konzentratreiche Ration
1	bta-miR-21-5p	bta-miR-21-5p
2	bta-miR-143	bta-miR-143
3	bta-miR-24-3p	bta-miR-24-3p
4	bta-miR-27b	bta-let-7a-5p
5	bta-let-7a-5p	bta-miR-27b

Table 15: Die fünf meist exprimierten miRNAs bei Elfi

	Elfi	
Reihung	Grundfutterration	Konzentratreiche Ration
1	bta-miR-21-5p	bta-miR-21-5p
2	bta-miR-143	bta-miR-143
3	bta-miR-24-3p	bta-miR-24-3p
4	bta-miR-26a	bta-miR-27b
5	hsa-miR-26a-5p	bta-miR-26a

Table 16: Die fünf meist exprimierten miRNAs bei Edit

	Edit	
Reihung	Grundfutterration	Konzentratreiche Ration
1	bta-miR-21-5p	bta-miR-21-5p
2	bta-miR-143	bta-miR-143
3	bta-miR-24-3p	bta-miR-24-3p
4	bta-miR-26a	bta-miR-26a
5	hsa-miR-26a-5p	hsa-miR-26a-5p

Table 17: Die fünf meist exprimierten miRNAs bei Newada

	Newada	
Reihung	Grundfutterration	Konzentratreiche Ration
1	bta-miR-21-5p	bta-miR-21-5p
2	bta-miR-143	bta-miR-143

3	bta-miR-24-3p	bta-let-7a-5p
4	bta-miR-26a	bta-miR-24-3p
5	hsa-miR-26a-5p	bta-miR-27b

Tabelle 18: Die fünf meist exprimierten miRNAs bei Elsa

Reihung	Elsa	
	Grundfuttermation	Konzentratreiche Ration
1	bta-miR-21-5p	bta-miR-21-5p
2	bta-miR-143	bta-miR-143
3	bta-miR-24-3p	bta-miR-24-3p
4	bta-let-7a-5p	bta-let-7a-5p
5	bta-miR-26a	bta-miR-27b

4.2.5 Top zehn der am meist exprimierten MicroRNAs in allen Kühen

Wenn die MicroRNAs aller Kühe anhand ihrer read counts in absteigender Reihenfolge geordnet werden, wird deutlich, dass bta-miR-21-5p, bta-miR-143 und bta-miR-24-3p am häufigsten exprimiert wurden (Tab. 19). Die MicroRNAs bta-miR-26a, hsa-miR-26a-5p und bta-miR-27b sind bei beiden Diäten und Gruppen unterschiedlich gereiht. Bta-let-7a-5p, bta-let-7f, hsa-let-7f-5p und bta-miR-205 weisen bei beiden Diäten und Gruppen die gleiche Reihung auf.

Tabelle 19: Die zehn am meist exprimierten miRNAs aller Kühe während beider Diäten gemeinsam, nur während der Fütterung von Grundfutter, sowie während der Fütterung von konzentratreichem Futter, der Kontrollgruppe und der Gruppe mit phytoogenem Futtermittelzusatzstoff in absteigender Reihenfolge sortiert

	miRNAs beide Diäten	Read counts	miRNAs Grundfutter	Read counts	miRNAs konzentrat- reiches Futter	Read counts	miRNAs Kontroll- gruppe	Read counts	miRNAs Gruppe mit phytoogenem Zusatzstoff	Read counts
1	bta-miR-21-5p	39.198.859	bta-miR-21-5p	21.274.456	bta-miR-21-5p	17.924.403	bta-miR-21-5p	22.168.290	bta-miR-21-5p	17.030.569
2	bta-miR-143	23.180.155	bta-miR-143	14.230.185	bta-miR-143	8.949.970	bta-miR-143	14.693.730	bta-miR-143	8.486.425
3	bta-miR-24-3p	10.520.611	bta-miR-24-3p	5.407.564	bta-miR-24-3p	5.113.047	bta-miR-24-3p	6.063.643	bta-miR-24-3p	4.456.968
4	bta-miR-26a	8.206.654	bta-miR-26a	4.333.441	bta-miR-27b	3.877.164	bta-miR-26a	5.050.403	bta-miR-27b	3.206.361
5	hsa-miR-26a-5p	8.206.654	hsa-miR-26a-5p	4.333.441	bta-miR-26a	3.873.213	hsa-miR-26a-5p	5.050.403	bta-miR-26a	3.156.251
6	bta-miR-27b	7.987.602	bta-miR-27b	4.110.438	hsa-miR-26a-5p	3.873.213	bta-miR-27b	4.781.241	hsa-miR-26a-5p	3.156.251
7	bta-let-7a-5p	7.128.843	bta-let-7a-5p	3.754.356	bta-let-7a-5p	3.374.487	bta-let-7a-5p	4.074.143	bta-let-7a-5p	3.054.700
8	bta-let-7f	5.835.833	bta-let-7f	3.041.584	bta-let-7f	2.794.249	bta-let-7f	3.382.034	bta-let-7f	2.453.799
9	hsa-let-7f-5p	5.835.833	hsa-let-7f-5p	3.041.584	hsa-let-7f-5p	2.794.249	hsa-let-7f-5p	3.382.034	hsa-let-7f-5p	2.453.799
10	bta-miR-205	4.929.665	bta-miR-205	2.571.399	bta-miR-205	2.358.266	bta-miR-205	2.969.337	bta-miR-205	1.960.328

5. DISKUSSION

Ziel dieser Arbeit war es, i.) miRNAs in Pansenpapillen nachzuweisen und ii.) zu identifizieren, ob phyto gene Futtermittelzusatzstoffe in der Ration und/oder iii.) eine konzentratreiche, faserarme Fütterung das Expressionsprofil der miRNAs verändern.

5.1 RNA-Isolation und Quantitätsbestimmung

Das Ziel MicroRNAs aus Pansenpapillen zu isolieren konnte erreicht werden. Während dieser Arbeit wurden jedoch bei der Isolation von kleinen RNA Molekülen teilweise Abänderungen des mitgelieferten Originalprotokolls des NucleoSpin® miRNA-Kit von Macherey-Nagel vorgenommen, um Reinheit und Ausbeute zu erhöhen. Bevor die Proben für die miRNA-Sequenzierung versendet wurden, wurde eine Quantitätsbestimmung mittels Spectrophotometrie vor Ort durchgeführt, um die Gewissheit zu haben, dass in den Proben RNA in ausreichender Quantität und Qualität enthalten war. In der Woche, in der die Grundfutterration gefüttert wurde, wurden im Durchschnitt 334,761 ng/µl bzw. mindestens 223,139 ng/µl und in der Woche, in der das konzentratreiche Futter gefüttert wurde, wurden durchschnittlich 263,969 ng/µl bzw. mindestens 188,329 ng/µl RNA gefunden. Die Berechnung der RNA-Konzentration basiert auf der Absorption bei 260 nm (Okamoto und Okabe 2000). Ein Wellenlängenpeak bei 230 nm spricht für organische Substanzen, einer bei 280 nm für Proteine und Phenole (Armbrecht 2013). Die Ergebnisse zeigen, dass der Peak der Wellenlänge jeder Probe bei 260 nm lag, was für die Detektion von RNAs spricht. Dazu kommt, dass der Absorptionsverlauf der Proben dem von Nukleinsäure-Proben (Armbrecht 2013) glich.

5.2 MicroRNA-Auswertung

Insgesamt konnten 673 miRNAs gefunden werden. Davon wurden 433 miRNAs mit einer höheren Zahl während der Fütterung von Grundfutter als während der Fütterung von konzentratreichem und faserarmen Futter exprimiert. 236 miRNAs wiesen eine höhere Anzahl an read counts in der Woche mit Konzentratfutter auf. Vier miRNAs wurden während beider Diäten gleichermaßen exprimiert. Diese können somit als ernährungsunspezifisch verstanden werden.

5.2.1 *Micro-RNA-Auswertung in Bezug auf die zwei unterschiedlichen Diäten*

In der vorliegenden Arbeit konnten 527 miRNAs gefunden werden, welche sowohl während der Grundfütterration, als auch während der konzentratreichen Ration exprimiert wurden. Unter diesen könnten sich miRNAs befinden, welche als pansenspezifisch anzusehen sind. 31 miRNAs (Tab. 7) konnten nur im Zusammenhang mit der Grundfütterration identifiziert werden. Dies lässt vermuten, dass einige dieser miRNAs mit einem gesunden Pansen bzw. intakten Pansenpapillen in Verbindung gebracht werden können. 18 miRNAs (Tab. 7) wiederum waren nur während einer Konzentratfütterung, durch welche eine SARA induziert werden konnte, exprimiert. Diese miRNAs könnten für SARA spezifisch sein.

Sun und Kollegen fanden während ihrer Studie sechs pansenspezifische miRNAs (bta-miR-2285s, bta-miR-6527, bta-miR-1434-3p, bta-miR-2387, bta-miR-2344, and bta-miR-615) und eine pansen- und darmspezifische miRNA (bta-miR-184) (Sun, Hui-Zeng et al. 2019). Beinahe jede dieser miRNAs konnte auch in der vorliegenden Arbeit in den Pansenpapillen wiedergefunden werden: Die Familie bta-miR-2285 konnte zu jeder Zeit des Versuches im Pansengewebe nachgewiesen werden. Jedoch wurden unterschiedliche paraloge Sequenzen gefunden, welche nur unter einer bestimmten Bedingung exprimiert wurden. So wurden bta-miR-2285cd, bta-miR-2285ai-5p, bta-miR-2285au, bta-miR-2285bz, bta-miR-2285be nur während der Grundfütterration exprimiert. Bta-miR-2285ar, bta-miR-2285bd, bta-miR-2285di, bta-miR-2285bg wurden nur innerhalb der konzentratreichen Ration exprimiert. Bta-miR-6527 konnte nur im Zusammenhang mit der Grundfütterration und gleichzeitig der Kontrollgruppe in Verbindung gebracht werden. Diese miRNA könnte somit ein Marker für unbeeinflusste gesunde Pansenpapillen sein. Vier der von Sun und Kollegen (Sun, Hui-Zeng et al. 2019) erwähnten u.a. pansenspezifischen miRNAs (bta-miR-1434-3p, bta-miR-2387, bta-miR-2344 und bta-miR-184) wurden während der vorliegenden Studie zu jedem Zeitpunkt bei allen Kühen exprimiert. Lediglich bta-miR-615 konnte nicht gefunden werden. Zudem konnte in der vorliegenden Studie nicht bestätigt werden, dass die miRNAs bta-miR-483 leberspezifisch, bta-miR-376d milchdrüsenspezifisch und bta-miR-212 spezifisch für den unteren Verdauungstrakt sind (Sun, Hui-Zeng et al. 2019), da alle während des Versuches zu jeder Zeit bei allen Kühen und somit in allen Pansenpapillenproben vorlagen. Bta-miR-2454-3p, welche zwar als serumspezifisch klassifiziert wurde (Sun, Hui-Zeng et al. 2019), konnte in diesem Versuch im Pansengewebe in der Woche 1 (Grundfütterration) in der Kontroll- und Verumgruppe gefunden werden. Xue und Kollegen haben postuliert, dass bta-miR-128 einen Einfluss auf die Pansenentwicklung hat und von dem Verhältnis von Nicht-Faser-

Kohlenhydraten (NFC) und neutraler Detergenzfaser (NDF) abhängig ist (Xue et al. 2019). In der vorliegenden Studie war jedoch bta-miR-128 in jeder Pansenpapillenprobe exprimiert und schien nicht abhängig vom NFC/NDF Verhältnis zu sein.

In einer Studie von Zhong und Kollegen wurde die Pansenentwicklung von Ziegen anhand von miRNA-Expression in der embryonalen Pansenwand, vor und nach der Formation von Pansenpapillen, untersucht (Zhong et al. 2017). Das Vorkommen von miR-150, miR-182, miR-22-3p, miR-23a, miR-24-3p, miR-27a-3p, miR-34a, miR-504, miR-96, miR-21-5p, miR-26a-5p, let-7f-5p, let-7i-5p, let-7g-5p, let-7a-5p, miR-7-5p, miR-145-5p und miR-148a-3p in der Pansenwand von Ziegenembryonen und der von adulten Tieren unserer Studie könnte als eindeutiger Hinweis auf ihre Pansenspezifität verstanden werden.

Jene zuvor erwähnten 31 miRNAs, welche nur im Zusammenhang mit der Grundfütteration identifiziert werden konnten (Tab. 7), könnten eine spezielle Funktion in der Physiologie gesunder Pansenpapillen einnehmen. Hingegen könnten jene 18 miRNAs (Tab. 7), welche nur während der konzentratreichen Diät exprimiert wurden, für pathologische Prozesse im Zuge einer subakuten Pansenazidose verantwortlich sein bzw. als Biomarker für eine SARA fungieren. Einige der miRNAs aus der Tabelle 7 wurden bereits in anderen Studien beschrieben. So ist zum Beispiel miR-15a-3p dafür bekannt, die Apoptose in bestimmten Zelllinien zu induzieren (Druz et al. 2013). Das Vorkommen dieser miRNA während einer Erkrankung an subakuter Pansenazidose könnte für apoptotische Prozesse in der Pansenschleimhaut sprechen. Mir-431 wird häufig im Zusammenhang mit diversen Neoplasien gebracht, da sie zum Beispiel bei Pankreaskrebs zum einen die Zellproliferation hemmt und zum anderen Zellapoptose induziert (Yang et al. 2018), die Invasion von Darmkrebszellen (Su und Liu 2018) oder das Wachstum von Melanomen hemmt (Sun, Y-W et al. 2019). Bta-miR-411c-3p wurde in Kühen mit negativer Energiebilanz (Hailay et al. 2019), miR-2483-5p in Granulosazellen von Follikeln während der frühen Lutealphase (Salilew-Wondim et al. 2014) und im Duodenum bei Luzernenheu- und Maisstrohfütterung (Wang et al. 2016), bta-miR-584 in Eileiterepithelzellen (Mazzarella et al. 2021) und bta-miR-2285bg in bovinen Leberzellen (Mukiibi et al. 2020) exprimiert, während hsa-miR-19b-1-5p in der Humanmedizin mit Morbus Crohn in Verbindung gebracht wird (Ye et al. 2019). In einer Studie von Yang et al. wurde herausgefunden, dass eine Herunterregulation von miR-188-3p eine Oleat/Palminat-induzierte Steatose abschwächt (Yang et al. 2020). All diese MicroRNAs üben eine oder mehrere Funktionen aus. Um herauszufinden, welche Gene sie beeinflussen und

welcher genauen Funktion sie nachgehen, müssen weitere über diese Diplomarbeit hinausgehende Analysen wie zum Beispiel ein Target-Scan durchgeführt werden.

5.2.2 Micro-RNA-Auswertung unter Berücksichtigung des phylogenen Futtermittelzusatzstoffes

In der Kontrollgruppe wurde eine höhere Menge an MicroRNAs exprimiert (129.421.817 read counts) als während der Fütterung mit dem phylogenen Futtermittelzusatzstoff (88.811.514 read counts). In der behandelten Gruppe wurden insgesamt 562 miRNAs und in der Kontrollgruppe 541 miRNAs gefunden. Bei der Gegenüberstellung der Kontrollgruppe und der Gruppe mit phylogenen Futtermittelzusatzstoff wurden 527 miRNAs gefunden, welche innerhalb beider Gruppen exprimiert wurden (Abb. 16). Hierbei sei zu beachten, dass die Diät außer Acht gelassen wurde, um zu erkennen, welche miRNAs generell nur der jeweiligen Behandlungsgruppe zuzuschreiben sind. Es konnten 14 miRNAs (Tab. 8) exklusiv der Kontrollgruppe und 35 (Tab. 9) exklusiv der Verumgruppe zugeschrieben werden.

Jene 35 miRNAs, die exklusiv der Verumgruppe zugeschrieben werden können (Tab. 9), könnten mitverantwortlich dafür sein, wie phylogene Futtermittelzusatzstoffe auf den Pansen in Bezug auf Gesundheit und Krankheit wirken. Daher sind diese nicht nur für die Beantwortung der Fragestellung der vorliegenden Arbeit, sondern auch für die weitere Forschung von speziellem Interesse. Sie könnten der Beweis dafür sein, dass die Fütterung phylogener Futtermittelzusatzstoffe die Pansengesundheit positiv beeinflussen kann.

Einige dieser MicroRNAs, welche nur der Verumgruppe zuzuordnen sind, wurden bereits an anderen Stellen im Körper entdeckt. In einer Studie, in der Mammagewebe von Milchziegen untersucht wurde, fand man zum Beispiel heraus, dass bta-miR-6516, eine MicroRNA, welche in dieser Studie (unter Berücksichtigung der Bedingung, dass die verglichenen miRNAs bei allen Tieren der jeweiligen Gruppe vorhanden sein müssen) explizit nur innerhalb der behandelten Gruppe vorzufinden war, unter anderem die Gene *ERBB4* und *MED1* reguliert (Xuan et al. 2020). *ERBB4* ist eine Rezeptor-Tyrosinkinase und ein Mitglied der epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor-Unterfamilie (epidermal growth factor receptor, EGF-Rezeptor). *MED1* ist an der Transkriptionsregulation bei fast allen RNA-Polymerase II-abhängigen Genen beteiligt (Xuan et al. 2020). Auch im Zusammenhang mit einer Infektion des bovinen Mammagewebes mit *Streptococcus uberis* wurde diese MicroRNA (bta-miR-6516) gefunden (Lawless et al. 2013). Das Vorkommen von bta-miR-6516 in Gegenwart sowohl einer Mastitis

als auch im Pansen während der Fütterung mit einem phyto-genen Futtermittelzusatzstoff könnte darauf zurückzuführen sein, dass ähnliche Reaktionen im Gewebe ausgelöst werden können oder aber im Zusammenhang mit einer lokalen Abwehr des Körpers gegen pathologische Prozesse in Verbindung steht. Einige der miRNAs (bta-miR-2284ac, bta-miR-665, bta-miR-2382-3p, Bta-miR-431, bta-miR-411c-3p), welche hier nur innerhalb der Gruppe mit phyto-genem Futtermittelzusatzstoff bei allen Tieren exprimiert wurden, wurden bei Kühen auch in einer Studie über die metabolische Stresssituation *post partum* entdeckt (Hailay et al. 2019). Hierbei konnten bta-miR-2284ac, bta-miR-665 und bta-miR-2382-3p nur in Kühen nachgewiesen werden, welche zu jeder Zeit eine positive Energiebilanz aufwiesen. Bta-miR-431 und bta-miR-411c-3p hingegen nur bei Kühen mit negativer Energiebilanz. Bta-miR-2284ac, sowie bta-miR-2285ai-5p wurden in der bereits erwähnten Studie von Mukiibi und Kollegen in bovinem Lebergewebe nachgewiesen (Mukiibi et al. 2020).

Die ebenfalls im Zusammenhang mit den phyto-genen Futtermittelzusatzstoff stehende miRNA bta-miR-2320-5p konnte bereits in Bullensperma nachgewiesen und mit Fertilisation assoziiert werden (Shangguan et al. 2020). Dies kann jedoch nicht mit der vorliegenden Arbeit in Verbindung gebracht werden, da alle Kühe des Versuches weiblich und weder besamt, noch trächtig waren.

Einige miRNAs (miR-33b, miR-376a, miR-584, miR-665), welche in der vorliegenden Arbeit während der SARA-auslösenden Diät und/oder explizit nur während der Behandlung mit phyto-genem Futtermittelzusatzstoff gefunden werden konnten, wurden bereits in der Humanmedizin beschrieben. Man fand heraus, dass miR-33b durch HIF-1 α , ein Hypoxie-induzierter Faktor, die Zellproliferation und Glykolyse bei malignen Melanomen (Zhao et al. 2017), sowie die Ausbildung von Brustkrebs-Metastasen hemmt (Lin et al. 2015) und zusammenfassend gesagt als Tumorsuppressor agiert (Yin et al. 2016). Eine weitere, hier vorkommende MicroRNA, miR-376a, konnte als Tumorsuppressor bei Magenkrebs identifiziert werden (Wang et al. 2020). Die Expression von miR-584 und miR-665 werden ebenfalls damit in Zusammenhang gebracht (Ebrahimi Ghahnavieh et al. 2020, Li et al. 2017, Wu et al. 2020). So wird erwähnt, dass eine Überexpression von miR-584-5p, zum Beispiel, das Fortschreiten von Magenkrebs sowohl in vivo als auch in vitro unterdrückt (Li et al. 2017) bzw. als Biomarker für Magenkrebs angewandt werden könnte (Ebrahimi Ghahnavieh et al. 2020). Die Ergebnisse von Wu und Kollegen zeigen, dass auch miR-665 das Fortschreiten des Tumors hemmt und potentiell für eine therapeutische Zwecke eingesetzt werden kann (Wu et al. 2020). Da, wie bereits erwähnt, miR-33b, miR-376a, miR-584 und miR-665 in der vorliegenden Arbeit in der

Gruppe mit phytochemischem Futtermittelzusatzstoff nachgewiesen werden konnten, könnte man darauf schließen, dass der Futtermittelzusatzstoff die Ausbildung dieser unterstützt, um die Entartung der Pansenwand zu verhindern und somit positiv zur Pansengesundheit beiträgt.

Im Jahr 2019 untersuchten Putz und Kollegen das Mammagewebe trockenstehender Kühe und konnten dort die MicroRNAs bta-miR-7180 und bta-miR-11975 detektieren (Putz et al. 2019). Diese miRNAs konnten bei uns im Zusammenhang mit dem phytochemischen Futtermittelzusatzstoff gefunden werden. Da in der vorliegenden Studie allerdings beide Gruppen trockenstehend waren, könnte das Vorfinden der erwähnten miRNAs damit erklärt werden, dass die Tiere in dem Versuch von Putz und Kollegen ähnliche Futtermittelkomponenten vorgelegt bekamen und die miRNAs dadurch in verschiedenen/mehreren Geweben vorzufinden sind. Um dies sicher bestätigen zu können, hätten weitere Proben von diversen Geweben entnommen werden müssen. Die MicroRNA bta-miR-2457 wird von Sun und Kollegen spezifisch für Blut genannt (Sun, Hui-Zeng et al. 2019). Diese Aussage kann hier nicht unterstützt werden, da bta-miR-2457 in der vorliegenden Arbeit in Pansenpapillen exprimiert wurde. Bta-miR-11975 und bta-miR-11976 wurden innerhalb einer Studie von Morenikeji und Kollegen exprimiert, welche sich mit der Immunantwort bei boviner Coronavirusinfektion beschäftigt (Morenikeji et al. 2020). Sie sind in der Lage die Gene CEBPB, SRC, and TLR9 anzuvisieren. TLR9, zum Beispiel, ist von zentraler Bedeutung für Immunsystemreaktionen (Morenikeji et al. 2020). Beide dieser MicroRNAs wurden innerhalb jener Gruppe exprimiert, welche die phytochemischen Futtermittelzusatzstoffe zugefüttert bekommen haben. Daraus könnte man ableiten, dass die Zusatzstoffe im Falle einer Erkrankung das Immunsystem stimulieren können.

Den Ergebnissen kann entnommen werden, dass phytochemische Futtermittelzusatzstoffe das Potential besitzen einen Einfluss auf das Expressionsprofil von miRNAs haben.

5.2.3 MicroRNA-Auswertung in Bezug auf die meist exprimierten MicroRNAs

Die Ergebnisse der Top fünf der am meist exprimierten MicroRNAs pro Kuh spiegeln zwar die Detektion von miRNAs in den Pansenpapillenproben wider, sind jedoch für die Beantwortung der Fragestellung zur Veränderung des Expressionsprofils der miRNAs durch Futtermittel von keiner Relevanz. Deswegen wird hier nicht weiter darauf eingegangen.

Die zehn meist exprimierten miRNAs über alle Kühe waren bta-miR-21-5p, bta-miR-143, bta-miR-24-3p, bta-miR-26a, hsa-miR-26a-5p, bta-miR-27b, bta-let-7a-5p, bta-let-7f, hsa-let-7f-5p

und bta-miR-205 (Tab. 19). Daher können diese miRNAs auch als hoch-exprimierte Core miRNAs für die untersuchte Population bezeichnet werden. Die MicroRNAs bta-miR-21-5p, bta-miR-143, bta-miR-24-3p, bta-miR-26a, bta-miR-26a-5p, bta-let-7a-5p, bta-let-7f, hsa-let-7f-5p und bta-miR-205 hatten während der Grundfütterration eine höhere Zahl an read counts als in der Woche mit durch konzentratreichem Futter herbeigeführter SARA. Man geht davon aus, dass miR-26a, wie auch bta-miR-143, miR-29b, miR-145, miR-493 und Mitglieder der miR-199 Familie eine Schlüsselrolle in der Pansenentwicklung von Kälbern einnehmen (Do et al. 2019). Die anderen an dieser Stelle von Do und Kollegen (2019) erwähnten miRNAs (bta-miR-143, miR-29b, miR-145, miR-493 und Mitglieder der miR-199 Familie) wurden im Übrigen zu jeder Zeit während des vorliegenden Versuchs exprimiert und zeigten alle, außer miR-493, während der Grundfütterfütterung eine höhere Anzahl an read counts. Auch Liang et al. fanden bereits miR-143 und miR-205 in hoher Zahl in Pansengewebe exprimiert (Liang et al. 2014). Sie kommen zu dem Entschluss, dass miR-143 eine funktionale Bedeutung in der Differenzierung von Bindegewebe hat und miR-205 die Proliferation von Zellen für die Entwicklung des Pansens reguliert. MiR-26a konnte beim Rind bereits in Leber, Gehirn, Lunge und im Herzen (Long und Chen 2009), sowie in embryonalem Gewebe, Thymus, Dünndarm und Lymphknoten (Coutinho et al. 2007) detektiert werden. Zudem war miR-26a in all diesen Geweben am häufigsten vorzufinden. In der Hitzestressstudie von Li und Kollegen war bta-miR-26a eine der am meist exprimierten miRNAs (Li et al. 2018). Auch die Beprobung der Kühe der vorliegenden Studie fand an heißen Sommertagen statt. In der Humanmedizin fand man heraus, dass miR-26a eine wichtige Rolle bei der Bildung von Fibrin einnimmt. Eine Überexpression verhindert die Fibronogenese, in dem es die Genexpression des Bindegewebswachstumsfaktor und die Kollagenproduktion unterdrückt. Somit ist miR-26a eine der wichtigsten miRNAs, die eine anti-fibrotische Eigenschaft aufweisen (Neudecker et al. 2017). Die eng verwandte miRNA miR-26a-5p, die in der vorliegenden Arbeit ebenfalls unter den Top zehn fällt, konnte mit der Zellproliferation in Verbindung gebracht werden (Guo et al. 2016).

Bta-miR-21-5p wurde bereits in embryonalem Gewebe, Thymus, Dünndarm und Lymphknoten (mesenteriale und abomasale Lymphknoten) gefunden (Coutinho et al. 2007). Zudem ist miR-21 bekannt dafür, unter der Anwesenheit diverser Tumoren (Chan et al. 2008, Iorio et al. 2007, Meng et al. 2007) oder auch bei Herzmuskelhypertrophie (Cheng et al. 2007, Tatsuguchi et al. 2007) zu steigen. Daher konkludieren Kim und Kollegen, dass miR-21 die Zellproliferation fördert und die Dedifferenzierung von Zellen induziert (Kim et al. 2009). Da bei SARA der

Anstieg der kurzkettigen Fettsäuren im Pansen eine Proliferation des Panseneithels induziert, würde man annehmen, dass miR-21 unter konzentratreicher Fütterung steigen würde. In der vorliegenden Arbeit ist jedoch eine Abnahme erkennbar. Daher wird davon ausgegangen, dass miR-21 im Normalgewebe eine andere Funktion hat. 2018 fanden Li und Kollegen bei ihrem Versuch mit bovinem Milchdrüsengewebe heraus, dass die Expression von bta-miR-21-5p bei Hitzestress abnimmt (Li et al. 2018). Obwohl in der erwähnten Studie die miRNA aus Milchdrüsengewebe isoliert wurde, könnte Hitzestress eine Erklärung für den Abstieg unter konzentriertem Futter sein. Neben bta-miR-21-5p zählen auch bta-let-7a-5p und bta-miR-26a in der Hitzestressstudie von Li und Kollegen zu den am meist exprimierten miRNAs (Li et al. 2018).

Bta-miR-24-3p wird mit Präadipozyten und der Adipogenese in Verbindung gebracht (Yu et al. 2020). Sie spielt außerdem eine Rolle im fetalen Skelettmuskel. Hu und Kollegen fanden heraus, dass bta-miR-24-3p die Myogenese reguliert und aber die Proliferation inhibiert (Hu et al. 2019). Sie wurde, wie auch let-7a-5p, in einer anfangs erwähnten Studie (Zhong et al. 2017) in der embryonalen Pansenwand von Ziegen vorgefunden, was stark vermuten lässt, dass diese miRNAs pansenspezifisch sein könnten. In der gleichen Studie zählten miR-21-5p, miR-26a-5p, let-7f-5p, sowie miR-143-3p und miR-27b-3p zu den zehn meist exprimierten miRNAs. Dies lässt darauf schließen, dass diese miRNAs generell in einer besonders hohen Zahl in Pansengewebe vorkommen. Die miRNAs bta-let-7f, bta-mir-143, bta-miR-26a und bta-miR-27b konnten in hoher Zahl auch in bovinem Lebergewebe nachgewiesen werden (Al-Husseini et al. 2016, Long und Chen 2009, Mukiibi et al. 2020), was wiederum eher vermuten lässt, dass diese miRNAs generell eher bei ruminierenden Tieren im Körper stark präsent sind.

Lediglich bta-miR-27b war während der konzentratreichen und faserarmen Fütterung präsenter als während der Grundfutterfütterung. Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass laut Studien miR-27b von Bedeutung für das bovine Immunsystem ist oder es eine wichtige Rolle bei diversen Erkrankungen einnimmt (Jin et al. 2014, Lawless et al. 2013, Salilew-Wondim et al. 2014, Singh et al. 2016). Es wird zudem auch in hohem Ausmaß in den Granulosazellen von Follikeln während der frühen Lutealphase exprimiert (Salilew-Wondim et al. 2014).

In der Studie von Sun, Hui-Zeng und Kollegen von 2019, in welcher miRNA-Expressionen in bovinem Serum, Exosomen und elf verschiedenen bovinen Geweben untersucht wurden, gehören die miRNAs bta-miR-143 und bta-miR-27b sowohl dort als auch in der vorliegenden Studie zu den zehn meist exprimierten miRNAs (Sun, Hui-Zeng et al. 2019). Sun, Hui-Zeng

und Kollegen bestätigen mit ihrem Ergebnis die Aussagen von Xin et al. (2009) und Ding et al. (2017), dass miR-143 und miR-27b in Wirbeltieren hoch konserviert vorliegen (Ding et al. 2017, Sun, Hui-Zeng et al. 2019, Xin et al. 2009). Da diese zwei miRNAs, wie bereits erwähnt, auch in unserer Studie zu den Top zehn der am meist exprimierten miRNAs zählen, kann die obige Aussage durchaus bestätigt werden. Beim Vergleich der vorliegenden Ergebnisse und der von Do et al. (2019) sowie Wang et al. (2016), beides Studien, die die Expressionsprofile von miRNAs in Pansengewebe untersucht haben, wird ersichtlich, dass auch hier die meist exprimierten miRNAs mit denen der vorliegenden Arbeit Übereinstimmungen zeigen. Do und Kollegen nennen hierbei bta-miR-143, bta-miR-27b, miR-26a und let-7a-5p, Wang und Kollegen die MicroRNAs miR-143, miR-27b und miR-26a (Do et al. 2019, Wang et al. 2016).

Die hohe Expression dieser miRNAs in diversen Geweben lässt darauf schließen, dass sie dort eine wichtige Bedeutung für die Regulierung biologischer Funktionen haben (Mukiibi et al. 2020). Um physiologische sowie pathologische Mechanismen beim Rind besser zu verstehen, ist es wichtig, die Expression und Verteilung von miRNA in verschiedenen Geweben zu untersuchen (Sun, Hui-Zeng et al. 2019). Jedoch liegen leider bisher vergleichsweise erst wenige Informationen darüber vor. Generell sind vor allem funktionelle Eigenschaften von miRNAs beim Rind wenig erforscht.

Durch die vorliegende Arbeit und Studie konnten weitere Erkenntnisse in Bezug auf die miRNA-Expression bei Pansengesundheit, subakuter Pansenazidose sowie die Expression unter dem Einfluss phytogener Futtermittelzusatzstoffe auf den Pansen bei Gesundheit und Krankheit dazugewonnen werden. Kritisch ist jedoch die Anzahl der für den Versuch verwendeten Tiere zu betrachten. Aufgrund der aufwendigen Analysen, die im Labor stattgefunden haben, wurde eine geringere Anzahl an Kühen gewählt. Jedoch wäre es wichtig und notwendig die gefundenen Ergebnisse in größeren Kohorten zu validieren.

Die Ziele der Arbeit, eine Veränderung des miRNA-Expressionsprofils zu detektieren wurde in Bezug auf beide Fragestellungen erreicht. Jedoch konnte nicht jeder miRNA eine Funktion zugeordnet werden, da bisher nur wenig Informationsmaterial über miRNA im Pansengewebe vorhanden ist. Hier bedarf es weiterer Forschung. Die Ergebnisse dieser Arbeit können als wichtige Grundlage für weitere Forschungen betrachtet werden, um das Wissen über phyto gene Futtermittelzusatzstoffe, pansen- und SARA-spezifische miRNAs zu erweitern.

6. FAZIT

In der vorliegenden Arbeit konnte durch die Fütterung von Kühen mit zwei unterschiedlichen Diäten und zusätzlicher Gabe von phytoenen Futtermittelzusatzstoffen verschiedene miRNA-Expressionsmuster identifiziert werden.

Im Zuge der Arbeit konnten insgesamt 35 miRNAs gefunden werden, welche im Speziellen nur der mit phytoenem Futtermittelzusatzstoff behandelten Tiere, unabhängig von der Ration, die sie vorgelegt bekamen, zugeschrieben wurden. Diese sind beweisend dafür, dass die Zusatzstoffe dazu in der Lage sind das Expressionsmuster von miRNAs zu verändern. Außerdem könnten sie Hinweise dafür liefern, dass der eingesetzte phytoene Futtermittelzusatzstoff einen bestimmten Einfluss auf die Gesund- bzw. Intaktheit der Pansenwand hat. Zudem wurden 18 miRNAs gefunden, welche nur während einer SARA exprimiert wurden und somit für eine subakute Pansenazidose bzw. eine Dysbalance des Pansens spezifisch sein könnten. In der Zeit, in der die Grundfütterration vorgelegt wurde, wurden 29 miRNAs exprimiert, welche nur den Tieren, die den phytoenen Zusatzstoff bekamen, zuzuordnen waren. Im Gegensatz dazu wurden 41 miRNAs exprimiert, welche nur bei den an SARA-erkrankten Tieren gefunden wurden, welche den phytoenen Futtermittelzusatz erhalten haben. Aus diesen Ergebnissen wird ersichtlich, dass durch den phytoenen Futtermittelzusatz während der konzentratreichen Ration, und damit während einer Erkrankung an SARA, deutlich mehr miRNAs exprimiert wurden als während der Grundfütterration. Weiters wiesen Tiere mit den phytoenen Zusatzstoffen in der Diät insgesamt 562 miRNAs auf und jene ohne Behandlung 541 miRNAs.

In einer Studie von Sun und Kollegen wird eine paraloge Sequenz von bta-miR-2285 als pansenspezifisch angesehen (Sun, Hui-Zeng et al. 2019). In der vorliegenden Arbeit konnten weitere Mitglieder dieser Familie zum einen während der Grundfütterfütterung (bta-miR-2285cd, bta-miR-2285ai-5p, bta-miR-2285au, bta-miR-2285bz, bta-miR-2285be) und zum anderen während der konzentratreichen Fütterung (Bta-miR-2285ar, bta-miR-2285bd, bta-miR-2285di, bta-miR-2285bg) detektiert werden. Auch die von ihnen in der Studie als pansenspezifisch postulierten miRNAs bta-miR-1434-3p, bta-miR-2387, bta-miR-2344 und bta-miR-184 (Sun, Hui-Zeng et al. 2019) und miRNAs, welche in einer anderen Studie in der Pansenwand von Ziegenembryonen detektiert wurden (miR-150, miR-182, miR-22-3p, miR-23a, miR-24-3p, miR-27a-3p, miR-34a, miR-504, miR-96, miR-21-5p, miR-26a-5p, let-7f-5p, let-7i-5p, let-7g-5p, let-7a-5p, miR-7-5p, miR-145-5p, miR-148a-3p) (Zhong et al. 2017), wurden innerhalb dieser Arbeit zu jedem Zeitpunkt und bei allen Versuchstieren exprimiert und

können, inklusive der Mutationen der miRNA-Familie bta-miR-2285, durchaus als pansenspezifisch angesehen werden und als Grundlage weiterer Forschung dienen.

Bta-miR-6527, welche nur im Zusammenhang mit der Kontrollgruppe und der Gabe von Grundfutter assoziiert werden konnte, könnte als Marker für eine unbeeinflusste gesunde Pansenwand angesehen werden. Im Gegensatz dazu steht miR-15a-3p – eine miRNA, welche dafür bekannt ist, eine Apoptose in bestimmten Zelllinien zu induzieren (Druz et al. 2013) und in der vorliegenden Arbeit während einer SARA-auslösenden Diät innerhalb beider Gruppen exprimiert wurde.

Die miRNAs miR-33b, miR-376a, miR-584 und miR-665, welche in unterschiedlichen Studien (Zhao et al. 2017) als Tumorsuppressoren bzw. als Tumormarker postuliert werden, wurden in der vorliegenden Arbeit während der SARA-auslösenden Ration und/oder nur innerhalb der Gruppe mit phyto-genem Futtermittelzusatzstoff nachgewiesen. Dies könnte als Hinweis für den positiven Einfluss auf die Pansenwand verstanden werden.

Insgesamt konnten 35 miRNAs gefunden werden, welche nur mit der Fütterung des phyto-genen Futtermittelzusatzstoffes assoziiert werden können. Nur, weil bisher noch keine weiteren Funktionen in Bezug auf die Pansengesundheit bzw. in Bezug auf unterschiedliche Diäten beim Rind gefunden wurden, sollten diese miRNAs auf keinen Fall außer Acht gelassen werden. Um hier genauere Aussagen treffen zu können, sollte ihre Funktion weiter untersucht bzw. erforscht werden.

Was jedoch mit Sicherheit beantwortet werden kann, ist, dass phyto-gene Futtermittelzusatzstoffe, wie auch eine konzentratreiche, faserarme Diät, welche das SARA-Risiko erheblich erhöht, in der Lage sind das Expressionsmuster von miRNAs zu verändern.

7. ZUSAMMENFASSUNG

Die subklinische Form der Pansenazidose tritt vor allem in Herden auf, die eine konzentratreiche faserarme Ration vorgelegt bekommen. Obwohl diese Art der Rationszusammensetzung ein Risiko für SARA birgt, wird sie häufig dazu verwendet, den Ertrag der Herde durch die daraus gewonnene Energie zu steigern. Phyto gene Futtermittelzusatzstoffe haben laut Studien das Potential die Pansengesundheit zu unterstützen. Es konnte gezeigt werden, dass sie durch ihre Zugabe zu energiereichen Rationen u.a. die Wiederkau- und Kauaktivität steigern und somit in der Lage sind, die fütterungsbedingte Azidität durch vermehrten Speichelfluss zu mindern. MicroRNAs sind bekannt dafür, dass sie die Genexpression regulieren. Sie spielen eine entscheidende Rolle bei physiologischen Prozessen im Körper aber auch in der Pathogenese diverser Erkrankungen. Ziel dieser Arbeit war, MicroRNAs aus Pansenpapillen während unterschiedlicher Diäten zu isolieren und herauszufinden, ob zum einen phyto gene Futtermittelzusatzstoffe in einer Ration und zum anderen eine konzentratreiche faserarme Ration die Expression von miRNAs verändert.

Für den Versuch wurden neun multipare nicht laktierende Holstein Friesian Rinder herangezogen, welche in zwei Gruppen geteilt wurden. Zu Beginn wurde eine Grundfütterration und später eine Ration mit 65 % Konzentratmischung vorgelegt. Die Verumgruppe bekam zusätzlich zur Ration phyto gene Futtermittelzusatzstoffe. Bereits während der Adaptationsphase, welche vor der vollständigen Futterumstellung gemacht wurde, konnte bei den Tieren SARA festgestellt werden. Für den Versuch wurden Papillen aus dem ventralen Pansensack entnommen und im Labor homogenisiert. Aus den Proben wurde eine RNA-Isolation und im Anschluss daran eine MicroRNA-Sequenzierung durchgeführt. Die Ergebnisse geben unterschiedliche MicroRNA-Expressionsmuster während der beiden Diäten und während der Zugabe von phyto genen Zusatzstoffen zu erkennen. So konnten 35 miRNAs gefunden werden, welche durch den phyto genen Futtermittelzusatzstoff beeinflusst wurden, sowie 18 miRNAs, welche nur während einer SARA exprimiert wurden und somit für eine subakute Pansenazidose spezifisch sein könnten. Innerhalb der Grundfütterration wurden 29 miRNAs exprimiert, welche nur der Gruppe mit phyto genen Zusatzstoffen zuzuordnen waren. Im Gegensatz dazu wurden in der SARA-Woche 41 miRNAs gefunden, welche nur in der Gruppe mit phyto genen Zusatzstoffen exprimiert wurden. Die Tiere mit den phyto genen Zusatzstoffen in der Diät wiesen insgesamt 562 miRNAs auf und jene ohne Behandlung 541 miRNAs. Im Zuge der Arbeit wurden einige miRNAs gefunden, welche als pansenspezifisch

angesehen werden können. Bta-miR-6527 kam nur in der Kontrollgruppe während der Grundfütterration vor und könnte als Biomarker für gesunde Pansenpapillen dienen, während miR-15a-3p, bekannt im Zusammenhang mit apoptotischen Prozessen (Druz et al. 2013) während einer Diät exprimiert wurde, welche das Risiko für SARA deutlich erhöht. Die miRNAs miR-33b, miR-376a, miR-584 und miR-665, welche als Tumorsuppressoren bzw. als Tumormarker postuliert werden (Zhao et al. 2017), wurden im Zusammenhang mit dem phytohemagglutinin exprimiert und könnten einen positiven Einfluss auf Pansenpapillen haben.

Im Allgemeinen ist erst recht wenig über die Funktion boviner miRNAs bekannt. Obwohl der Pansen ein Organ von zentraler Wichtigkeit für ruminierende Tiere darstellt, gibt es erst wenige Studien, die sich mit pansenspezifischen miRNAs oder mit dem miRNA-Expressionsprofil bei unterschiedlichen Diäten beschäftigen. Die hier erarbeiteten Daten und Ergebnisse bilden eine wichtige Grundlage für weitere Studien zum miRNA-Expressionsprofil bei subakuter Pansenazidose sowie bei Zugabe phytohemagglutinin zur Vermeidung einer SARA.

8. SUMMARY

The subclinical form of rumen acidosis occurs primarily in herds fed a high-concentrate, low-fiber ration. Although this type of ration carries a risk for SARA, it is often used to increase the herd's yield through the energy derived from it. Phytogetic feed additives have the potential to support rumen health, according to studies. It has been shown that by adding them to high-energy rations, they increase rumination and chewing activity and thus are able to reduce feed-induced acidity by increasing salivation. MicroRNAs are known to regulate gene expression. They play a crucial role in physiological processes in the body but also in the pathogenesis of various diseases. The aim of this work was to isolate microRNAs from rumen papillae during different diets and to determine whether, on the one hand, phytogetic feed additives in a ration and, on the other hand, a high-concentrate low-fiber ration altered the expression of miRNAs. Nine multiparous dry Holstein Friesian cattle were used for the experiment, which were divided into two groups. At the beginning, a forage diet and later a high grain diet with 65 % concentrate mixture were fed. The verum group received phytogetic feed additives in addition to the ration. Already during the adaptation phase, which was made before the complete feed change, SARA was detected. For the experiment, papillae were taken from the ventral rumen sac and homogenized in the laboratory. RNA isolation was performed from the samples followed by microRNA deep sequencing. The results indicate different microRNA expression patterns during the two diets and during the addition of phytogetic additives. Thus, 35 miRNAs were found to be affected by the phytogetic feed additive and 18 miRNAs were found to be expressed only during a SARA and thus could be specific for subacute rumen acidosis. Within the forage diet, 29 miRNAs were expressed, which could only be assigned to the group with phytogetic additives. In contrast, 41 miRNAs were found in the SARA week, which were expressed only in the group with phytogetic additives. The animals with the phytogetic additives in their diet had a total of 562 miRNAs and those without treatment had 541 miRNAs. During the course of this work, several miRNAs were found that could be considered rumen specific. Bta-miR-6527 was present only in the control group during the forage diet and could serve as a biomarker for healthy rumen papillae, while miR-15a-3p, known to be associated with apoptotic processes (Druz et al. 2013) was expressed during a diet that significantly increased the risk for SARA. The miRNAs miR-33b, miR-376a, miR-584, and miR-665, which are postulated to be tumor suppressors and tumor markers, respectively (Zhao et al. 2017), were expressed in association with the phytogetic additive and could have a beneficial effect on rumen papillae. In general, quite little is known about the function of bovine miRNAs. Although the rumen is an organ of central importance for ruminant animals, there are only a

few studies dealing with rumen-specific miRNAs or with miRNA expression profile under different diets. Thus, the data and results generated will be an important basis for further research of miRNA expression profile in subacute rumen acidosis as well as when phytogetic feed additives are added to prevent SARA.

9. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABBILDUNG 1: RASTERELEKTRONENMIKROSKOPISCHE ANSICHT AUF PANSENZOTTEN EINES RINDES. VERGR. 10FACH (LIEBICH 2004)	3
ABBILDUNG 2: VERANSCHAULICHUNG DES GLEICHGEWICHTES, DAS ZU EINEM STABILEN PANSEN-PH-WERT FÜHRT (ABBILDUNG ADAPTIERT NACH NEUBAUER, KRÖGER ET AL. 2018)	6
ABBILDUNG 3: RUMINALE CILIIERTE PROTOZOENPOPULATION (■) UND PANSEN-PH (●) BEI RINDERN MIT EXPERIMENTELL INDUZIERTER SUBAKUTER AZIDOSE (NAGARAJA UND TITGEMEYER 2007) (B; DATEN VON GOAD ET AL., 1998)	7
ABBILDUNG 4: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES ZUSAMMENHANGES ZWISCHEN DEM PANSEN-PH UND DEM KOHLENHYDRATABBAU (% MOL FETTSÄUREN), NACH KAUFMANN UND ROHR 1966	11
ABBILDUNG 5: VEREINFACHTE GRAPHISCHE DARSTELLUNG DES VERSUCHSCHEMAS DER ERSTEN WOCHEN EINES RUNS. DIE ADAPTIONSWOCHE WURDE HIER NICHT MITEINBEZOGEN. WOCHEN 1: GRUNDFUTTER-FÜTTERUNG, WOCHEN 2: KONZENTRATFUTTERFÜTTERUNG, KG: KONTROLLGRUPPE, PG: GRUPPE MIT PHYTOGENEM FUTTERMITTELZUSATZSTOFF	17
ABBILDUNG 6: SELBST ZUSAMMEN-GESTELLTE HOMOGENISIERUNGSTUBES	24
ABBILDUNG 7: TUBES MIT EINGESETZTER BLAUER MEMBRAN	25
ABBILDUNG 8: MEMBRANEN	26
ABBILDUNG 9: DENOVIX SPECTRO-PHOTOMETER	27
ABBILDUNG 10: VERWENDETER CODE IM PROGRAMM RSTUDIO (ERSTELLT VON SARA RICCI), HIER ANHAND DES BEISPIELS PROBE NR. 25 (BERGROSE, WOCHEN 1).....	29
ABBILDUNG 11: AUSSCHNITT AUS DEM FINALEN EXCELDOKUMENT NACH DEM DURCHLAUFEN DES CODES VON ABB. 10 IN R.....	30
ABBILDUNG 12: AUSWAHL DES BEREICHES FÜR DIE „ZÄHLENWENN“-FUNKTION.....	30
ABBILDUNG 13: VERARBEITUNG DER DATEN IM ONLINEPROGRAMM VENNY 2.1.0	31
ABBILDUNG 14: VENNY-DIAGRAMM DES VERGLEICHES DER WOCHEN 1 DER KONTROLLGRUPPE (WOCHEN 1 KG) VS. DER WOCHEN 2 DER KONTROLLGRUPPE (WOCHEN 2 KG) VS. DER WOCHEN 1 DER GRUPPE MIT PHYTOGENEN ZUSATZSTOFFEN (WOCHEN 1 PG) VS. DER WOCHEN 2 DER GRUPPE MIT PHYTOGENEN ZUSATZSTOFFEN (WOCHEN 2 PG)	33
ABBILDUNG 15: VENN-DIAGRAMM DES VERGLEICHES DER MICRORNAs DER WOCHEN 1 UND WOCHEN 2, WELCHE BEI ALLEN KÜHEN EXPRIMIERT WURDEN. IN DER MITTE DES DIAGRAMMS WERDEN JENE MIRNAs DARGESTELLT, WELCHE SOWOHL IN DER WOCHEN 1 ALS AUCH IN DER WOCHEN 2 VORHANDEN SIND.....	36

- ABBILDUNG 16: VENN-DIAGRAMM DES VERGLEICHES DER MICRORNAs DER KONTROLLGRUPPE UND DER GRUPPE MIT PHYTOGENEN ZUSATZSTOFFEN, WELCHE BEI ALLEN KÜHEN IN DER JEWEILIGEN GRUPPE EXPRIMIERT WURDEN. IN DER MITTE DES DIAGRAMMS WERDEN JENE MIRNAs DARGESTELLT, WELCHE IN BEIDEN GRUPPEN UND SOMIT BEI ALLEN NEUN KÜHEN VORHANDEN WAREN.. MIRNAs KG SIND JENE MIRNAs, WELCHE EXKLUSIV DER KONTROLLGRUPPE ZUZUORDNEN WAREN. MIRNAs PG SIND MIRNAs, WELCHE EXKLUSIV DER GRUPPE MIT PHYTOGENEN ZUSATZSTOFFEN ZUZUORDNEN WAREN. 38
- ABBILDUNG 17: VENN-DIAGRAMM DES VERGLEICHES DER MIRNAs DER KONTROLLGRUPPE (KG) IN WOCHE 1 UND DER GRUPPE MIT PHYTOGENEM ZUSATZSTOFF (PG) IN WOCHE 1 MIT FOKUS AUF DIE KONTROLLGRUPPE. DIE SCHRAFFIERTE FLÄCHE STELLT JENE 20 MIRNAs DAR, WELCHE INNERHALB DER WOCHE 1 NUR IN DER KONTROLLGRUPPE EXPRIMIERT WURDEN... 40
- ABBILDUNG 18: VENN-DIAGRAMM DES VERGLEICHES DER MIRNAs DER KONTROLLGRUPPE (KG) IN WOCHE 2 UND DER GRUPPE MIT PHYTOGENEM ZUSATZSTOFF (PG) IN WOCHE 2 MIT FOKUS AUF DIE KONTROLLGRUPPE. DIE SCHRAFFIERTE FLÄCHE STELLT JENE 13 MIRNAs DAR, WELCHE INNERHALB DER WOCHE 2 (KONZENTRATREICHE RATION) NUR IN DER KONTROLLGRUPPE EXPRIMIERT WURDEN. DIESE FINDEN SICH IN DER TAB. S1, IN DER RECHTEN SPALTE WIEDER..... 41
- ABBILDUNG 19: VENN-DIAGRAMM DES VERGLEICHES DER MICRORNAs DER KONTROLLGRUPPE (KG) ZWISCHEN DER WOCHE 1 UND WOCHE 2. 42
- ABBILDUNG 20: VERGLEICH DER MIRNAs DER KONTROLLGRUPPE (KG) IN WOCHE 1 UND DER GRUPPE MIT PHYTOGENEM ZUSATZ (PG) IN WOCHE 1 MIT FOKUS AUF DIE GRUPPE MIT PHYTOGENEM FUTTERMITTELZUSATZSTOFF. DIE SCHRAFFIERTE FLÄCHE STELLT JENE 29 MIRNAs DAR, WELCHE INNERHALB DER WOCHE 1 NUR IN DER GRUPPE MIT PHYTOGENEM FUTTERMITTELZUSATZSTOFF EXPRIMIERT WURDEN. 44
- ABBILDUNG 21: VERGLEICH DER MIRNAs DER KONTROLLGRUPPE (KG) IN WOCHE 2 UND DER GRUPPE MIT PHYTOGENEM FUTTERMITTELZUSATZSTOFF (PG) WÄHREND DER KONZENTRATREICHEN DIÄT MIT FOKUS AUF DIE GRUPPE MIT PHYTOGENEM FUTTERMITTELZUSATZSTOFF. DIE SCHRAFFIERTE FLÄCHE STELLT JENE 41 MIRNAs DAR, WELCHE INNERHALB DER WOCHE 2 NUR IN DER GRUPPE MIT PHYTOGENEM FUTTERMITTELZUSATZSTOFF EXPRIMIERT WURDEN. 45
- ABBILDUNG 22: VENN-DIAGRAMM DES VERGLEICHES DER MICRORNAs DER GRUPPE MIT PHYTOGENEM FUTTERMITTELZUSATZSTOFF (PG) ZWISCHEN BEIDEN DIÄTEN (WOCHE 1 = GRUNDFUTTERFÜTTERUNG; WOCHE 2 = KONZENTRATREICHE FÜTTERUNG)..... 46

10. TABELLENVERZEICHNIS

TABELLE 1: VERSCHIEDENE DEFINITIONEN VON SARA	8
TABELLE 2: ERGEBNISSE DER QUANTITÄTSKONTROLLE MITTELS DeNOVIX SPECTROPHOTOMETER RUN 2, WOCHE 1 UND WOCHE 2. HIER WIRD DER (GERUNDETE) MITTELWERT DER BEIDEN MESSUNGEN ANGEZEIGT	32
TABELLE 3: MiRNAs, WELCHE NUR INNERHALB DER GRUNDFUTTERWOCHE UND GLEICHZEITIG INNERHALB DER KONTROLLGRUPPE VORKAMEN. DIESE MiRNAs KONNTEN IN DER GRUPPE MIT PHYTOGENEN ZUSATZSTOFFEN ZU KEINEM ZEITPUNKT GEFUNDEN WERDEN. AUßERDEM KONNTEN SIE NICHT WÄHREND DER KONZENTRATREICHEN DIÄT IN DER KONTROLLGRUPPE GEFUNDEN WERDEN	34
TABELLE 4: MiRNAs, WELCHE NUR WÄHREND DER KONZENTRATREICHEN DIÄT UND GLEICHZEITIG INNERHALB DER KONTROLLGRUPPE VORKAMEN. SIE WURDEN WEDER IN DER GRUPPE MIT PHYTOGEMEM ZUSATZSTOFF NOCH IN DER KONTROLLGRUPPE WÄHREND DER GRUNDFUTTERRATION BEI ALLEN KÜHEN EXPRIERT	34
TABELLE 5: MiRNAs, WELCHE NUR WÄHREND DER GRUNDFUTTERFÜTTERUNG UND GLEICHZEITIG INNERHALB DER GRUPPE MIT PHYTOGENEN ZUSATZSTOFFEN VORKAMEN	35
TABELLE 6: MiRNAs, WELCHE NUR WÄHREND DER KONZENTRATREICHEN FÜTTERUNG UND GLEICHZEITIG INNERHALB DER GRUPPE MIT PHYTOGENEN ZUSATZSTOFFEN VORKAMEN.....	35
TABELLE 7: LINKS: EXKLUSIV EXPRIERTE MICRORNAs WÄHREND DER GRUNDFUTTERFÜTTERUNG, BEI ALLEN NEUN TIEREN VORHANDEN; RECHTS: MiRNAs NUR IN DER KONZENTRATFUTTERWOCHE, ABER BEI JEDER DER NEUN KÜHE GLEICHZEITIG EXPRIERT	37
TABELLE 8: MiRNAs, NUR EXPRIERT IN DER KONTROLLGRUPPE (WÄHREND BEIDER DIÄTEN). AUFGEListETE MiRNAs FANDEN SICH NICHT IN DER GRUPPE MIT PHYTOGENEN ZUSATZSTOFFEN WIEDER.....	39
TABELLE 9: MiRNAs, WELCHE NUR IN DER GRUPPE MIT PHYTOGENEN ZUSATZSTOFFEN EXPRIERT WURDEN. VERGLEICH ALLER MiRNAs BEIDER WOCHEN DER KONTROLLGRUPPE UND ALLE MiRNAs BEIDER WOCHEN DER GRUPPE MIT PHYTOGENEN ZUSATZSTOFFEN. AUFGEListETE MiRNAs WURDEN NICHT IN DER KONTROLLGRUPPE GEFUNDEN.....	43
TABELLE 10: DIE FÜNF MEIST EXPRIERTEN MiRNAs BEI BERGROSE	47
TABELLE 11: DIE FÜNF MEIST EXPRIERTEN MiRNAs BEI NELDA	47
TABELLE 12: DIE FÜNF MEIST EXPRIERTEN MiRNAs BEI BANANE	47
TABELLE 13: DIE FÜNF MEIST EXPRIERTEN MiRNAs BEI NARBE.....	47
TABELLE 14: DIE FÜNF MEIST EXPRIERTEN MiRNAs BEI RICKY	48

TABELLE 15: DIE FÜNF MEIST EXPRIMIERTEN MIRNAS BEI ELFI.....	48
TABELLE 16: DIE FÜNF MEIST EXPRIMIERTEN MIRNAS BEI EDIT	48
TABELLE 17: DIE FÜNF MEIST EXPRIMIERTEN MIRNAS BEI NEWADA	48
TABELLE 18: DIE FÜNF MEIST EXPRIMIERTEN MIRNAS BEI ELSA	49
TABELLE 19: DIE ZEHN AM MEIST EXPRIMIERTEN MIRNAS ALLER KÜHE WÄHREND BEIDER DIÄTEN GEMEINSAM, NUR WÄHREND DER FÜTTERUNG VON GRUNDFUTTER, SOWIE WÄHREND DER FÜTTERUNG VON KONZENTRATREICHEM FUTTER, DER KONTROLLGRUPPE UND DER GRUPPE MIT PHYTOGENEM FUTTERMITTELZUSATZSTOFF IN ABSTEIGENDER REIHENFOLGE SORTIERT	50

11. LITERATURVERZEICHNIS

- Abdela N. 2016. Sub-acute Ruminant Acidosis (SARA) and its Consequence in Dairy Cattle: A Review of Past and Recent Research at Global Prospective. *Achievements in the Life Sciences*, 10 (2): 187–196. DOI 10.1016/j.als.2016.11.006.
- Al-Husseini W, Chen Y, Gondro C, Herd RM, Gibson JP, Arthur PF. 2016. Characterization and Profiling of Liver microRNAs by RNA-sequencing in Cattle Divergently Selected for Residual Feed Intake. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 29 (10): 1371–1382. DOI 10.5713/ajas.15.0605.
- Armbrecht M. 2013. https://online-shop.eppendorf.de/eshopdownload/downloadbykey/59828_1 (Zugriff 28.03.2021).
- Aronson JK, Ferner RE. 2017. Biomarkers-A General Review. *Current protocols in pharmacology*, 76: 9.23.1-9.23.17. DOI 10.1002/cpph.19.
- Aschenbach JR, Penner GB, Stumpff F, Gäbel G. 2011. Ruminant Nutrition Symposium: Role of fermentation acid absorption in the regulation of ruminal pH. *Journal of animal science*, 89 (4): 1092–1107. DOI 10.2527/jas.2010-3301.
- Baumgartner W. 2014. Untersuchung des Panseninhaltes. In: Baumgartner W, Hrsg. *Klinische Propädeutik der Haus- und Heimtiere*. Achte., überarb. Aufl. Stuttgart: Enke, 483–485.
- Beauchemin KA, Yang WZ, Rode LM. 2003. Effects of Particle Size of Alfalfa-Based Dairy Cow Diets on Chewing Activity, Ruminal Fermentation, and Milk Production. *Journal of dairy science*, 86 (2): 630–643. DOI 10.3168/jds.S0022-0302(03)73641-8.
- Bergsten C. 2003. Causes, risk factors, and prevention of laminitis and related claw lesions. *Acta veterinaria Scandinavica. Supplementum*, 98: 157–166. DOI 10.1186/1751-0147-44-S1-S157.
- Bhaskaran M, Mohan M. 2014. MicroRNAs: history, biogenesis, and their evolving role in animal development and disease. *Veterinary pathology*, 51 (4): 759–774. DOI 10.1177/0300985813502820.
- Boosman R, Nemeth F, Gruys E, Klarenbeek A. 1989. Arteriographical and pathological changes in chronic laminitis in dairy cattle. *The veterinary quarterly*, 11 (3): 144–155. DOI 10.1080/01652176.1989.9694213.

- Bopp T, Klein M. 2012. RNA-Interference. In: Jansohn M, Rothhämel S, Hrsg. Gentechnische Methoden. Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor. Fünfte. Auflage. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Braun U. 2002. Entzündung und Verstopfung der hinteren Hohlvene. In: Dirksen G, Gründer H-D, Stöber M, Hrsg. Innere Medizin und Chirurgie des Rindes. Vierte., vollst. Neubearb. Aufl. Berlin: Parey, 194–197.
- Brent BE. 1976. Relationship of acidosis to other feedlot ailments. *Journal of animal science*, 43 (4): 930–935. DOI 10.2527/jas1976.434930x.
- Breves G. 2015. Nahrungsaufnahme und Speichelsekretion. In: Engelhardt W von, Breves G, Diener M, Gäbel G, Hrsg. Physiologie der Haustiere. Fünfte., vollständig überarbeitete Auflage. Stuttgart: Enke Verlag, 345–351.
- Breves G, Leonhard-Marek S, Martens H. 2015. Vormägen. In: Engelhardt W von, Breves G, Diener M, Gäbel G, Hrsg. Physiologie der Haustiere. Fünfte., vollständig überarbeitete Auflage. Stuttgart: Enke Verlag, 387–404.
- Calsamiglia S, Busquet M, Cardozo PW, Castillejos L, Ferret A. 2007. Invited review: Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *Journal of dairy science*, 90 (6): 2580–2595. DOI 10.3168/jds.2006-644.
- Chan S-H, Wu C-W, Li AFY, Chi C-W, Lin W-C. 2008. miR-21 microRNA expression in human gastric carcinomas and its clinical association. *Anticancer research*, 28 (2A): 907–911.
- Cheng Y, Ji R, Yue J, Yang J, Liu X, Chen H, Dean DB, Zhang C. 2007. MicroRNAs are aberrantly expressed in hypertrophic heart: do they play a role in cardiac hypertrophy? *The American journal of pathology*, 170 (6): 1831–1840. DOI 10.2353/ajpath.2007.061170.
- Cobellis G, Tralbalza-Marinucci M, Yu Z. 2016. Critical evaluation of essential oils as rumen modifiers in ruminant nutrition: A review. *The Science of the total environment*, 545-546: 556–568. DOI 10.1016/j.scitotenv.2015.12.103.
- Coenen-Stass AML, Magen I, Brooks T, Ben-Dov IZ, Greensmith L, Hornstein E, Fratta P. 2018. Evaluation of methodologies for microRNA biomarker detection by next generation sequencing. *RNA biology*, 15 (8): 1133–1145. DOI 10.1080/15476286.2018.1514236.

- Correia de Sousa M, Gjorgjieva M, Dolicka D, Sobolewski C, Foti M. 2019. Deciphering miRNAs' Action through miRNA Editing. *International journal of molecular sciences*, 20 (24). DOI 10.3390/ijms20246249.
- Coutinho LL, Matukumalli LK, Sonstegard TS, van Tassell CP, Gasbarre LC, Capuco AV, Smith TPL. 2007. Discovery and profiling of bovine microRNAs from immune-related and embryonic tissues. *Physiological genomics*, 29 (1): 35–43. DOI 10.1152/physiolgenomics.00081.2006.
- Cullen BR. 2011. Herpesvirus microRNAs: phenotypes and functions. *Current opinion in virology*, 1 (3): 211–215. DOI 10.1016/j.coviro.2011.04.003.
- Dado RG, Allen MS. 1993. Continuous Computer Acquisition of Feed and Water Intakes, Chewing, Reticular Motility, and Ruminal pH of Cattle. *Journal of dairy science*, 76 (6): 1589–1600. DOI 10.3168/jds.S0022-0302(93)77492-5.
- DeVries TJ, Beauchemin KA, Dohme F, Schwartzkopf-Genswein KS. 2009. Repeated ruminal acidosis challenges in lactating dairy cows at high and low risk for developing acidosis: feeding, ruminating, and lying behavior. *Journal of dairy science*, 92 (10): 5067–5078. DOI 10.3168/jds.2009-2102.
- Ding L, Ni J, Yang F, Huang L, Deng H, Wu Y, Ding X, Tang J. 2017. Promising therapeutic role of miR-27b in tumor. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 39 (3): 1010428317691657. DOI 10.1177/1010428317691657.
- Dirksen G. 2002. Krankheiten der Verdauungsorgane und der Bauchwand. Krankheiten von Haube und Pansen beim ruminanten Rind. In: Dirksen G, Gründer H-D, Stöber M, Hrsg. *Innere Medizin und Chirurgie des Rindes*. Vierte., vollst. neubearb. Aufl. Berlin: Parey, 396–455.
- Dissanayake E, Inoue Y. 2016. MicroRNAs in Allergic Disease. *Current allergy and asthma reports*, 16 (9): 67. DOI 10.1007/s11882-016-0648-z.
- Do DN, Dudemaine P-L, Fomenky BE, Ibeagha-Awemu EM. 2019. Integration of miRNA weighted gene co-expression network and miRNA-mRNA co-expression analyses reveals potential regulatory functions of miRNAs in calf rumen development. *Genomics*, 111 (4): 849–859. DOI 10.1016/j.ygeno.2018.05.009.

Do DN, Dudemaine P-L, Mathur M, Suravajhala P, Zhao X, Ibeagha-Awemu EM. 2021. miRNA Regulatory Functions in Farm Animal Diseases, and Biomarker Potentials for Effective Therapies. *International journal of molecular sciences*, 22 (6). DOI 10.3390/ijms22063080.

Dong H, Gao Q, Peng X, Sun Y, Han T, Zhao B, Liu Y, Wang C, Song X, Wu J, Yang L. 2017. Circulating MicroRNAs As Potential Biomarkers for Veterinary Infectious Diseases. *Frontiers in veterinary science*, 4: 186. DOI 10.3389/fvets.2017.00186.

Druz A, Chen Y-C, Guha R, Betenbaugh M, Martin SE, Shiloach J. 2013. Large-scale screening identifies a novel microRNA, miR-15a-3p, which induces apoptosis in human cancer cell lines. *RNA biology*, 10 (2): 287–300. DOI 10.4161/rna.23339.

Ebrahimi Ghahnavieh L, Tabatabaeian H, Ebrahimi Ghahnavieh Z, Honardoost MA, Azadeh M, Moazeni Bistgani M, Ghaedi K. 2020. Fluctuating expression of miR-584 in primary and high-grade gastric cancer. *BMC cancer*, 20 (1): 621. DOI 10.1186/s12885-020-07116-5.

Enemark JMD. 2008. The monitoring, prevention and treatment of sub-acute ruminal acidosis (SARA): a review. *Veterinary journal (London, England : 1997)*, 176 (1): 32–43. DOI 10.1016/j.tvjl.2007.12.021.

Enemark JMD, Jørgensen RJ, Kristensen NB. 2004. An evaluation of parameters for the detection of subclinical rumen acidosis in dairy herds. *Veterinary research communications*, 28 (8): 687–709. DOI 10.1023/B:VERC.0000045949.31499.20.

Eulalio A, Schulte L, Vogel J. 2012. The mammalian microRNA response to bacterial infections. *RNA biology*, 9 (6): 742–750. DOI 10.4161/rna.20018.

Fernández-Hernando C, Ramírez CM, Goedeke L, Suárez Y. 2013. MicroRNAs in metabolic disease. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 33 (2): 178–185. DOI 10.1161/ATVBAHA.112.300144.

Gálfi P, Neogrady S, Sakata T. 1991. Effects of Volatile Fatty Acids on the Epithelial Cell Proliferation of the Digestive Tract and Its Hormonal Mediation. In: Tsuda T, Kawashima R, Sasaki Y, Hrsg. *Physiological aspects of digestion and metabolism in ruminants. Proceedings of the Seventh International Symposium on Ruminant Physiology*. San Diego: Academic Press Inc, 49–59.

- Gareev I, Beylerli O, Yang G, Sun J, Pavlov V, Izmailov A, Shi H, Zhao S. 2020. The current state of MiRNAs as biomarkers and therapeutic tools. *Clinical and experimental medicine*, 20 (3): 349–359. DOI 10.1007/s10238-020-00627-2.
- Garrett EF, Pereira MN, Nordlund KV, Armentano LE, Goodger WJ, Oetzel GR. 1999. Diagnostic Methods for the Detection of Subacute Ruminal Acidosis in Dairy Cows. *Journal of dairy science*, 82 (6): 1170–1178. DOI 10.3168/jds.S0022-0302(99)75340-3.
- Garry FB, McConnel C. 2015. Indigestion in ruminants. In: Smith BP, Hrsg. *Large animal internal medicine*. Fünfte. edition. St. Louis, Mo.: Elsevier, 777–799.
- Goad DW, Goad CL, Nagaraja TG. 1998. Ruminal microbial and fermentative changes associated with experimentally induced subacute acidosis in steers. *Journal of animal science*, 76 (1): 234–241. DOI 10.2527/1998.761234x.
- Goh SY, Chao YX, Dheen ST, Tan E-K, Tay SS-W. 2019. Role of MicroRNAs in Parkinson's Disease. *International journal of molecular sciences*, 20 (22). DOI 10.3390/ijms20225649.
- Gozho GN, Plaizier JC, Krause DO, Kennedy AD, Wittenberg KM. 2005. Subacute Ruminal Acidosis Induces Ruminal Lipopolysaccharide Endotoxin Release and Triggers an Inflammatory Response. *Journal of dairy science*, 88 (4): 1399–1403. DOI 10.3168/jds.S0022-0302(05)72807-1.
- Gulyaeva LF, Kushlinskiy NE. 2016. Regulatory mechanisms of microRNA expression. *Journal of translational medicine*, 14 (1): 143. DOI 10.1186/s12967-016-0893-x.
- Guo K, Zheng S, Xu Y, Xu A, Chen B, Wen Y. 2016. Loss of miR-26a-5p promotes proliferation, migration, and invasion in prostate cancer through negatively regulating SERBP1. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 37 (9): 12843–12854. DOI 10.1007/s13277-016-5158-z.
- Ha M, Kim VN. 2014. Regulation of microRNA biogenesis. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 15 (8): 509–524. DOI 10.1038/nrm3838.
- Hailay T, Hoelker M, Poirier M, Gebremedhn S, Rings F, Saeed-Zidane M, Salilew-Wondim D, Dauben C, Tholen E, Neuhoff C, Schellander K, Tesfaye D. 2019. Extracellular vesicle-coupled miRNA profiles in follicular fluid of cows with divergent post-calving metabolic status. *Scientific reports*, 9 (1): 12851. DOI 10.1038/s41598-019-49029-9.

- Hofmann W, Bostedt H, Weitze KF, Stanek C. 2005. Der klinische Untersuchungsgang. In: Hofmann W, Hrsg. Rinderkrankheiten. Innere und chirurgische Erkrankungen des Rindes. Zweite., völlig überarb. Aufl. Stuttgart: Ulmer, 22–72.
- Hu X, Xing Y, Ren L, Wang Y, Li Q, Fu X, Yang Q, Xu L, Willems L, Li J, Zhang L. 2019. Bta-miR-24-3p Controls the Myogenic Differentiation and Proliferation of Fetal, Bovine, Skeletal Muscle-Derived Progenitor Cells by Targeting ACVR1B. *Animals : an open access journal from MDPI*, 9 (11). DOI 10.3390/ani9110859.
- Huang J, Ju Z, Li Q, Hou Q, Wang C, Li J, Li R, Wang L, Sun T, Hang S, Gao Y, Hou M, Zhong J. 2011. Solexa sequencing of novel and differentially expressed microRNAs in testicular and ovarian tissues in Holstein cattle. *International journal of biological sciences*, 7 (7): 1016–1026. DOI 10.7150/ijbs.7.1016.
- Humer E, Aschenbach JR, Neubauer V, Kröger I, Khiaosa-Ard R, Baumgartner W, Zebeli Q. 2018. Signals for identifying cows at risk of subacute ruminal acidosis in dairy veterinary practice. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 102 (2): 380–392. DOI 10.1111/jpn.12850.
- Iorio MV, Visone R, Di Leva G, Donati V, Petrocca F, Casalini P, Taccioli C, Volinia S, Liu C-G, Alder H, Calin GA, Ménard S, Croce CM. 2007. MicroRNA signatures in human ovarian cancer. *Cancer research*, 67 (18): 8699–8707. DOI 10.1158/0008-5472.CAN-07-1936.
- Jin W, Ibeagha-Awemu EM, Liang G, Beaudoin F, Zhao X, Le Guan L. 2014. Transcriptome microRNA profiling of bovine mammary epithelial cells challenged with *Escherichia coli* or *Staphylococcus aureus* bacteria reveals pathogen directed microRNA expression profiles. *BMC genomics*, 15: 181. DOI 10.1186/1471-2164-15-181.
- Kaske M. 2015. Vormagenmotorik und Ingestapassage. In: Engelhardt W von, Breves G, Diener M, Gäbel G, Hrsg. *Physiologie der Haustiere*. Fünfte., vollständig überarbeitete Auflage. Stuttgart: Enke Verlag, 361–372.
- Kaufmann W, Rohr K. 1966. Ergebnisse gaschromatographischer Bestimmung der flüchtigen Fettsäuren im Pansen bei unterschiedlicher Fütterung. *Zeitschrift für Tierphysiologie Tierernährung und Futtermittelkunde*, 22 (1-5): 1–8. DOI 10.1111/j.1439-0396.1966.tb01434.x.

- Keshavarz M, Dianat-Moghadam H, Sofiani VH, Karimzadeh M, Zargar M, Moghoofei M, Biglari H, Ghorbani S, Nahand JS, Mirzaei H. 2018. miRNA-based strategy for modulation of influenza A virus infection. *Epigenomics*, 10 (6): 829–844. DOI 10.2217/epi-2017-0170.
- Kim YJ, Hwang SJ, Bae YC, Jung JS. 2009. MiR-21 regulates adipogenic differentiation through the modulation of TGF-beta signaling in mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 27 (12): 3093–3102. DOI 10.1002/stem.235.
- KITKAS GC, VALERGAKIS GE, Karatzias H, PANOUSIS N. 2013. Subacute ruminal acidosis: prevalence and risk factors in Greek dairy herds. *Iranian Journal of Veterinary Research*, (14 (3)): 183–189.
- Kleen JL, Cannizzo C. 2012. Incidence, prevalence and impact of SARA in dairy herds. *Animal Feed Science and Technology*, 172 (1-2): 4–8. DOI 10.1016/j.anifeedsci.2011.12.003.
- Kleen JL, Hooijer GA, Rehage J, Noordhuizen JPTM. 2003. Subacute ruminal acidosis (SARA): a review. *Journal of veterinary medicine. A, Physiology, pathology, clinical medicine*, 50 (8): 406–414. DOI 10.1046/j.1439-0442.2003.00569.x.
- Kleen JL, Hooijer GA, Rehage J, Noordhuizen JPTM. 2009. Subacute ruminal acidosis in Dutch dairy herds. *The Veterinary record*, 164 (22): 681–683. DOI 10.1136/vr.164.22.681.
- Kleen JL, Upgang L, Rehage J. 2013. Prevalence and consequences of subacute ruminal acidosis in German dairy herds. *Acta veterinaria Scandinavica*, 55: 48. DOI 10.1186/1751-0147-55-48.
- Kofler J. 2015. *Orthopädische Erkrankungen & Orthopädische Operationen bei Wiederkäuern*.
- König HE, Sótonyi P, Schöpfer H, Liebich H-G. 2019. Verdauungsapparat (Systema digestorium). In: König HE, Liebich H-G, Hrsg. *Anatomie der Haustiere. Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis*. Siebte., aktualisierte und erweiterte Auflage. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag, 329–394.
- Krause KM, Combs DK. 2003. Effects of forage particle size, forage source, and grain fermentability on performance and ruminal pH in midlactation cows. *Journal of dairy science*, 86 (4): 1382–1397. DOI 10.3168/jds.S0022-0302(03)73722-9.

- Krause KM, Oetzel GR. 2006. Understanding and preventing subacute ruminal acidosis in dairy herds: A review. *Animal Feed Science and Technology*, 126 (3-4): 215–236. DOI 10.1016/j.anifeedsci.2005.08.004.
- Kröger I, Humer E, Neubauer V, Reisinger N, Aditya S, Zebeli Q. 2017. Modulation of chewing behavior and reticular pH in nonlactating cows challenged with concentrate-rich diets supplemented with phytogenic compounds and autolyzed yeast. *Journal of dairy science*, 100 (12): 9702–9714. DOI 10.3168/jds.2017-12755.
- Lawless N, Foroushani ABK, McCabe MS, O'Farrelly C, Lynn DJ. 2013. Next generation sequencing reveals the expression of a unique miRNA profile in response to a gram-positive bacterial infection. *PloS one*, 8 (3): e57543. DOI 10.1371/journal.pone.0057543.
- Lawless N, Vegh P, O'Farrelly C, Lynn DJ. 2014. The Role of microRNAs in Bovine Infection and Immunity. *Frontiers in immunology*, 5: 611. DOI 10.3389/fimmu.2014.00611.
- Li Q, Li Z, Wei S, Wang W, Chen Z, Zhang L, Chen L, Li B, Sun G, Xu J, Li Q, Wang L, Xu Z, Xia Y, Zhang D, Xu H, Xu Z. 2017. Overexpression of miR-584-5p inhibits proliferation and induces apoptosis by targeting WW domain-containing E3 ubiquitin protein ligase 1 in gastric cancer. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*, 36 (1): 59. DOI 10.1186/s13046-017-0532-2.
- Li Q, Yang C, Du J, Zhang B, He Y, Hu Q, Li M, Zhang Y, Wang C, Zhong J. 2018. Characterization of miRNA profiles in the mammary tissue of dairy cattle in response to heat stress. *BMC genomics*, 19 (1): 975. DOI 10.1186/s12864-018-5298-1.
- Li Z, Liu H, Jin X, Lo L, Liu J. 2012. Expression profiles of microRNAs from lactating and non-lactating bovine mammary glands and identification of miRNA related to lactation. *BMC genomics*, 13: 731. DOI 10.1186/1471-2164-13-731.
- Liang G, Malmuthuge N, McFadden TB, Bao H, Griebel PJ, Stothard P, Le Guan L. 2014. Potential regulatory role of microRNAs in the development of bovine gastrointestinal tract during early life. *PloS one*, 9 (3): e92592. DOI 10.1371/journal.pone.0092592.
- Liebich H-G. 2004. Verdauungsapparat (Apparatus digestorius). In: Liebich H-G, Hrsg. *Funktionelle Histologie der Haussäugetiere. Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis ; mit 11 Tabellen. Vierte., völlig überarb. und erw. Aufl.* Stuttgart: Schattauer, 187–238.

- Lin Y, Liu AY, Fan C, Zheng H, Li Y, Zhang C, Wu S, Yu D, Huang Z, Liu F, Luo Q, Yang CJ, Ouyang G. 2015. MicroRNA-33b Inhibits Breast Cancer Metastasis by Targeting HMGA2, SALL4 and Twist1. *Scientific reports*, 5: 9995. DOI 10.1038/srep09995.
- Long J-E, Chen H-X. 2009. Identification and characteristics of cattle microRNAs by homology searching and small RNA cloning. *Biochemical genetics*, 47 (5-6): 329–343. DOI 10.1007/s10528-009-9234-6.
- Lu TX, Rothenberg ME. 2018. MicroRNA. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 141 (4): 1202–1207. DOI 10.1016/j.jaci.2017.08.034.
- Luoreng Z-M, Wang X-P, Mei C-G, Zan L-S. 2018. Comparison of microRNA Profiles between Bovine Mammary Glands Infected with *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *International journal of biological sciences*, 14 (1): 87–99. DOI 10.7150/ijbs.22498.
- Ma Y. 2018. The Challenge of microRNA as a Biomarker of Epilepsy. *Current neuropharmacology*, 16 (1): 37–42. DOI 10.2174/1570159X15666170703102410.
- Maekawa M, Beauchemin KA, Christensen DA. 2002. Effect of Concentrate Level and Feeding Management on Chewing Activities, Saliva Production, and Ruminal pH of Lactating Dairy Cows. *Journal of dairy science*, 85 (5): 1165–1175. DOI 10.3168/jds.S0022-0302(02)74179-9.
- Malvisi M, Palazzo F, Morandi N, Lazzari B, Williams JL, Pagnacco G, Minozzi G. 2016. Responses of Bovine Innate Immunity to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Infection Revealed by Changes in Gene Expression and Levels of MicroRNA. *PLoS one*, 11 (10): e0164461. DOI 10.1371/journal.pone.0164461.
- Mao SY, Zhang RY, Wang DS, Zhu WY. 2013. Impact of subacute ruminal acidosis (SARA) adaptation on rumen microbiota in dairy cattle using pyrosequencing. *Anaerobe*, 24: 12–19. DOI 10.1016/j.anaerobe.2013.08.003.
- Maudet C, Mano M, Eulalio A. 2014. MicroRNAs in the interaction between host and bacterial pathogens. *FEBS letters*, 588 (22): 4140–4147. DOI 10.1016/j.febslet.2014.08.002.
- Maulfair DD, McIntyre KK, Heinrichs AJ. 2013. Subacute ruminal acidosis and total mixed ration preference in lactating dairy cows. *Journal of dairy science*, 96 (10): 6610–6620. DOI 10.3168/jds.2013-6771.
- Mazzarella R, Bastos NM, Bridi A, Del Collado M, Andrade GM, Pinzon J, Prado CM, Silva LA, Meirelles FV, Pugliesi G, Perecin F, da Silveira JC. 2021. Changes in Oviductal Cells

- and Small Extracellular Vesicles miRNAs in Pregnant Cows. *Frontiers in veterinary science*, 8: 639752. DOI 10.3389/fvets.2021.639752.
- Meltzer PS. 2005. Cancer genomics: small RNAs with big impacts. *Nature*, 435 (7043): 745–746. DOI 10.1038/435745a.
- Meng F, Henson R, Wehbe-Janek H, Ghoshal K, Jacob ST, Patel T. 2007. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology*, 133 (2): 647–658. DOI 10.1053/j.gastro.2007.05.022.
- Mgassa MN, Amaya-Posada G, Hesselholt M. 1984. Pododermatitis aseptica diffusa (laminitis) in free range beef cattle in tropical Africa. *The Veterinary record*, 115 (16): 413–414. DOI 10.1136/vr.115.16.413.
- Mohr AM, Mott JL. 2015. Overview of microRNA biology. *Seminars in liver disease*, 35 (1): 3–11. DOI 10.1055/s-0034-1397344.
- Morenikeji OB, Wallace M, Strutton E, Bernard K, Yip E, Thomas BN. 2020. Integrative Network Analysis of Predicted miRNA-Targets Regulating Expression of Immune Response Genes in Bovine Coronavirus Infection. *Frontiers in genetics*, 11: 584392. DOI 10.3389/fgene.2020.584392.
- Morgante M, Giancesella M, Casella S, Ravarotto L, Stelletta C, Giudice E. 2009. Blood gas analyses, ruminal and blood pH, urine and faecal pH in dairy cows during subacute ruminal acidosis. *Comparative Clinical Pathology*, 18 (3): 229–232. DOI 10.1007/s00580-008-0793-4.
- Morgante M, Stelletta C, Berzaghi P, Giancesella M, Andrighetto I. 2007. Subacute rumen acidosis in lactating cows: an investigation in intensive Italian dairy herds. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 91 (5-6): 226–234. DOI 10.1111/j.1439-0396.2007.00696.x.
- Mukiibi R, Johnston D, Vinsky M, Fitzsimmons C, Stothard P, Waters SM, Li C. 2020. Bovine hepatic miRNAome profiling and differential miRNA expression analyses between beef steers with divergent feed efficiency phenotypes. *Scientific reports*, 10 (1): 19309. DOI 10.1038/s41598-020-73885-5.
- Munker R, Calin GA. 2013. MicroRNAs and Other Non-Coding RNAs: Implications for Cancer Patients. In: Alahari S, Hrsg. *MicroRNA in Cancer*. Dordrecht: Springer.
- Nagaraja TG, Titgemeyer EC. 2007. Ruminant acidosis in beef cattle: the current microbiological and nutritional outlook. *Journal of dairy science*, 90 Suppl 1: E17-38. DOI 10.3168/jds.2006-478.

- Neubauer V, Petri R, Humer E, Kröger I, Mann E, Reisinger N, Wagner M, Zebeli Q. 2018. High-grain diets supplemented with phytogetic compounds or autolyzed yeast modulate ruminal bacterial community and fermentation in dry cows. *Journal of dairy science*, 101 (3): 2335–2349. DOI 10.3168/jds.2017-13565.
- Neudecker V, Yuan X, Bowser JL, Eltzschig HK. 2017. MicroRNAs in mucosal inflammation. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, 95 (9): 935–949. DOI 10.1007/s00109-017-1568-7.
- Nocek JE. 1997. Bovine Acidosis: Implications on Laminitis. *Journal of dairy science*, 80 (5): 1005–1028. DOI 10.3168/jds.S0022-0302(97)76026-0.
- Nordlund KV, Garrett EF, Oetzel GR. 1995. herd-based rumenocentesis: a clinical approach to the diagnosis of subacute rumen acidosis. *The Compendium on continuing education for the practicing veterinarian - Food Animal*, (17): 48–56.
- Oetzel GR. 2000. Clinical aspects of ruminal acidosis in dairy cattle. Smith, R.A (Ed.), *Proceedings of the 33rd Annual Meeting on American Association of Bovine Practice* 33: 46–53.
- Oetzel GR. 2007. Subacute ruminal acidosis in dairy herds: physiology, pathophysiology, milk fat responses, and nutritional management. *40th Annual Conference, American Association of Bovine Practitioners*, (Vol. 17): 89–119.
- Okamoto T, Okabe S. 2000. Ultraviolet absorbance at 260 and 280 nm in RNA measurement is dependent on measurement solution. *International journal of molecular medicine*, 5 (6): 657–659. DOI 10.3892/ijmm.5.6.657.
- Owens FN, Secrist DS, Hill WJ, Gill DR. 1998. Acidosis in cattle: a review. *Journal of animal science*, 76 (1): 275–286. DOI 10.2527/1998.761275x.
- Plaizier JC, Krause DO, Gozho GN, McBride BW. 2008. Subacute ruminal acidosis in dairy cows: the physiological causes, incidence and consequences. *Veterinary journal (London, England : 1997)*, 176 (1): 21–31. DOI 10.1016/j.tvjl.2007.12.016.
- Putz EJ, Putz AM, Jeon H, Lippolis JD, Ma H, Reinhardt TA, Casas E. 2019. MicroRNA profiles of dry secretions through the first three weeks of the dry period from Holstein cows. *Scientific reports*, 9 (1): 19658. DOI 10.1038/s41598-019-56193-5.

- Ranganathan K, Sivasankar V. 2014. MicroRNAs - Biology and clinical applications. *Journal of oral and maxillofacial pathology : JOMFP*, 18 (2): 229–234. DOI 10.4103/0973-029X.140762.
- Salilew-Wondim D, Ahmad I, Gebremedhn S, Sahadevan S, Hossain MDM, Rings F, Hoelker M, Tholen E, Neuhoff C, Looft C, Schellander K, Tesfaye D. 2014. The expression pattern of microRNAs in granulosa cells of subordinate and dominant follicles during the early luteal phase of the bovine estrous cycle. *PloS one*, 9 (9): e106795. DOI 10.1371/journal.pone.0106795.
- Saliminejad K, Khorram Khorshid HR, Soleymani Fard S, Ghaffari SH. 2019. An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods. *Journal of cellular physiology*, 234 (5): 5451–5465. DOI 10.1002/jcp.27486.
- Salomon F-V. 2015. Mehrhöhliger Magen. In: Salomon F-V, Geyer H, Gille U, Achilles W, Hrsg. *Anatomie für die Tiermedizin*. Dritte., aktualisierte und erw. Aufl. Stuttgart: Enke, 296–305.
- Scanlan CM, Hathcock TL. 1983. Bovine rumenitis - liver abscess complex: a bacteriological review. *The Cornell veterinarian*, 73 (3): 288–297.
- Shangguan A, Zhou H, Sun W, Ding R, Li X, Liu J, Zhou Y, Chen X, Ding F, Yang L, Zhang S. 2020. Cryopreservation Induces Alterations of miRNA and mRNA Fragment Profiles of Bull Sperm. *Frontiers in genetics*, 11: 419. DOI 10.3389/fgene.2020.00419.
- Singh J, Dhanoa JK, Choudhary RK, Singh A, Sethi RS, Kaur S, Mukhopadhyay CS. 2020. MicroRNA expression profiling in PBMCs of Indian water Buffalo (*Bubalus bubalis*) infected with *Brucella* and Johne's disease. *ExRNA*, 2 (1): 8. DOI 10.1186/s41544-020-00049-y.
- Singh J, Mukhopadhyay CS, Kaur S, Malhotra P, Sethi RS, Choudhary RK. 2016. Identification of the MicroRNA Repertoire in TLR-Ligand Challenged Bubaline PBMCs as a Model of Bacterial and Viral Infection. *PloS one*, 11 (6): e0156598. DOI 10.1371/journal.pone.0156598.
- Staedel C, Darfeuille F. 2013. MicroRNAs and bacterial infection. *Cellular microbiology*, 15 (9): 1496–1507. DOI 10.1111/cmi.12159.
- Su W-B, Liu Z-Y. 2018. MiR-431 inhibits colorectal cancer cell invasion via repressing CUL4B. *European review for medical and pharmacological sciences*, 22 (10): 3047–3052. DOI 10.26355/eurrev_201805_15062.

- Sun, Hui-Zeng, Chen, Yanhong, Le Guan, Luo. 2019. MicroRNA expression profiles across blood and different tissues in cattle. *Scientific data*, 6: 190013. DOI 10.1038/sdata.2019.13.
- Sun, Y-W, Li, X-H, Wang, H., Wu, J. 2019. MiR-431 is a prognostic marker and suppresses cell growth, migration and invasion by targeting NOTCH2 in melanoma. *European review for medical and pharmacological sciences*, 23 (9): 3876–3884. DOI 10.26355/eurrev_201905_17815.
- Tafaj M, Zebeli Q, Maulbetsch A, Steingass H, Drochner W. 2006. Effects of fibre concentration of diets consisting of hay and slowly degradable concentrate on ruminal fermentation and digesta particle size in mid-lactation dairy cows. *Archives of animal nutrition*, 60 (3): 254–266. DOI 10.1080/17450390600679322.
- TAJIK J, NADALIAN MG, RAOOFI A, MOHAMMADI GR, BAHONAR AR. 2009. Prevalence of subacute ruminal acidosis in some dairy herds of Khorasan Razavi province, northeast of Iran. *Iranian Journal of Veterinary Research*, (Vol. 10): 28–32.
- Tatsuguchi M, Seok HY, Callis TE, Thomson JM, Chen J-F, Newman M, Rojas M, Hammond SM, Wang D-Z. 2007. Expression of microRNAs is dynamically regulated during cardiomyocyte hypertrophy. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 42 (6): 1137–1141. DOI 10.1016/j.yjmcc.2007.04.004.
- Trobaugh DW, Klimstra WB. 2017. MicroRNA Regulation of RNA Virus Replication and Pathogenesis. *Trends in molecular medicine*, 23 (1): 80–93. DOI 10.1016/j.molmed.2016.11.003.
- Ullah S, John P, Bhatti A. 2014. MicroRNAs with a role in gene regulation and in human diseases. *Molecular biology reports*, 41 (1): 225–232. DOI 10.1007/s11033-013-2855-1.
- Vegh P, Magee DA, Nalpas NC, Bryan K, McCabe MS, Browne JA, Conlon KM, Gordon SV, Bradley DG, MacHugh DE, Lynn DJ. 2015. MicroRNA profiling of the bovine alveolar macrophage response to *Mycobacterium bovis* infection suggests pathogen survival is enhanced by microRNA regulation of endocytosis and lysosome trafficking. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*, 95 (1): 60–67. DOI 10.1016/j.tube.2014.10.011.
- Vollmerhaus B, Roos H. 2004. Speiseröhre, Magen, Darm und Darmanhangsdrüsen. In: Nickel R, Schummer A, Seiferle E, Frewein J, Hrsg. *Eingeweide*. Neunte., unveränd. Aufl. Stuttgart: Parey, 103–213.

- Wang D, Liang G, Wang B, Sun H, Liu J, Le Guan L. 2016. Systematic microRNAome profiling reveals the roles of microRNAs in milk protein metabolism and quality: insights on low-quality forage utilization. *Scientific reports*, 6: 21194. DOI 10.1038/srep21194.
- Wang J, Yu Z, Wang J, Shen Y, Qiu J, Zhuang Z. 2020. LncRNA NUTM2A-AS1 positively modulates TET1 and HIF-1A to enhance gastric cancer tumorigenesis and drug resistance by sponging miR-376a. *Cancer medicine*, 9 (24): 9499–9510. DOI 10.1002/cam4.3544.
- Wetzels SU, Mann E, Pourazad P, Kumar M, Piniór B, Metzler-Zebeli BU, Wagner M, Schmitz-Esser S, Zebeli Q. 2017. Epimural bacterial community structure in the rumen of Holstein cows with different responses to a long-term subacute ruminal acidosis diet challenge. *Journal of dairy science*, 100 (3): 1829–1844. DOI 10.3168/jds.2016-11620.
- Wienholds E, Plasterk RHA. 2005. MicroRNA function in animal development. *FEBS letters*, 579 (26): 5911–5922. DOI 10.1016/j.febslet.2005.07.070.
- Wojciechowska A, Braniewska A, Kozar-Kamińska K. 2017. MicroRNA in cardiovascular biology and disease. *Advances in clinical and experimental medicine : official organ Wrocław Medical University*, 26 (5): 865–874. DOI 10.17219/acem/62915.
- Wu K-Z, Zhang C-D, Zhang C, Pei J-P, Dai D-Q. 2020. miR-665 Suppresses the Epithelial-Mesenchymal Transition and Progression of Gastric Cancer by Targeting CRIM1. *Cancer management and research*, 12: 3489–3501. DOI 10.2147/CMAR.S241795.
- Xin M, Small EM, Sutherland LB, Qi X, McAnally J, Plato CF, Richardson JA, Bassel-Duby R, Olson EN. 2009. MicroRNAs miR-143 and miR-145 modulate cytoskeletal dynamics and responsiveness of smooth muscle cells to injury. *Genes & development*, 23 (18): 2166–2178. DOI 10.1101/gad.1842409.
- Xu P, Vernooij SY, Guo M, Hay BA. 2003. The Drosophila MicroRNA Mir-14 Suppresses Cell Death and Is Required for Normal Fat Metabolism. *Current Biology*, 13 (9): 790–795. DOI 10.1016/s0960-9822(03)00250-1.
- Xuan R, Chao T, Wang A, Zhang F, Sun P, Liu S, Guo M, Wang G, Ji Z, Wang J, Cheng M. 2020. Characterization of microRNA profiles in the mammary gland tissue of dairy goats at the late lactation, dry period and late gestation stages. *PloS one*, 15 (6): e0234427. DOI 10.1371/journal.pone.0234427.
- Xue M, Wang K, Wang A, Li R, Wang Y, Sun S, Yan D, Song G, Xu H, Sun G, Li M. 2019. MicroRNA Sequencing Reveals the Effect of Different Levels of Non-Fibrous

Carbohydrate/Neutral Detergent Fiber on Rumen Development in Calves. *Animals : an open access journal from MDPI*, 9 (8). DOI 10.3390/ani9080496.

Yang J, Zhu H, Jin Y, Song Y. 2018. MiR-431 inhibits cell proliferation and induces cell apoptosis by targeting CDK14 in pancreatic cancer. *European review for medical and pharmacological sciences*, 22 (14): 4493–4499. DOI 10.26355/eurev_201807_15503.

Yang W, Zhao J, Zhao Y, Li W, Zhao L, Ren Y, Ou R, Xu Y. 2020. Hsa_circ_0048179 attenuates free fatty acid-induced steatosis via hsa_circ_0048179/miR-188-3p/GPX4 signaling. *Aging*, 12 (23): 23996–24008. DOI 10.18632/aging.104081.

Ye Y-L, Yin J, Hu T, Zhang L-P, Wu L-Y, Pang Z. 2019. Increased circulating circular RNA_103516 is a novel biomarker for inflammatory bowel disease in adult patients. *World journal of gastroenterology*, 25 (41): 6273–6288. DOI 10.3748/wjg.v25.i41.6273.

Yin H, Song P, Su R, Yang G, Dong L, Luo M, Wang B, Gong B, Liu C, Song W, Wang F, Ma Y, Zhang J, Wang W, Yu J. 2016. DNA Methylation mediated down-regulating of MicroRNA-33b and its role in gastric cancer. *Scientific reports*, 6: 18824. DOI 10.1038/srep18824.

Yu X, Fang X, Gao M, Mi J, Zhang X, Xia L, Zhao Z, Albrecht E, Maak S, Yang R. 2020. Isolation and Identification of Bovine Preadipocytes and Screening of MicroRNAs Associated with Adipogenesis. *Animals : an open access journal from MDPI*, 10 (5). DOI 10.3390/ani10050818.

Zebeli Q, Dijkstra J, Tafaj M, Steingass H, Ametaj BN, Drochner W. 2008. Modeling the adequacy of dietary fiber in dairy cows based on the responses of ruminal pH and milk fat production to composition of the diet. *Journal of dairy science*, 91 (5): 2046–2066. DOI 10.3168/jds.2007-0572.

Zebeli Q, Metzler-Zebeli BU. 2012. Interplay between rumen digestive disorders and diet-induced inflammation in dairy cattle. *Research in veterinary science*, 93 (3): 1099–1108. DOI 10.1016/j.rvsc.2012.02.004.

Zendjabil M, Favard S, Tse C, Abbou O, Hainque B. 2017. Les microRNA comme biomarqueurs : quelles perspectives ? *Comptes rendus biologies*, 340 (2): 114–131. DOI 10.1016/j.crv.2016.12.001.

Zhao Y, Wu C, Li L. 2017. MicroRNA-33b inhibits cell proliferation and glycolysis by targeting hypoxia-inducible factor-1 α in malignant melanoma. *Experimental and therapeutic medicine*, 14 (2): 1299–1306. DOI 10.3892/etm.2017.4702.

Zhong T, Hu J, Xiao P, Zhan S, Wang L, Guo J, Li L, Zhang H, Niu L. 2017. Identification and Characterization of MicroRNAs in the Goat (*Capra hircus*) Rumen during Embryonic Development. *Frontiers in genetics*, 8: 163. DOI 10.3389/fgene.2017.00163.

12. ANHANGSVERZEICHNIS

TABELLE S 1: MIRNAS, NUR EXPRIMIERT IN DER KONTROLLGRUPPE. AUFGELISTETE MIRNAS FANDEN SICH NICHT IN DER GRUPPE MIT PHYTOGENEN ZUSATZSTOFFEN WIEDER. DIE SPALTEN SIND EINZELN ZU BETRACHTEN.	87
TABELLE S 2: MIRNAS, WELCHE INNERHALB DER KONTROLLGRUPPE ENTWEDER NUR WÄHREND DER GRUNDFUTTERRATION ODER NUR WÄHREND DER KONZENTRATREICHEN RATION EXPRIMIERT WURDEN. DIE MIRNAS BEZIEHEN SICH REIN AUF DEN VERGLEICH DER MIRNAS DER KONTROLLGRUPPE WOCHE 1 VS. KONTROLLGRUPPE WOCHE 2. SOMIT KÖNNEN SIE AUCH IN DER GRUPPE MIT PHYTOGENEN ZUSATZSTOFFEN EXPRIMIERT WORDEN SEIN.	88
TABELLE S 3: MIRNAS NUR IN DER GRUPPE MIT PHYTOGENEN ZUSATZSTOFFEN EXPRIMIERT. WÄHREND DER GRUNDFUTTERRATION: HIER WURDEN ALLE MIRNAS DER KONTROLLGRUPPE UND ALLE MIRNAS DER GRUPPE MIT DEN PHYTOGENEN ZUSATZSTOFFEN, DIE WÄHREND DER GRUNDFUTTERFÜTTERUNG EXPRIMIERT WURDEN, VERGLICHEN. WÄHREND DER KONZENTRATREICHEN RATION: HIER WURDEN ALLE MIRNAS DER KONTROLLGRUPPE UND ALLE MIRNAS DER GRUPPE MIT DEN PHYTOGENEN ZUSATZSTOFFEN, DIE WÄHREND DER KONZENTRATREICHEN DIÄT EXPRIMIERT WURDEN, VERGLICHEN. AUFGELISTETE MIRNAS FANDEN SICH NICHT IN DER KONTROLLGRUPPE WIEDER. DIE SPALTEN SIND EINZELN ZU BETRACHTEN.....	89
TABELLE S 4: MIRNAS EXPRIMIERT NUR IN WOCHE 1 BZW. NUR IN WOCHE 2 DER GRUPPE MIT PHYTOGENEN ZUSATZSTOFFEN. DIE MIRNAS BEZIEHEN SICH REIN AUF DEN VERGLEICH DER MIRNAS DER GRUPPE MIT PHYTOGENEM ZUSATZSTOFF WOCHE 1 VS. GRUPPE MIT PHYTOGENEN ZUSATZSTOFFEN WOCHE 2. SOMIT KÖNNTEN SIE AUCH IN DER KONTROLLGRUPPE EXPRIMIERT WORDEN SEIN.	90

13. ANHANG

Tabelle S 1: miRNAs, nur exprimiert in der Kontrollgruppe. Aufgelistete miRNAs fanden sich nicht in der Gruppe mit phylogenen Zusatzstoffen wieder. Die Spalten sind einzeln zu betrachten.

	Exklusiv exprimierte miRNAs der Kontrollgruppe	
	Während der Grundfütterration	Während der konzentratreichen Ration
1	bta-miR-2474	bta-miR-2316
2	hsa-miR-15a-3p	bta-miR-449a
3	bta-miR-2285ar	bta-miR-2440
4	bta-miR-2285bd	bta-miR-2431-3p
5	bta-miR-9851	bta-miR-11974
6	bta-miR-376c	bta-miR-323b-3p
7	hsa-miR-376c-5p	bta-miR-2285bb
8	bta-miR-11993	bta-miR-6536
9	bta-miR-2285bb	bta-miR-1291
10	bta-miR-545-3p	bta-miR-2448-5p
11	bta-miR-3064	bta-miR-2483-3p
12	bta-miR-11997	bta-miR-2349
13	bta-miR-2285ag-3p	hsa-miR-541-5p
14	hsa-miR-204-3p	
15	bta-miR-2285bp	
16	hsa-miR-92a-1-5p	
17	bta-miR-2403	
18	bta-miR-11990	
19	bta-miR-6527	
20	hsa-miR-138-2-3p	

Tabelle S 2: miRNAs, welche innerhalb der Kontrollgruppe entweder nur während der Grundfutterration oder nur während der konzentratreichen Ration exprimiert wurden. Die miRNAs beziehen sich rein auf den Vergleich der miRNAs der Kontrollgruppe Woche 1 vs. Kontrollgruppe Woche 2. Somit können sie auch in der Gruppe mit phytoenen Zusatzstoffen exprimiert worden sein.

	miRNAs der Kontrollgruppe während beider Diäten im Vergleich	
	Grundfutterration	Konzentratreiche Ration
1	bta-miR-6516	hsa-miR-412-5p
2	bta-miR-10167-3p	bta-miR-2320-5p
3	bta-miR-2285cd	bta-miR-2427
4	bta-miR-2285ai-5p	bta-miR-431
5	bta-miR-2284ac	bta-miR-411c-3p
6	bta-miR-2285au	bta-miR-2483-5p
7	bta-miR-2339	bta-miR-11971
8	bta-miR-154b	hsa-miR-19b-1-5p
9	bta-miR-2285bz	bta-miR-2285di
10	bta-miR-2382-3p	bta-miR-584
11	bta-miR-33b	bta-miR-1291
12	bta-miR-487a	bta-miR-2448-5p
13	bta-miR-10162-5p	bta-miR-2483-3p
14	bta-miR-7180	bta-miR-2349
15	bta-miR-376c	hsa-miR-188-3p
16	hsa-miR-376c-5p	bta-miR-2285bg
17	bta-miR-11993	hsa-miR-541-5p
18	bta-miR-2285be	
19	bta-miR-502b	
20	bta-miR-3064	
21	bta-miR-545-5p	
22	bta-miR-2320-3p	
23	bta-miR-665	
24	bta-miR-11997	
25	bta-miR-2285ag-3p	
26	bta-miR-411b	
27	hsa-miR-204-3p	
28	hsa-miR-1468-3p	
29	hsa-miR-376a-5p	
30	bta-miR-2285bp	
31	bta-miR-656	

32	hsa-miR-92a-1-5p	
33	bta-miR-2403	
34	bta-miR-11990	
35	bta-miR-2454-3p	
36	bta-miR-6527	
37	hsa-miR-138-2-3p	

Tabelle S 3: miRNAs nur in der Gruppe mit phylogenen Zusatzstoffen exprimiert. Während der Grundfütterration: hier wurden alle miRNAs der Kontrollgruppe und alle miRNAs der Gruppe mit den phylogenen Zusatzstoffen, die während der Grundfütterfütterung exprimiert wurden, verglichen. Während der konzentratreichen Ration: hier wurden alle miRNAs der Kontrollgruppe und alle miRNAs der Gruppe mit den phylogenen Zusatzstoffen, die während der konzentratreichen Diät exprimiert wurden, verglichen. Aufgelistete miRNAs fanden sich nicht in der Kontrollgruppe wieder. Die Spalten sind einzeln zu betrachten.

	Exklusiv exprimierte miRNAs der Gruppe mit phylogenen Zusatzstoffen	
	Während der Grundfütterration	Während der konzentratreichen Ration
1	hsa-miR-412-5p	bta-miR-6516
2	bta-miR-2320-5p	bta-miR-10167-3p
3	bta-miR-2427	bta-miR-2285cd
4	bta-miR-431	bta-miR-2285ai-5p
5	bta-miR-11975	bta-miR-2284ac
6	bta-miR-11976	bta-miR-2285au
7	bta-miR-411c-3p	bta-miR-2339
8	bta-miR-6122-3p	bta-miR-154b
9	hsa-miR-376a-3p	bta-miR-2285bz
10	bta-miR-376a	bta-miR-2382-3p
11	bta-miR-191b	bta-miR-33b
12	bta-miR-2285ac	bta-miR-487a
13	bta-miR-2285bx	bta-miR-7180
14	bta-miR-584	bta-miR-376c
15	bta-miR-376b	hsa-miR-376c-5p
16	bta-miR-11985	bta-miR-11975
17	bta-miR-2448-5p	bta-miR-11976
18	bta-miR-2397-5p	bta-miR-11993
19	bta-miR-2285ak-5p	bta-miR-6122-3p
20	bta-miR-11982	bta-miR-502b
21	bta-miR-2285bu	hsa-miR-376a-3p
22	bta-miR-2457	bta-miR-376a

23	bta-miR-10164-3p	bta-miR-191b
24	bta-miR-2285v	bta-miR-3064
25	bta-miR-2400	bta-miR-2285ac
26	bta-miR-2425-5p	bta-miR-545-5p
27	bta-miR-2285cu	bta-miR-2285bx
28	hsa-miR-541-5p	bta-miR-665
29	bta-miR-2475	bta-miR-11997
30		bta-miR-376b
31		bta-miR-2419-3p
32		bta-miR-2397-5p
33		bta-miR-2285ak-5p
34		bta-miR-2285bp
35		bta-miR-2285at
36		bta-miR-2285bu
37		bta-miR-2457
38		bta-miR-2285cq
39		bta-miR-11984
40		bta-miR-12008
41		bta-miR-2313-3p

Tabelle S 4: miRNAs exprimiert nur in Woche 1 bzw. nur in Woche 2 der Gruppe mit phytoenen Zusatzstoffen. Die miRNAs beziehen sich rein auf den Vergleich der miRNAs der Gruppe mit phytoenem Zusatzstoff Woche 1 vs. Gruppe mit phytoenen Zusatzstoffen Woche 2. Somit könnten sie auch in der Kontrollgruppe exprimiert worden sein.

	miRNAs der Gruppe mit phytoenem Zusatzstoff während beider Diäten im Vergleich	
	Grundfutterration	Konzentratreiche Ration
1	bta-miR-2316	bta-miR-2474
2	bta-miR-449a	hsa-miR-15a-3p
3	bta-miR-2440	bta-miR-2285ar
4	bta-miR-2431-3p	bta-miR-2285bd
5	bta-miR-11974	bta-miR-9851
6	bta-miR-323b-3p	bta-miR-376c
7	bta-miR-10162-5p	hsa-miR-376c-5p
8	bta-miR-2285be	bta-miR-11993

9	bta-miR-6536	bta-miR-2483-5p
10	bta-miR-2320-3p	bta-miR-545-3p
11	bta-miR-411b	bta-miR-11971
12	bta-miR-11985	bta-miR-3064
13	bta-miR-2448-5p	hsa-miR-19b-1-5p
14	hsa-miR-1468-3p	bta-miR-2285di
15	hsa-miR-376a-5p	bta-miR-11997
16	bta-miR-656	bta-miR-2419-3p
17	bta-miR-11982	bta-miR-2285bp
18	bta-miR-10164-3p	bta-miR-2285at
19	bta-miR-2454-3p	hsa-miR-188-3p
20	bta-miR-2285v	bta-miR-2285cq
21	bta-miR-2400	bta-miR-2285bg
22	bta-miR-2425-5p	bta-miR-11984
23	bta-miR-2285cu	bta-miR-12008
24	hsa-miR-541-5p	bta-miR-2313-3p
25	bta-miR-2475	