

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

Institut für Tierernährung und funktionelle Pflanzenstoffe
Arbeitsgruppe Nutrigenomik
(Leitung Assistenz Professorin Dr. rer. agr. Susanne Kreuzer-Redmer)

**Untersuchung von microRNAs und deren Potential als Biomarker
für Pansengesundheit während einer konzentratreichen Fütterung
bei Schwarzbunten Kühen mit und ohne phytoenen
Futtermittelzusatzstoff**

Diplomarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von
Lisa Hajek

Wien im September, 2022

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

Gutachter:

Univ.-Prof. Dr. Marc Drillich Dipl. ECAR Dipl. ECBHM

Bestandsbetreuung bei Wiederkäuern

Universitätsklinik für Wiederkäuer

Department für Nutztiere und öffentliches Gesundheitswesen

Veterinärmedizinische Universität Wien

Inhaltsverzeichnis

1.	Abkürzungsverzeichnis.....	V
2.	Einleitung.....	1
3.	Literaturübersicht.....	2
3.1.	Subakute Pansenazidose.....	2
3.1.1.	Pansenphysiologie.....	2
3.1.2.	Definition.....	3
3.1.3.	Ätiologie.....	3
3.1.4.	Pathophysiologie und klinisches Bild.....	4
3.1.5.	Einfluss von Futteradditiven.....	5
3.1.6.	Diagnostik.....	5
3.2.	MiRNA.....	6
3.2.1.	Definition.....	6
3.2.2.	Biogenese und Mechanismus.....	6
3.2.3.	MiRNAs als Biomarker.....	7
4.	Material und Methoden.....	9
4.1.	Tiere und Aufstallung.....	9
4.2.	Fütterung.....	9
4.3.	SARA Kuh Modell.....	10
4.4.	Probenentnahme und Lagerung.....	10
4.4.1.	Plasma und Leukozyten.....	10
4.4.2.	Papillen.....	11
4.5.	miRNA Isolierung.....	12
4.5.1.	Plasma.....	12
4.5.2.	Leukozyten.....	15
4.5.3.	Papillen.....	17
4.6.	Konzentrationsmessung.....	17
4.7.	Polyadenylierung.....	18
4.8.	cDNA-Synthese.....	19
4.9.	Primer Etablierung.....	19
4.10.	Quantitative PCR.....	20
4.11.	Auswertung und Statistik.....	21
5.	Ergebnisse.....	22

5.1.	Primeretablierung.....	22
5.2.	Plasma	23
5.3.	Leukozyten.....	27
5.4.	Papillen	31
6.	Diskussion	37
7.	Conclusio	41
8.	Zusammenfassung	42
9.	Summary	43
10.	Abbildungsverzeichnis	44
11.	Tabellenverzeichnis	48
12.	Literaturverzeichnis.....	49

1. Abkürzungsverzeichnis

CON	Kontrollgruppe
GF	Grundfütterung, Woche 1
KF	Konzentrat-Fütterung
KF 1	1 Woche Konzentrat-Fütterung (ohne Adaptionsswoche), Woche 2
KF 3	3 Wochen Konzentrat-Fütterung (ohne Adaptionsswoche), Woche 4
miRNA	microRNA
MW	Mittelwert
NGS	Next-Generation-Sequencing
PeNDF	physikalisch wirksame Rohfaser
PHY	Tiere mit Fütterung von phytogenen Zusatzfuttermitteln
SARA	subakute Pansenazidose
SCFA	kurzkettige Fettsäuren

2. Einleitung

Die Prävalenz der subakuten Pansenazidose (SARA) liegt in Milchviehherden zwischen 11 % und 26 %, könnte jedoch aufgrund der mangelnden diagnostischen Möglichkeiten noch höher sein (Humer et al. 2018). Zudem sind wirtschaftliche Aspekte, durch Einbußen der Milchleistung, und der Tierwohlaspekt erhebliche Gründe, die Früherkennung von SARA zu optimieren (Krause und Oetzel 2006, Enemark 2008). Die möglichen Konsequenzen von SARA beinhalten schlechtere Futteraufnahme, schlechtere Verdauung von Faser, Durchfall, Milchfettdepression, Klauenerkrankungen, Leberabszesse und stehen eng im Zusammenhang mit Entzündungsprozessen (Plazier et al. 2008, Dijkstra 2011). Die große Herausforderung in der Vermeidung von SARA stellt die Aufrechterhaltung von einem Gleichgewicht zwischen energiereichem Futter und der damit verbundenen Leistung der Tiere dar, ohne dabei die Pansen-Gesundheit zu beeinträchtigen (Zebeli et al. 2008). Als Risikovermeidung beschreiben Zebeli et al. (2008) stets einen täglichen durchschnittlichen Pansen-pH-Wert von 6,16 nicht zu unterschreiten sowie nicht für mehr als 5,24 h/Tag einen Pansen-pH-Wert <5,8 zu erreichen. Problematisch ist hierbei die Überwachung des Pansen pH-Werts, da sie durch die notwendige Pansensaftentnahme entweder durch Ruminozentese sehr invasiv oder durch Entnahme via Sonde ungenau ist und der Wert tagesabhängig stark schwanken kann (Enemark 2008, Zebeli et al. 2008). Dahingehend ist die Etablierung eines Biomarkers für SARA ein essenzieller Schritt für die Herdengesundheit.

In einer vorhergehenden Arbeit von Svenja Johanns wurde die Expression von microRNAs (miRNA) und deren Potential als Biomarker im Blut zu fungieren mittels Next-Generation-Sequencing (NGS) in einer strukturreichen Grundfütterung im Vergleich zu einer kraftfutterreichen Ration untersucht (Johanns 2021). Bei dieser Studie wurden 6 miRNAs identifiziert (bta-miR-2285u, bta-miR-30b-3p, bta-miR-12034, bta-miR-11982, bta-miR-1306, bta-miR-1388-5p), welche basierend auf der Anzahl an gezählten Sequenzabschnitten (read counts) sowie deren Potential bei kraftfutterreicher Fütterung in höheren Konzentrationen im Blut zu zirkulieren, ausgewählt wurden.

Ziel dieser Arbeit ist die Validierung der NGS-Resultate durch die Ermittlung der relativen Expression der oben genannten miRNAs in verschiedenen Fütterungsregimen durch RT-qPCR und damit verbunden (i) die Etablierung von passenden miRNA Primern, (ii) die Evaluierung von miRNAs als potenzielle Biomarker für SARA und (iii) der Überprüfung, ob die Supplementierung von phytogenen Zusatzfuttermitteln das Expressionsprofil verändert.

3. Literaturübersicht

3.1. Subakute Pansenazidose

3.1.1. Pansenphysiologie

Eine wichtige Funktion des Pansens ist die mechanische Bearbeitung und enzymatische Spaltung des Futters durch die Pansenmikroben in kurzkettige Fettsäuren. Diese Fettsäuren stellen die Hauptenergiequelle der Rinder dar und werden passiv über die Pansenschleimhaut aufgenommen. Außerdem ist der Pansen mit einer kutanen Schleimhaut ausgekleidet, welche Zotten ausbildet, die fütterungsbedingt in ihrer Größe sehr stark variieren können. So führt eine energiearme, strukturreiche Fütterung zur Abnahme, während eine energiereiche, strukturarme Fütterung zum Wachstum führt, da durch die vermehrte Produktion von kurzkettigen Fettsäuren die Resorptionskapazität durch Oberflächenvergrößerung, also Zottenproliferation erhöht wird und einen drastischen pH-Wert Abfall im Pansen verhindert (Krause und Oetzel 2006, Salomon et al. 2008).

Durch die Fermentation der Futtermittel entstandenen Fettsäuren sowie das Laktat kann der pH-Wert im Pansen sinken. Um dies zu verhindern, müssen die Fettsäuren entweder durch Passage in die flüssige Phase des Panseninhalts oder durch Absorption in die Pansenwand abtransportiert oder gepuffert werden (Krause und Oetzel 2006, Aschenbach et al. 2009). Die Pufferkapazität der Pansenflüssigkeit ist sehr variabel und es wird angenommen, dass diese hauptsächlich von Bicarbonat (HCO_3) abhängig ist (Dijkstra et al. 2012). Weil HCO_3 im Speichel vorhanden ist (Aschenbach et al. 2008) und die Bildung davon durch die Kauaktivität stimuliert wird, ist eine ausreichende Rohfaser-Aufnahme essenziell (Zebeli et al. 2008). Darüber hinaus hat die Nahrung selbst einen gewissen Anteil an der Pufferkapazität, die an der pH-Regulierung beteiligt ist, was weitgehend durch die Kationenaustauschkapazität von Futtermitteln erklärt wird (Dijkstra et al. 2012).

Der pH-Wert im Pansen ist nicht konstant, sondern schwankt innerhalb von 24 Stunden erheblich in Abhängigkeit zur Futteraufnahme (Krause und Oetzel 2006, Zebeli et al. 2008). Im Allgemeinen steigt die Fettsäurekonzentration nach der Fütterung und der Pansen-pH-Wert sinkt (Dijkstra et al. 2012). Bei Milchkühen mit einem Kraftfutteranteil von über 45 % in der Trockenmischration liegt der durchschnittliche Pansen-pH-Wert zwischen 6,0 und 6,1, wobei er vor der morgendlichen Fütterung zwischen 6,6 und 5,3 und während der intensiven Fermentationsphase zwischen 6,6 und 5,0 liegen kann (Zebeli et al. 2008).

3.1.2. Definition

Die subakute Pansenazidose (SARA) ist durch einen Abfall des Pansen-pH-Werts auf ein nicht-physiologisches Level definiert (Kleen und Cannizzo 2011). Wegen der dauernden pH-Schwankungen kann jedoch der Zeitpunkt der Messung und die Art der Pansensaft-Entnahme den Grenzwert beeinflussen. Aus diesem Grund ist der Wert allein als Definition ungenügend und ist in der Literatur noch nicht konkret festgelegt. Da die Zeitspanne, in der dieser Wert unter einer bestimmten Grenze liegt, dabei eine nicht unwesentliche Rolle spielt, ist die Kombination von pH-Wert und Dauer des Abfalles ein besserer Bestimmungsfaktor für SARA (Zebeli et al. 2008, Plazier et al. 2008). So definieren beispielsweise Gozho et al. (2005) und Plazier et al. (2008) SARA mit einem pH-Wert von $<5,6$ für >3 h pro Tag, während Zebeli et al. (2008) SARA mit einem pH-Wert von $<5,6$ über eine Dauer von $>5-6$ h definieren.

3.1.3. Ätiologie

Kühe entwickeln SARA, wenn der Pansen-pH-Wert über längere Zeit unter einen Grenzwert fällt. Dies ist auf das vermehrte Vorhandensein von organischen Säuren, wie flüchtige Fettsäuren und Milchsäure, mit gleichzeitig mangelnder Pufferung zurückzuführen (Plazier et al. 2008). Die Pufferkapazität und die Fähigkeit Säuren zu absorbieren hängt von der Stärke des pH-Wert Abfalls nach einer Fütterung mit großen Mengen an leicht fermentierbaren Kohlenhydraten ab (Krause und Oetzel 2006), da die Fütterung von kraftfutterreichen Rationen die Produktion von flüchtigen Fettsäuren im Pansen steigert (Plazier et al. 2008). Außerdem spielt der Mangel an physikalisch wirksamer Rohfaser (PeNDF) eine große Rolle in der Entstehung von SARA. Zu wenig Struktur in der Futtermischung hat eine verringerte Wiederkau-Aktivität aufgrund einer schlechten Pansenschichtung zur Folge und führt dadurch zu einem geringen Fluss von HCO_3^- reichem Speichel und verringerter Pansenmotilität. Es wird angenommen, dass die Motilität der Pansenwand die Absorptionsrate von kurzkettigen Fettsäuren (SCFA) erhöht und dadurch das Säure-Basen-Gleichgewicht im Pansen verbessert (Zebeli und Metzler-Zebeli 2012). Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Durchmischung der Futtermischung. Bei unzureichender Mischung wird das Kraftfutter selektiert und führt somit zu einem veränderten Verhältnis von gewollter und tatsächlich aufgenommener Menge an PeNDF in der Trockenmischung. Auch übermäßiges Mischen und das daraus resultierende Zerkleinern der langen Fasern kann das Risiko einer SARA erhöhen (Plazier et al. 2008).

3.1.4. Pathophysiologie und klinisches Bild

Die Epithelzellen im Pansen sind im Gegensatz zu den Labmagenzellen nicht mit Schleim ausgekleidet, weshalb ein niedriger pH-Wert zu Ruminitis und infolgedessen zu weiteren chronischen Problemen wie Parakeratose, Erosion und Ulzeration des Pansenepithels führen kann. Wenn das Epithel entzündet ist, können sich Bakterien in den Papillen ansiedeln und dann aufgrund der verminderten Barrierefunktion der Pansenschleimhaut in den Pfortader-Kreislauf eindringen. Folgen davon können Leberabszesse, Peritonitis rund um die Abszesse sowie das kaudale Vena-Cava-Syndrom sein. Außerdem können sich die Pansenbakterien über den Kreislauf verbreiten und sich in Lunge, Herzklappen, Niere oder in Gelenken ansiedeln und somit Pneumonie, Endokarditis, Pyelonephritis und Arthritis auslösen (Krause und Oetzel 2006, Plazier et al. 2008).

Eines der wichtigsten Ereignisse im Zusammenhang mit SARA ist die Verschiebung des Mikrobioms zugunsten der Laktatbildner (Zebeli und Metzler-Zebeli 2012). Die reduzierte Faserverdauung bei SARA ist höchstwahrscheinlich das Ergebnis der Säureempfindlichkeit der fibrinolytischen Pansenbakterien (Plazier et al. 2008, Zebeli und Metzler-Zebeli 2012), was sich klinisch an überdurchschnittlichen Mengen unverdauter Faser im Kot erkennen lässt (Enemark 2008). Der Kot bei mit SARA betroffenen Rindern ist außerdem hell, gelblich, schaumig und riecht süß-säuerlich (Plazier et al. 2008, Enemark 2008). Ebenso gilt eine verringerte Futteraufnahme in vielen Studien als konsistentes klinisches Zeichen einer SARA. Diese Veränderungen im Fressverhalten könnten im Zusammenhang mit der Osmolarität der Pansenflüssigkeit stehen, da Werte über 300 mOsm/L die Futteraufnahme einschränken und die Fermentation von Faser und Stärke verringern (Keunen et al. 2002, Enemark 2008).

Weitere Folgen einer SARA können das Absinken des Milchfettgehalts (Milchfettdepression) (Plazier et al. 2008, Zebeli und Ametaj 2009) oder auch die Klauenrehe und damit verbunden übermäßiger Hornwachstum, Sohlenabszesse und Sohlengeschwüre sein (Krause und Oetzel 2006). Die Pathogenese der Klauenrehe ist noch unklar, aber es wird vermutet, dass intraruminal freigesetztes vasoaktives Endotoxin in den Blutkreislauf aufgenommen wird und lokal eine Vasokonstriktion auslöst. Diese kann zu einer Hypoxämie und weiter zu Klauenrehe führen. (Enemark 2008).

Tiere reagieren auf ein Trauma oder eine Infektion mit einer Akuten-Phase-Reaktion, welche Teil der angeborenen Immun- und Stoffwechselreaktion ist. Sie zielt darauf ab weitere

Verletzungen zu verhindern, den infektiösen Organismus zu isolieren und zu zerstören, schädliche Moleküle und Bruchstücke zu entfernen und die Reparaturprozesse zu aktivieren, die notwendig sind, um die normale Funktion des Organismus wiederherzustellen (Plazier et al. 2008, Zebeli und Metzler-Zebeli 2012). Bei mit SARA betroffenen Rindern äußert sich dies meist in einem Anstieg der Akute-Phase-Proteine, von denen LPS-bindendes-Protein, C-reaktives-Protein, α 1-Glycoprotein und insbesondere Serumamyloid A sowie Haptoglobin die größte Rolle spielen (Zebeli und Metzler-Zebeli 2012).

3.1.5. Einfluss von Futteradditiven

Phytogene Zusatzstoffe und Hefederivate haben das Potential die Pansenfermentation zu modulieren, indem sie die Stärkeabbau-Geschwindigkeit verringern und das Wachstum von Lactat-Verwertern stimulieren. Diese Effekte könnten durch einen niedrigen pH-Wert oder eine konzentratreiche Fütterung noch verstärkt werden, weshalb die Zugabe von autolyserter Hefe oder phytogenen Zusatzstoffen die negativen Auswirkungen bei einer konzentratreicher Fütterung ausgleichen könnten (Kröger et al. 2017). *In-vitro*-Studien haben ergeben, dass phytogene Zusatzstoffe eine direkte bakteriostatische Wirkung haben und somit die Fermentationsendprodukte verändern (Neubauer et al. 2018). Die Studie von Kröger et al. (2017) zeigt, dass die Supplementation von phytogenen Zusatzstoffen die pH-senkende Wirkung der konzentratreichen Fütterung abmildert und dass die autolyserter Hefe Potential zeigt, die Fress- und Wiederkauzeit sowie die Futteraufnahme der Rinder zu erhöhen und der Senkung des pH-Wertes entgegenzuwirken.

3.1.6. Diagnostik

Die Diagnose von SARA ist unter landwirtschaftlichen Bedingungen schwierig, weil die klinischen Anzeichen in der Regel unauffällig und verzögert sind (Humer et al. 2018). Da die klinischen Befunde nicht eindeutig einer SARA zuordenbar sind und viele Messungen auf den Betrieben nicht durchführbar sind, basiert die Felddiagnose auf paraklinische Parameter (Plazier et al. 2008). Von diesen Messungen ist die des Pansen-pH-Wertes die genaueste, weil sie direkte Auskunft über die Bedingungen im Pansen gibt (Enemark 2008). Jedoch bleiben viele Fälle von SARA undetektiert, weil nur einfache Messungen durchgeführt werden und keine kontinuierliche Überwachung über einen längeren Zeitraum stattfindet (Humer et al. 2018).

Aufgrund der in Absatz 3.1.4 beschriebenen Akute-Phase-Reaktion können Akute-Phase-Proteine, insbesondere LPS-bindendes-Protein, Serumamyloid A und Haptoglobin im Blut als Diagnosehilfe infrage kommen, wobei die systemischen Entzündungsreaktionen bei SARA abgeschwächt und sehr variabel sein können (Aschenbach et al. 2019). Zugleich ist der Anstieg von Akute-Phase-Proteinen nicht spezifisch für SARA oder für den Pansen, weshalb deren Nachweis nur bedingt aussagekräftig ist (Humer et al. 2018).

Da bei einer akuten Pansenazidose ein verminderter Blut-pH-Wert von $\leq 7,35$ auftritt, gibt es auch Untersuchungen des Blut-pH-Werts als potenziellen Biomarker für SARA. Obwohl ein Anstieg des Kohlendioxidpartialdrucks im Blut bei Kühen mit SARA nachweisbar ist, sind die Auswirkungen auf den pH-Wert im Blut vernachlässigbar. Auch die Veränderung der Natrium-, Kalium- und Chlorid-Konzentration bei Kühen mit SARA und die damit verbundene Verschiebung des Säure-Basen-Gleichgewichts haben keinen Einfluss auf den Blut-pH-Wert (Humer et al. 2018).

Aufgrund dieser schwierigen und invasiven Diagnostik wäre ein guter assoziierter Biomarker wichtig für die Praxis, um die Prävalenz von SARA zu reduzieren und die Herdengesundheit zu verbessern.

3.2. MiRNA

3.2.1. Definition

MicroRNAs (miRNA) sind kleine, nicht kodierende RNAs mit einer durchschnittlichen Länge von 22 Nukleotiden (Dong et al. 2017, O'Brian et al. 2018). Sie modulieren in erster Linie die Genexpression, indem sie auf die 3'-untranslatierte Region der mRNA einwirken und diese hemmen. Dadurch spielen sie eine bedeutende Rolle bei der posttranskriptionellen Regulierung, sind somit an der Regulation physiologischer Prozesse beteiligt und können folglich auch als assoziierte Biomarker in Frage kommen (O'Brian et al. 2018, Pacifico et al. 2022).

3.2.2. Biogenese und Mechanismus

Die meisten miRNAs werden in primäre miRNAs umgeschrieben, woraufhin sie im Zellkern von Drosha, einem Klasse-2-RNase-III-Enzym, zu einer Vorläufer-miRNA verarbeitet werden. Nach dem Transport ins Zytoplasma werden sie von Dicer, ein RNase-III-Protein, zu reifen miRNAs weiterverarbeitet und auf das Argonaute-Protein geladen, um anschließend den

Effektor RNA-induced silencing complex (RISC) zu bilden (Wahid et al. 2012, O'Brian et al. 2018). MiRNAs leiten miRISC dazu an mRNA zu erkennen und die Genexpression durch posttranskriptionelle Mechanismen, entweder durch Translationsunterdrückung oder durch mRNA-Spaltung, herunterzuregulieren. Sie regulieren im Körper eine Vielzahl von Prozessen, so sind sie zum Beispiel an der Regulierung der Follikel- und Lutealentwicklung sowie der Funktion des Endometriums beteiligt (Ioannidis und Donadeu, 2016).

3.2.3. MiRNAs als Biomarker

MiRNA-Biomarker sind miRNAs, welche in einem bestimmten Gewebe gebildet oder angereichert werden und deren zirkulierende Konzentrationsspiegel pathologische oder physiologische Veränderungen in diesem Gewebe widerspiegeln können, die mit Krankheiten oder dem Fortschreiten von Krankheiten einhergehen. MiRNAs werden in extrazelluläre Flüssigkeiten ausgeschieden, wo sie als potenzielle Biomarker für eine Vielzahl von Krankheiten bekannt sind und auch als Signalmoleküle zur Vermittlung der Zell-Zell-Kommunikation dienen (Ioannidis und Donadeu 2016, Dong et al. 2017, O'Brian et al. 2018). Bereits 2002 sind in der Humanmedizin miRNAs als Biomarker für Leukämie beschrieben, was den Grundstein für den Zusammenhang zwischen der Dysregulation von intrazellulären miRNAs und Krankheit legt (Dong et al. 2017). Weitere Studien bestätigen diesen Zusammenhang sowie die Beziehungen zwischen Profiländerungen zirkulierender miRNAs und menschlichen Krankheiten wie zum Beispiel Virusinfektionen, Krebserkrankungen und Leberschäden (Dong et al. 2017). Da extrazelluläre miRNAs in einer Vielzahl von biologischen Flüssigkeiten wie beispielsweise Plasma und Serum, Zerebrospinalflüssigkeit, Speichel, Muttermilch, Urin, Tränen, Kolostrum, Peritonealflüssigkeit, Bronchiallavage, Samenflüssigkeit und Ovarialflüssigkeit nachweisbar sind, stellen sie einen vielversprechenden Marker für Krankheitsbilder dar (Weiland et al. 2012, Dong et al. 2017, O'Brian et al. 2018).

Auch in der Veterinärmedizin zeigen einige Studien den Zusammenhang zwischen Expressionsprofilen von zirkulierenden miRNAs und verschiedenen Erkrankungen wie zum Beispiel Maul- und Klauenseuche, Bovine Virusdiarrhoe und Paratuberkulose (Dong et al. 2017). So kann mithilfe von miRNAs am Beispiel der Maul- und Klauenseuche zwischen den drei unterschiedlichen Phasen der Infektion unterschieden werden. Die Studie von Stenfeldt et al. (2017) zeigt, dass von insgesamt 169 exprimierten miRNAs die Expression von bta-miR-1281 sowohl im akuten als auch im persistierenden Infektionsstadium signifikant reduziert ist, wohingegen bta-miR-17-5p im akuten Infektionsstadium am stärksten exprimiert ist und die

Expression von bta-miR-31 während der Persistenz am höchsten ist. Somit bestätigt diese Studie das Potential der miRNAs als Biomarker, da für akut und persistent infizierte Tiere charakteristische zirkulierende miRNAs identifiziert sind, die für die Entwicklung von Diagnosetests verwendet werden könnten und eine Unterscheidung zwischen Träger- und Nicht-Träger-Rindern ermöglichen (Stenfeldt et al. 2017, Dong et al. 2017).

Obwohl auch der Zusammenhang zwischen der Fütterung von Kühen und den pathophysiologischen Veränderungen, welche sich auf die Expression von miRNA auswirken, beschrieben sind, ist das Expressionsverhalten in den Papillen des Pansens noch wenig erforscht. Eine parallele Studie bestätigt jedoch bereits das Vorhandensein von denselben sechs miRNAs, die auch bei Johanns (2021) vorkommen, in den Papillen des Pansens, sodass potenziell eine Assoziation von den untersuchten miRNAs in Zirkulation zum Pansen denkbar ist (Pacifico et al. 2022).

4. Material und Methoden

4.1. Tiere und Aufstallung

Um eine erste gute Validierung der Ergebnisse der vorangegangenen NGS-Studie von fünf Kühen zu gewährleisten, wurden alle im Rahmen der Untersuchung zur Verfügung stehenden Kühe für diese Arbeit genutzt. Insgesamt wurden neun nicht-laktierende, multipare schwarzbunte Holstein Kühe eingesetzt, welche im Durchschnitt $11,3 \pm 2,29$ Jahre alt und $909,75 \pm 98,17$ kg schwer waren und eine Pansenfistel hatten. Die Kühe waren während des gesamten Versuchs in einem Laufstall mit Tiefeinstreuboxen mit 2,6 m x 1,25 m mit einer Strohmistmatratze an der VetFarm Kremersberg der Vetmeduni Vienna aufgestellt.

Der Tierversuch wurde im Rahmen des Christian Doppler Laboratory for Innovative Gut Health Concepts of Livestock durchgeführt. Alle Behandlungen und Handlungen mit Tieren in diesem Versuch wurden von den nationalen Behörden sowie von der Ethikkommission der Veterinärmedizinischen Universität Wien gemäß §26 des Tierversuchsgesetzes 2012-TVG genehmigt (BMBWF-68.205/0033-V/3b/2019).

4.2. Fütterung

Zu Beginn des Versuchs wurden alle neun Kühe als Grundfütterung für eine Woche mit einer strukturreichen Futterration, bestehend aus 45 % Grassilage, 45 % Maissilage und 10 % Heu gefüttert. In der darauffolgenden Woche wurden die Kühe an die kraftfutterreiche Diät adaptiert, indem für sechs Tage die Futterration um jeweils 10 % und am siebten Tag um 5 % Kraftfutter erhöht wurde. Somit war die Endkonzentration der Futterration 65 % Kraftfutter, 26,25 % Grassilage und 8,75 % Maissilage, welche die Kühe für anschließende vier Wochen bekamen. Die Zusammensetzung der Kraftfutter-Mischung war:

- 30,36 % Weizen
- 23,94 % Rapsschrot
- 23,02 % Bäckerei-Nebenprodukte
- 18,06 % Triticale
- 2,99 % Melasse
- 1,53 % Mineral-Vitamin-Premix
- 1,0 % Kalkstein.

Die totale Mischration wurde einmal täglich um 06:00 Uhr von einem automatischen Futtermischgerät (Trioliet Triomatic T15, Oldenzaal, Niederlande) gemischt und anschließend in, für jede Kuh, individuelle Tröge (Insentec B.V., Marknesse, Niederlande) gefüllt. Diese Tröge hatten Computer-regulierte Zugänge und waren mit Waagen zur Überprüfung der Futteraufnahme ausgestattet. Zusätzlich hatten die Kühe Mineralsteine zur freien Verfügung und Wasser *ad libitum*.

Die Kühe wurden in zwei Gruppen unterteilt, wobei fünf Kühe (Bergrose, Nelda, Banane, Narbe, Ricky) als Kontrollgruppe (CON) fungierten und vier Kühe (Elfi, Edit, Newada und Elsa) zusätzlich zur beschriebenen Diät phytogene Zusatzstoffe bekamen (PHY).

Nach dem Versuch wurden die Kühe auf die Weide mit zusätzlicher Heu-Fütterung entlassen.

4.3. SARA Kuh Modell

Mit der im vorherigen Kapitel beschriebenen Fütterung wollten wir durch den hohen Anteil an Kraftfutter SARA induzieren. Die Überprüfung, ob dies gelungen war, wurde in einer Parallelstudie von Rivera-Chacon et al. (2022) an denselben Tieren durchgeführt. Hierfür wurde das Lethbridge Research Centre Pansen pH Messsystem (LRCpH; Dascor Inc., USA) in den ventralen Sack des Pansens platziert und mit diesem der pH-Wert kontinuierlich überwacht. Das Vorhandensein von SARA oder Episoden von SARA konnte bei allen Tieren festgestellt werden und wurde anhand eines Schwellenwerts für den Pansen-pH von 5,8 für eine durchschnittliche Dauer von 320 Minuten pro Tag bestätigt, wobei der Pansen-pH alle 15 Minuten aufgezeichnet wurde (Rivera-Chacon et al., 2022, Zebeli et al. 2008).

4.4. Probenentnahme und Lagerung

4.4.1. Plasma und Leukozyten

Die Blutprobenentnahme erfolgte während der Grundfütterung (GF) sowie nach einer (KF 1) und drei Wochen (KF 3) der Konzentrat-Fütterung (Abbildung 1). In der Adaptationswoche wurden keine Proben gewonnen, weshalb diese für die vorliegende Arbeit vernachlässigt wurde.

Zur Probenentnahme wurden die Kühe im Fressgitter fixiert, woraufhin eine Staukette um den Hals der Kühe gelegt und die Punktionsstelle über der *Vena jugularis* mit 70%igen Ethanol-Tupfern desinfiziert wurde. Der durchführende Tierarzt trug Handschuhe, punktierte mit einer

20G Nadel im 45° Winkel die Vene und füllte dann zwei bereits beschriftete EDTA-Röhrchen, indem er sie auf den Vacutainer setzte, bis sie voll waren (8 mL). Danach wurde die Staukette entfernt und die Nadel herausgezogen. Anschließend wurden die Probenröhrchen für 30 Sekunden vorsichtig geschwenkt, in eine Styroporbox mit Eis gelegt und zur weiteren Bearbeitung in das Labor gebracht.

Dort wurden die EDTA-Röhrchen in die Zentrifuge (Zentrifuge 5804 R, Eppendorf SE, Deutschland) gegeben und bei 2000 x g für 15 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurde vorsichtig das Plasma (inklusive Buffy Coat) in ein neues Röhrchen pipettiert und nochmals bei 800 x g für 15 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Währenddessen wurde das in den EDTA-Röhrchen verbleibende Pellet in beschriftete (miRNA blood 1) Kryo-Gefäße pipettiert und bei -80 °C zur Lagerung eingefroren. Nach der zweiten Zentrifugation wurde in vier beschriftete (Plasma 1-4) Kryo-Gefäße jeweils 1 mL Plasma pro Kuh pipettiert. Der in den Röhrchen verbleibende Buffy Coat und das Pellet wurde in ein weiteres beschriftetes (miRNA blood 2) Kryo-Gefäß pipettiert. Alle Proben wurden anschließend bei -80 °C eingefroren.

4.4.2. Papillen

Die Entnahme erfolgte während der GF und nach KF 1 in Duplikaten über die Pansenfistel (Abbildung 1). Zur Vorbereitung wurde der Pansen manuell ausgeräumt und der Inhalt in vorgewärmten Kunststoffbehältern aufbewahrt. Die ventral gelegene Pansenwand wurde zur Fistelöffnung gedreht und die Entnahmestelle, welche etwa 5 x 5 cm groß war, wurde mit phosphat-gepufferter Kochsalzlösung abgespült. Die Papillen wurden anschließend mit einer sterilen Schere so nahe wie möglich an der Basis abgeschnitten, erneut mit phosphat-gepufferter Kochsalzlösung abgespült, in flüssigen Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert. Nach der Entnahme wurde der Panseninhalt über die Fistel wieder zurückgefüllt.

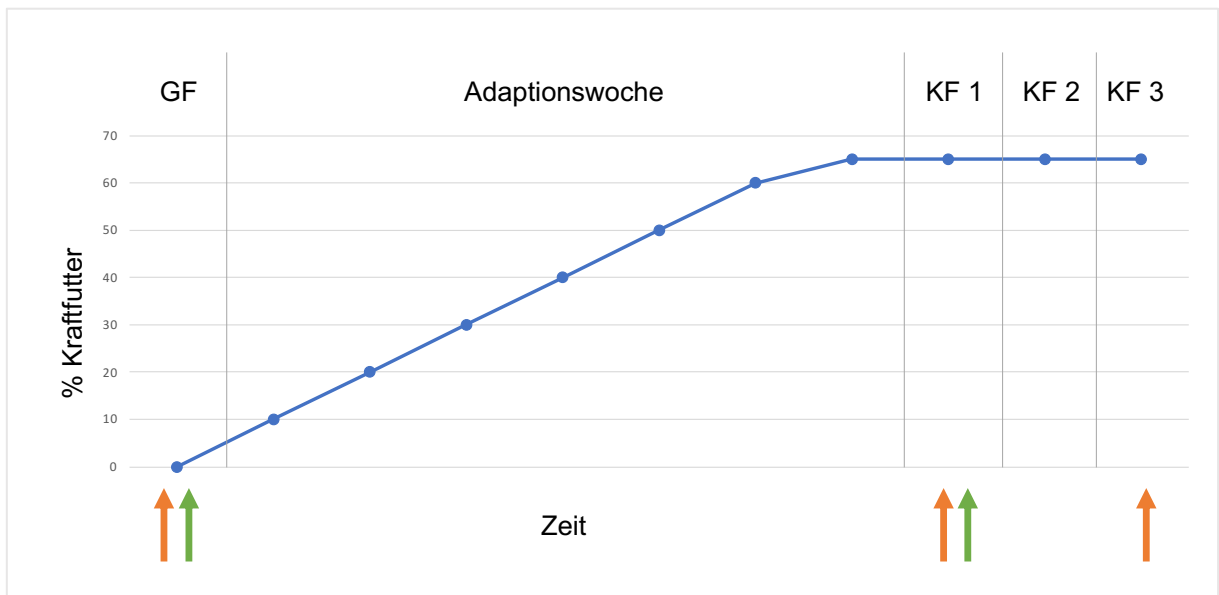


Abbildung 1: Zeitpunkte der Probenentnahme. Die orangen Pfeile markieren die Blutprobenentnahme. Die grünen Pfeile markieren die Papillenprobenentnahme. Auf der y-Achse ist der Anteil an Kraftfutter der Ration in % angeführt. Auf der x-Achse sind die verschiedenen Zeitpunkte der Fütterung: GF = Grundfütterung, KF 1 = eine Woche konzentratreiche Fütterung, KF 2 = zwei Wochen konzentratreiche Fütterung, KF 3 = drei Wochen konzentratreiche Fütterung.

4.5. miRNA Isolierung

4.5.1. Plasma

Für die Isolation der miRNA aus dem Plasma wurde das NucleoSpin® miRNA Plasma-Kit (Macherey-Nagel, Deutschland) verwendet. Das Protokoll wurde modifiziert und lautete wie folgt.

Komponenten des Kits:

- Lyse Puffer MLP
- Protein Niederschlag Puffer
- Reaktionspuffer für rDNase
- rDNase
- Wasch-Puffer MW1
- Wasch-Puffer MW2 (Konzentrat)
- RNase freies H₂O
- NucleoSpin® miRNA Säulen (mit grünem Ring)
- Sammelröhrchen (1,5 mL)

- Sammelröhrchen (2 mL)
- Sammelröhrchen (2 mL, mit Deckel)

weitere benötigte Komponenten:

- 96–100%iges Ethanol
- Isopropanol
- RNase-freie Pipetten-Spitzen
- Pipetten
- Vortexer (VV 3, VWR International GmbH, Deutschland)
- Zentrifuge (Micro Star 17R, VWR International GmbH, Deutschland)
- Labormantel
- Einweghandschuhe

Zur Vorbereitung musste MW2 mit 400 mL Ethanol angemischt werden. Weiteres wurde die rDNAse vorbereitet, indem 3 mL Reaktionspuffer für rDNAse hinzu pipettiert wurden. Diese wurde portioniert, beschriftet und zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingefroren. Danach wurden der Arbeitsplatz, die Pipetten und die Gestelle für die Gefäße mit Ethanol und RNase-Entfernungs-Lösung gereinigt. Für jede Probe wurde ein 2 mL Sammelröhrchen vorbereitet. Die Verwendung aller Gefäße beinhaltete die Vorbereitung und Beschriftung der Proben nach dem Schema

- A–I für die Kuh (A = Bergrose, B = Nelda, C = Banane, D = Narbe, E = Ricky, F = Elfi, G = Edit, H = Newada, I = Elsa)
- R2 (Durchgang)
- W1–5 (Woche der Probenentnahme, z.B.: W1 = Baseline-Fütterung, W2 = erste Woche der kraftfutterreichen Ration)
- Plasma
- Datum
- LH (Lisa Hajek, Kürzel für die durchführende Laborperson).

Für die Zell-Lyse wurden 600 µL Probe langsam aufgetaut und mit 180 µL MLP in das 2 µL Sammelgefäß pipettiert, für 30 Sekunden (s) gevortext und für 5 Minuten (min) bei Raumtemperatur inkubiert. Während der Inkubationszeit wurden die restlichen Proben wieder bei -80 °C eingefroren.

Anschließend wurde zum Ausfall der Proteine 60 µL MPP hinzugefügt, für 30 s gevortext und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Während die Proben für 5 min bei 11000 x g zentrifugiert wurden, wurden neue 2 µL Sammelröhrchen vorbereitet, in die im Anschluss vorsichtig, ohne die ausgefallenen Proteine zu berühren, der Überstand hinein pipettiert wurde. Die Röhrchen mit dem Rückstand wurden bei -80 °C eingefroren.

Im nächsten Schritt wurden die kleinen und großen RNAs mithilfe der NucleoSpin® miRNA Säulen gebunden. Es wurden 800 µL Isopropanol in jede Probe pipettiert, für 5 s gevortext und dann jeweils 500 µL auf die Säule pipettiert, 3 min bei Raumtemperatur inkubiert, für 1 min bei 11000 x g zentrifugiert und diese Schritte so lange wiederholt, bis keine Probe mehr da war.

Das Waschen der Membran erfolgte durch Addition von 700 µL MW2, anschließende Zentrifugation für 4 min bei 11000 x g, Dekantieren des Überstands, Addition von weiteren 250 µL MW2, Zentrifugation für 2 min bei 11000 x g und nochmaligen Dekantieren des Überstandes. Danach wurden 50 µL rDNase direkt ins Zentrum der Membran der Säule pipettiert und für 15 min bei 37 °C inkubiert, um die genomische DNA zu verdauen.

Im Anschluss wurden 100 µL MW1 auf die Membran pipettiert, für eine Minute bei 11000 x g zentrifugiert, der Überschuss dekantiert, 700 µL MW2 auf die Membran pipettiert, für eine Minute bei 11000 x g zentrifugiert, der Überschuss dekantiert, 250 µL MW2 auf die Membran pipettiert, für 3 min bei 11000 x g zentrifugiert und der Überschuss dekantiert. Nach diesem Waschvorgang sind die Deckel für 5 min offengelassen worden, um die Membran trocknen zu lassen.

Anschließend wurden die NucleoSpin® miRNA Säulen mit der in der Membran enthaltenen miRNA in neue, zum Einfrieren geeignete Sammelröhrchen gesetzt, mit 30 µL RNase-freiem H₂O versetzt und für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert um die RNA zu eluieren. Nach der Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit für 3 min wurden die fertigen Proben sofort auf Eis gelegt. Von jeder Probe sind 3 µL in ein extra Sammelröhrchen pipettiert worden, welche zur später beschriebenen Konzentrationsmessung verwendet wurden. Alle Proben wurden zur Aufbewahrung bei -80 °C eingefroren.

4.5.2. Leukozyten

Für die miRNA Extraktion in den Leukozyten wurde das NucleoSpin® miRNA Kit (Macherey-Nagel, Deutschland) verwendet.

Komponenten des Kits:

- Lyse Puffer ML
- Protein Niederschlag Puffer MP
- Bindungs-Puffer MX
- Reaktionspuffer für rDNase
- rDNase
- Waschpuffer MW1
- Waschpuffer MW2 (Konzentrat)
- RNase-freies H₂O
- NucleoSpin® Filter (mit violetter Ring)
- NucleoSpin® Säulen (mit blauem Ring)
- NucleoSpin® Protein-Entfernungssäulen (mit weißem Ring)
- Sammelröhrchen (1,5 mL)
- Sammelröhrchen (2 mL)
- Sammelröhrchen (2 mL, mit Deckel)

weitere benötigte Komponenten:

- 96–100%iges Ethanol
- 1,5 mL Sammelröhrchen
- RNase-freie Pipetten-Spitzen
- Pipetten
- Vortexer (VV 3, VWR International GmbH, Deutschland)
- Zentrifuge (Micro Star 17R, VWR International GmbH, Deutschland)
- Labormantel
- Einweghandschuhe

Die Beschriftung und Vorbereitung erfolgten, wie unter Kapitel 4.5.1 beschrieben. Der Waschpuffer MW2 wurde mit 200µL Ethanol angemischt.

Für die Zell-Lyse wurde die Probe mit 300 µL ML vermischt, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, in ein weiteres Röhrchen mit eingesetztem NucleoSpin® Filter mit violetterm Ring pipettiert und bei 11000 x g für eine Minute zentrifugiert. Der Filter konnte anschließend entsorgt werden.

Um die Bindungskonditionen für große RNA und DNA anzupassen, wurden 150 µL Ethanol hinzugegeben, für 5 s gevortext und bei Raumtemperatur für 5 min inkubiert. Im Anschluss wurde die Probe in ein Sammelgefäß mit eingesetzter NucleoSpin® Säule mit blauem Ring pipettiert und für eine Minute bei 11000 g x zentrifugiert. Die große RNA befand sich daraufhin auf der Säule (a) und die kleine RNA im Überstand (b), weshalb mit beidem weitergearbeitet wurde.

- a) Danach wurde die Säule in ein neues Gefäß gesetzt, mit 350 µL MDB bedeckt und für eine Minute bei 11000 x g zentrifugiert, woraufhin 100 µL rDNase direkt auf die Membran der Säule pipettiert wurden, um dann bei Raumtemperatur für 15 min zu inkubieren.
- b) Zum Überstand wurden 300 µL Puffer MP hinzugefügt, für 5 s gevortext und anschließend bei 11000 x g für 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Sammelröhrchen mit dem NucleoSpin® Protein-Entfernungssäule mit weißem Ring pipettiert und bei 11000 x g für eine Minute zentrifugiert. Das verbliebene Röhrchen mit den Proteinen wurde bei -80 °C eingefroren. Die NucleoSpin® Protein-Entfernungssäule konnte entsorgt werden und zu der Probe wurde zur Optimierung der Bindungs-Konditionen für die kleine RNA 800 µL MX hinzugefügt und für 5 s gevortext.

Zum Binden der kleinen RNA wurden auf die NucleoSpin® RNA-Säule mit dem blauen Ring (a) 600 µL Überstand (b) pipettiert, für 30 s bei 11000 x g zentrifugiert und die Durchfluss-Flüssigkeit dekantiert. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt.

Zum Waschen der Membran wurden 600 µL MW1 auf die Säule pipettiert, für 30 s bei 11000 x g zentrifugiert, der Überstand dekantiert, 700 µL MW2 auf die Säule pipettiert, für 30 s bei 11000 x g zentrifugiert, der Überstand dekantiert, 250 µL MW2 auf die Säule pipettiert, für zwei min bei 11000 x g zentrifugiert, der Überstand dekantiert, die Säule in ein zum Einfrieren

geeignetes Sammelgefäß gegeben und der Deckel zum Trocknen der Membran für 5 min offengelassen.

Das Eluieren der RNA erfolgte durch Addition von 30 µL RNase-freiem H₂O direkt auf das Zentrum der Membran, Inkubation bei Raumtemperatur für eine Minute und anschließender Zentrifugation für 30 s bei 11000 x g. Die fertigen Proben wurden sofort auf Eis gelegt. Von jeder Probe sind 3 µL in ein extra Sammelröhrchen pipettiert worden, welche zur später beschriebenen Konzentrationsmessung verwendet wurden. Alle Proben wurden zur Aufbewahrung bei -80 °C eingefroren.

4.5.3. Papillen

Für die miRNA Extraktion in den Papillen wurde das NucleoSpin® miRNA Kit (Macherey-Nagel, Deutschland) verwendet. Die Komponenten des Kits sind in Kapitel 4.5.2 angeführt.

Hierfür wurden zur Zell-Lyse 30 mg Papillen-Probe mit 300 µL ML mit Keramik-Beads (Roth Lactan, Deutschland) mit einem Durchmesser von 0,7 mm und 2,0 mm unter Verwendung eines FastPrep-24 Instruments (MP Biomedicals, USA) homogenisiert. Das Lysat wurde anschließend auf den NucleoSpin® Filter mit violetterm Ring pipettiert und bei 11000 x g für eine Minute zentrifugiert.

Der weitere Vorgang war indent zu dem unter Kapitel 4.5.2 beschriebenen Protokoll, mit der Anpassung der Zentrifugationsschritte für jeweils eine Minute statt 30 s. Zum Eluieren der RNA wurden 40 µL RNase-freies H₂O auf die Membran pipettiert, für eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert und bei 11000 x g für eine Minute zentrifugiert. Die Proben wurden anschließend bei -80 °C eingefroren.

4.6. Konzentrationsmessung

Die Quantitätskontrolle erfolgte durch Konzentrationsmessung mit einem Spektrometer (DS-11 FX+, DeNovix Inc., USA). Das Gerät wurde zur Vorbereitung gereinigt und geeicht. Das Mikropodest des Spektrometers wurde zuerst mit 2 µL RNase-freiem H₂O und einem Einmal-Wischtuch (Kimtech®, Kimberly-Clark Professional, Deutschland) gereinigt, indem das Tuch auf das Mikropodest gelegt und der Arm für kurze Zeit geschlossen wurde. Danach wurde das Spektrometer mit RNase-freiem H₂O auf null gesetzt und zur Kontrolle 1 µL von diesem Wasser gemessen, ob es nahe an null ist.

Im Anschluss wurden die RNA-Proben gemessen. Dazu wurde jeweils 1 μL Probe auf Mikropodest pipettiert, der Arm geschlossen, das Ergebnis abgelesen und protokolliert, der Arm geöffnet, das Einmal-Wischtuch zur Zwischenreinigung eingelegt, der Arm für kurze Zeit geschlossen und das Tuch entfernt. Von jeder Probe wurden zwei Messungen durchgeführt. Nach den Messungen wurde das Spektrometer erneut mit RNase-freiem H_2O gereinigt und mit einem Einmal-Wischtuch getrocknet.

Die weitere Bearbeitung der Proben war Konzentrationsabhängig, da pro Well für die qPCR 3,5 ng cDNA notwendig waren. Somit ergaben sich folgende Überlegungen:

- 6 Targets + 2 Houskeeper = 8 Transkripte, in 3 Replikaten $\rightarrow$ 24 Wells pro Probe
- 3,5 ng cDNA pro Well $\rightarrow$ 84 ng cDNA pro Probe
- 2 μL Probe pro Well
 - $\rightarrow$ 1,75 ng/ μL cDNA pro Probe
 - $\rightarrow$ 48 μL cDNA pro Probe
- Endgültige Synthesemenge: 112,5 ng in 64 μL = 1,75 ng/ μL

Bei Proben mit 15 ng/ μL wurden 7,5 μL Probe für die Polyadenylierung verwendet. Das Produkt der Polyadenylierung (10 μL gesamt) wird bei der cDNA-Synthese auf 20 μL gebracht. Im Anschluss wurden diese 20 μL cDNA mit 44 μL RNase-freiem H_2O verdünnt, um auf die Wunschkonzentration von 112,5 ng in 64 μL zu kommen.

Bei Proben mit weniger als 15 ng/ μL wurde die Probe zweimal polyadenyliert und cDNA-synthetisiert, sodass nach dem Poolen dieser zwei Proben (40 μL) die Konzentration größer als die Wunschkonzentration ist. Im Anschluss wurde berechnet, in wie viel μL die gewünschten 112,5 ng enthalten waren und die Probe entsprechend mit RNase-freiem H_2O verdünnt, um auf die 1,75 ng/ μL zu kommen.

4.7. Polyadenylierung

Für die Polyadenylierung wurde das 1st cDNA Synthesis Kit (Agilent Technologys, USA) verwendet.

Es wurden pro Probe 2 μL 5 x Polymerase A Puffer, 0,5 μL rATP (mM), 7,5 μL miRNA Probe und anschließend 1 μL E. Coli Poly A Polymerase vorsichtig vermischt und zentrifugiert, um

die Bestandteile am Boden der Sammelgefäße zu vereinen. Dann wurden die Reagenzien bei 37 °C für 30 min und dann bei 95 °C für fünf min inkubiert und bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gelegt.

4.8. cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese wurde das 1st cDNA Synthesis Kit (Agilent Technologys, USA) verwendet.

Es wurden pro Probe 2 µL 10 x Affinity Script RT Puffer, 10 µL polyadenylierte miRNA (aus 4.7.), 0,8 µL dNTP mix (100 mM), 1 µL RT Adaptor Primer (10 µM), 1 µL Affinity Script RT/RNase block enzyme mixture und 5,2 µL RNase-freies H₂O vorsichtig vermischt und zentrifugiert. Im Anschluss wurden die Reagenzien bei 55 °C für fünf min, dann bei 25 °C für 15 min, dann bei 42 °C für 30 min, dann bei 95 °C für fünf min inkubiert und schließlich bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gelegt.

4.9. Primer Etablierung

Für den PCR-Ansatz wurde das miRNA MM qPCR Kit (Agilent Technologys, USA), sowie der universal Primer 3.125 µM (Agilent Technologys, USA) verwendet.

In jedes Well wurden folgende Komponenten für die PCR pipettiert:

- 6,25 µL 2 x miRNA qPCR MM
- 0,5 µL 3,125 µM universal reverse primer
- 0,5 µL 3,125 µM miRNA specific forward primer
- 2 µL Template
- 3,25 µL RNase-freies H₂O.

Somit betrug das Gesamtvolumen pro Well 12,5 µL.

Um die optimale Anlagerungs-Temperatur individuell zu ermitteln, wurde jedes Ziel-miRNA in allen Matrizen mit einem speziellen Thermocycler (C1000 Touch, BioRAD Laboratorys Inc., USA) mit dem optischen System (CFX96, BioRAD Laboratorys Inc., USA) in den verschiedenen Temperaturstufen (57,0 °C, 57,5 °C, 58,5 °C, 60,0 °C, 62,5 °C, 64,0 °C, 64,5 °C, 65 °C) getestet (Tabelle 1).

Tabelle 1: qPCR-Programm zur Primeretablierung.

Zyklus	Zeit	Temperatur
1	10 min	95 °C
40	10 sec	95 °C
	30 sec	57°C – 65 °C
	30 sec	72 °C
Schmelzkurvenanalyse		

4.10. Quantitative PCR

Für die qPCR wurde der in Kapitel 4.9 beschriebene Ansatz verwendet. Das generelle Plattenschema ist in Abbildung 2 ersichtlich.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A	1	1	1	17	17	17	1	1	1	17	17	17	1	1	1	17	17	17	1	1	1	17	17	17
B	2	2	2	18	18	18	2	2	2	18	18	18	2	2	2	18	18	18	2	2	2	18	18	18
C	3	3	3	28	28	28	3	3	3	28	28	28	3	3	3	28	28	28	3	3	3	28	28	28
D	4	4	4	29	29	29	4	4	4	29	29	29	4	4	4	29	29	29	4	4	4	29	29	29
E	5	5	5	30	30	30	5	5	5	30	30	30	5	5	5	30	30	30	5	5	5	30	30	30
F	6	6	6	31	31	31	6	6	6	31	31	31	6	6	6	31	31	31	6	6	6	31	31	31
G	7	7	7	32	32	32	7	7	7	32	32	32	7	7	7	32	32	32	7	7	7	32	32	32
H	8	8	8	33	33	33	8	8	8	33	33	33	8	8	8	33	33	33	8	8	8	33	33	33
I	9	9	9	34	34	34	9	9	9	34	34	34	9	9	9	34	34	34	9	9	9	34	34	34
J	10	10	10	35	35	35	10	10	10	35	35	35	10	10	10	35	35	35	10	10	10	35	35	35
K	11	11	11	36	36	36	11	11	11	36	36	36	11	11	11	36	36	36	11	11	11	36	36	36
L	12	12	12				12	12	12				12	12	12				12	12	12			
M	13	13	13				13	13	13				13	13	13				13	13	13			
N	14	14	14				14	14	14				14	14	14				14	14	14			
O	15	15	15	No PAP	No PAP	No PAP	15	15	15	No PAP	No PAP	No PAP	15	15	15	No PAP	No PAP	No PAP	15	15	15	No PAP	No PAP	No PAP
P	16	16	16	NTC	NTC	NTC	16	16	16	NTC	NTC	NTC	16	16	16	NTC	NTC	NTC	16	16	16	NTC	NTC	NTC
	Housekeeping 1						Target 1						Target 2						Target 3					

Abbildung 2: Plattenschema für die qPCR. No PAP steht für „no poly A polymerase“, dient also der Kontrolle, ob die cDNA-Synthese stattgefunden hat. NTC steht für „no template control“ und dient als Negativkontrolle.

Die qPCR wurde mit dem Thermocycler Vii7 (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) durchgeführt, deren Programm in Tabelle 2 angeführt ist. Die Temperatur mit * markiert variierte bei den unterschiedlichen Platten, aufgrund der vorhergegangenen Etablierung und ist im folgenden Kapitel 5.1 ersichtlich.

Tabelle 2: Programm für die qPCR am Thermocycler ViiA7.

Zyklus	Zeit	Temperatur
1	10 min	95 °C
45	10 sec	95 °C
	30 sec	*
	30 sec	72 °C
Schmelzkurvenanalyse		

4.11. Auswertung und Statistik

Die Berechnung der relativen Expression erfolgte nach der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Methode (Livak und Schmittgen 2001). Zu Beginn wurden die Rohdaten direkt im ViA7 qPCR Gerät begutachtet und mithilfe von den Expressionskurven und Schmelzkurven etwaige Ausreißer aus den Datensätzen entfernt. Danach wurde für jede Matrize und jeden Primer ein eigenes Excel (Microsoft Excel 2019, Microsoft Corporation, USA) Dokument erstellt, in das zuerst die C_t -Werte beider Haushalts-miRNA (Housekeeper) eingetragen wurden. Von den technischen Replikaten wurde daraufhin ein Mittelwert (MW) errechnet. Aus beiden Mittelwerten der Housekeeper miRNA wurde dann das geometrische Mittel errechnet, welches als interner Kalibrator für die Korrektur des Gesamt-RNA Gehaltes der Probe diente. Zunächst wurden vom Ziel-miRNA ebenso die C_t -Werte eingetragen und ein MW der technischen Replikate gebildet. Anschließend erfolgte die ΔC_t -Berechnung, bei welcher der MW der Ziel-miRNA minus das geometrische Mittel der Housekeeper miRNA gerechnet wurde. Dann wurde der MW der ΔC_t -Werte der Kontrollkühe aus W1 gebildet, der im Anschluss von dem ΔC_t -Wert abgezogen wurde und den $\Delta\Delta C_t$ -Wert ergab. Die relative Expression ergab sich dann aus $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Ausreißer wurden zusätzlich entfernt und als solche definiert, wenn ihr Wert höher als der zweifache MW ihrer Gruppe (z.B. Kontrolltiere W1) betrug. Zur Überprüfung der Signifikanzen wurden im Anschluss mit Excel (Microsoft Excel 2019, Microsoft Corporation, USA) eine Reihe von t-Tests durchgeführt. Überprüft wurden hierbei das Verhältnis von Kontrollgruppe zu Versuchsgruppe in W1,2 und 4 sowie das Verhältnis von W1 zu W2, W1 zu W4 und W2 zu W4 in jeweils der Kontrollgruppe, der Versuchsgruppe und der Gesamten Gruppe einer Woche. Als Tendenz (+) wurde ein Wert unter 0,1, als Signifikant (*) ein Wert unter 0,05 und als Hochsignifikant (**) ein Wert unter 0,01 angesehen.

5. Ergebnisse

5.1. Primeretablierung

Bei der Etablierung der Primer wurden die optimalen Anlagerungs-Temperaturen der verschiedenen Primer ermittelt (Tabelle 3). Außerdem wurde festgestellt, dass die Ct-Werte zum Teil sehr hoch (>35) waren, weshalb der Thermocycler statt mit 40 Zyklen, mit 45 Zyklen gestartet worden ist.

Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Primer und deren für die qPCR verwendeten Anlagerungs-Temperaturen.

Primer für qPCR	Anlagerungs-Temperatur in °C	
	Leukozyten	Plasma
Haushalts-miRNAs		
ssc-miR-103: AGC AGC ATT GTA CAG GGC TAT GA (23 bp)	60	60
ssc-miR-107: AGC AGC ATT GTA CAG GGC TAT CA (23 bp)	60	60
Ziel-miRNAs		
F-mir-11982: TTCGGCGCCACCACCCTGCGGGT (23 bp)	60	60
F-mir-1388-5p: AGGACTGTCCAACCTGAGAAT (21bp)	58	58
F-mir-12034: CCCCAGGGGAGCCCGGCGGT (19bp)	57.5	57.5
F-mir-2285u: GAAAAACCCGAACGAACCTTT (20bp)	57.5	57.5
F2-mir-30b-3p: TTCATTTGTAGGTGGAGGGTC (21bp)	57.5	57.5
F-mir-1306: CCACCTCCCCTGCAAACGTCC (21bp)	60	60

5.2. Plasma

Bei bta-miR-2285u war die relative Expression bei den CON Kühen bei der Grundfütterung (GF) höher als bei den PHY Kühen sowie den anderen CON Gruppen. Außerdem war die relative Expression bei Betrachtung aller Versuchstiere (CON + PHY) bei der drei-wöchigen Konzentrat-Fütterung (KF 3) geringer als bei der GF und der ein-wöchigen Konzentrat-Fütterung (KF 1) (Abbildung 3).

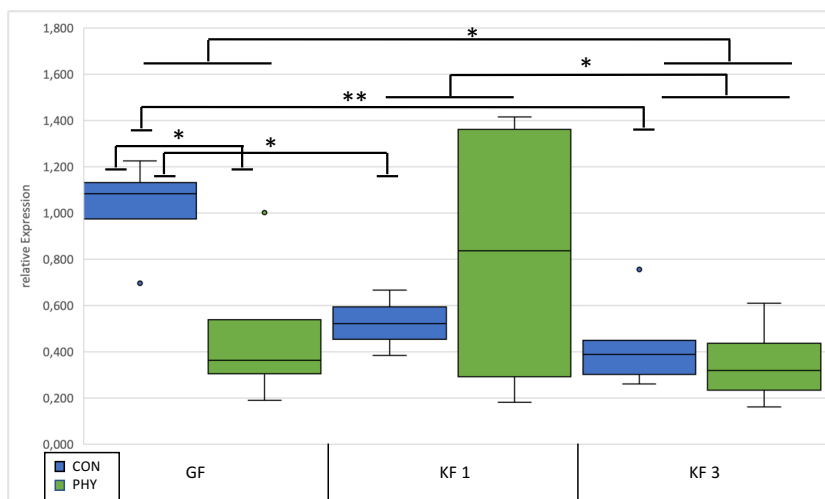


Abbildung 3: Boxplot-Diagramm zur relativen Expression von bta-miR-2285u im Plasma. Auf der x-Achse befinden sich die beiden Fütterungs-Gruppen zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit dem Schema: CON = Kühe der Kontrollgruppe (n = 5), PHY = Kühe mit Zusatzfuttermittel (n = 4), GF = Grundfütterung, KF 1 = Konzentrat-Fütterung für eine Woche, KF 3 = Konzentrat-Fütterung für drei Wochen. Die y-Achse stellt die relative Expression dar. ** = <0,01, * = <0,05.

Bei bta-miR-30b-3p war die relative Expression der CON Kühe bei der KF 1 höher als bei der GF. Die Expression der CON Kühe war in allen Wochen höher als die Expression bei den PHY Kühen (Abbildung 4).

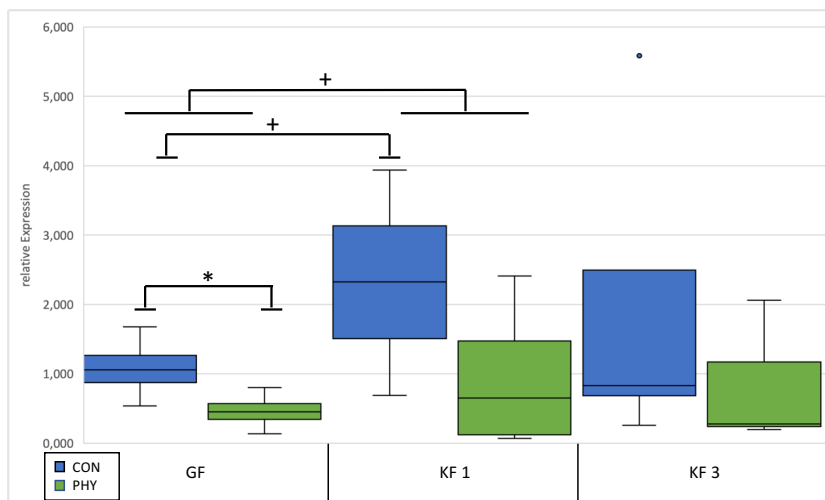


Abbildung 4: Boxplot-Diagramm zur relativen Expression von bta-miR-30b-3p im Plasma. Auf der x-Achse befinden sich die beiden Fütterungs-Gruppen zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit dem Schema: CON = Kühe der Kontrollgruppe (n = 5), PHY = Kühe mit Zusatzfuttermittel (n = 4), GF = Grundfütterung, KF 1 = Konzentrat-Fütterung für eine Woche, KF 3 = Konzentrat-Fütterung für drei Wochen. Die y-Achse stellt die relative Expression dar. * = <0,05, + = <0,1.

Für bta-miR-12034 waren keine Expressionsunterschiede erkennbar (Abbildung 5).

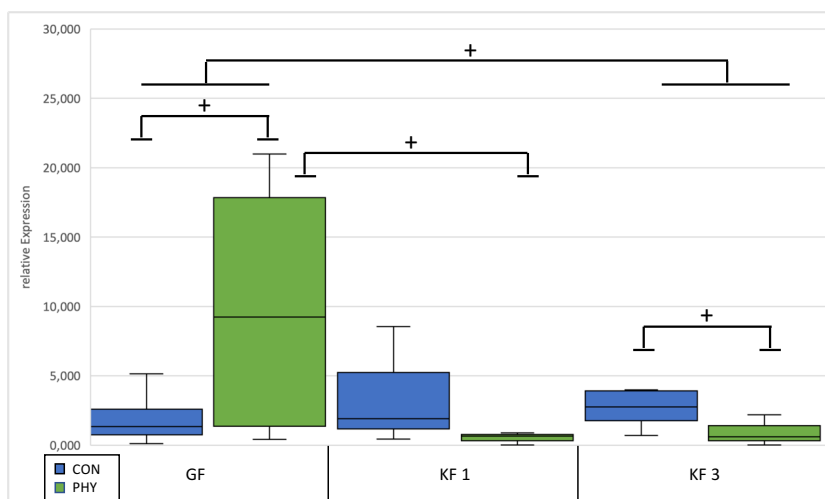


Abbildung 5: Boxplot-Diagramm zur relativen Expression von bta-miR-12034 im Plasma. Auf der x-Achse befinden sich die beiden Fütterungs-Gruppen zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit dem Schema: CON = Kühe der Kontrollgruppe (n = 5), PHY = Kühe mit Zusatzfuttermittel (n = 4), GF = Grundfütterung, KF 1 = Konzentrat-Fütterung für eine Woche, KF 3 = Konzentrat-Fütterung für drei Wochen. Die y-Achse stellt die relative Expression dar. + = <0,1.

Bei bta-miR-11982 war bei der GF die relative Expression bei den PHY Kühen niedriger als bei den CON Kühen. Die relative Expression war bei der KF 1 höher als bei der KF 3, wenn man alle Versuchstiere betrachtet (Abbildung 6).

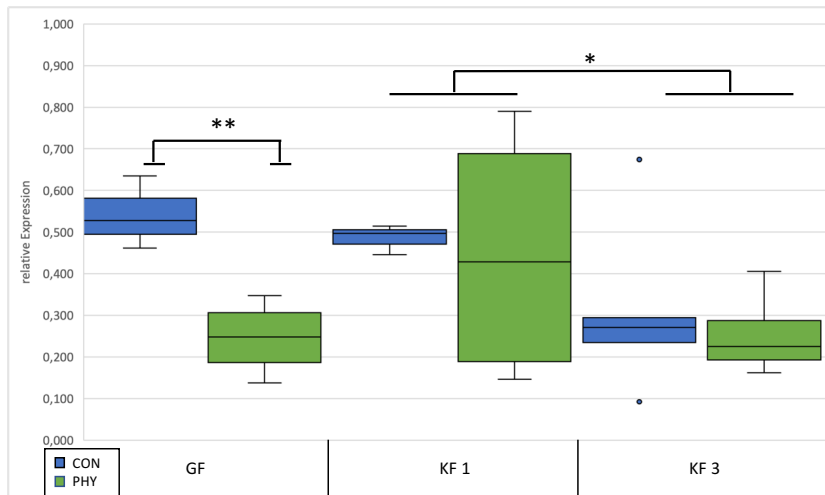


Abbildung 6: Boxplot-Diagramm zur relativen Expression von bta-miR-11982 im Plasma. Auf der x-Achse befinden sich die beiden Fütterungs-Gruppen zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit dem Schema: CON = Kühe der Kontrollgruppe (n = 5), PHY = Kühe mit Zusatzfuttermittel (n = 4), GF = Grundfütterung, KF 1 = Konzentrat-Fütterung für eine Woche, KF 3 = Konzentrat-Fütterung für drei Wochen. Die y-Achse stellt die relative Expression dar. ** = <0,01, * = <0,05.

Bei bta-miR-1306 war die relative Expression bei der KF 3 sowohl bei den CON Kühen als auch bei Betrachtung aller Versuchstiere geringer als in den beiden anderen Wochen. Die relative Expression war bei der GF bei den PHY Kühen geringer als die der CON Kühe (Abbildung 7).

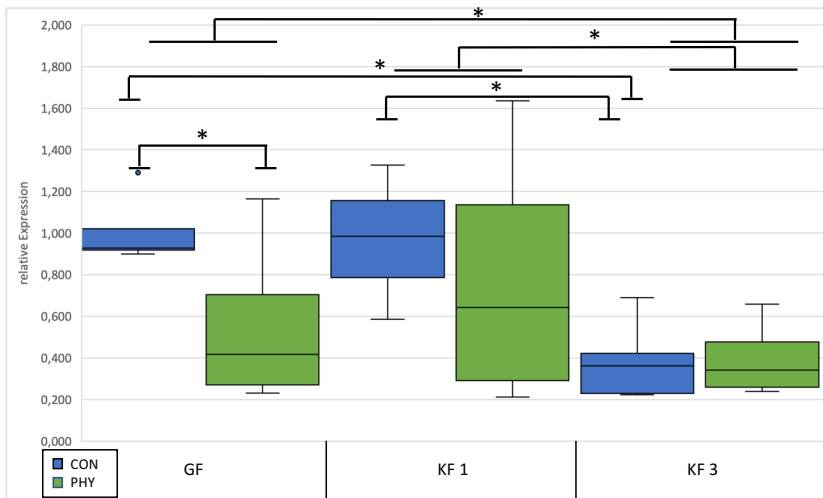


Abbildung 7: Boxplot-Diagramm zur relativen Expression von bta-miR-1306 im Plasma. Auf der x-Achse befinden sich die beiden Fütterungs-Gruppen zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit dem Schema: CON = Kühe der Kontrollgruppe (n = 5), PHY = Kühe mit Zusatzfuttermittel (n = 4), GF = Grundfütterung, KF 1 = Konzentrat-Fütterung für eine Woche, KF 3 = Konzentrat-Fütterung für drei Wochen. Die y-Achse stellt die relative Expression dar. * = <0,05.

Für bta-miR-1388-5p waren keine Expressionsunterschiede erkennbar (Abbildung 8).

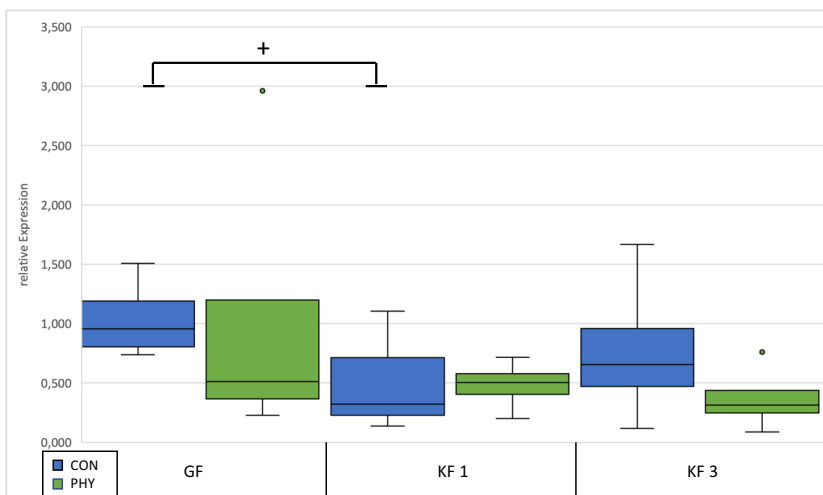


Abbildung 8: Boxplot-Diagramm zur relativen Expression von bta-miR-1388-5p im Plasma. Auf der x-Achse befinden sich die beiden Fütterungs-Gruppen zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit dem Schema: CON = Kühe der Kontrollgruppe (n = 5), PHY = Kühe mit Zusatzfuttermittel (n = 4), GF = Grundfütterung, KF 1 = Konzentrat-Fütterung für eine Woche, KF 3 = Konzentrat-Fütterung für drei Wochen. Die y-Achse stellt die relative Expression dar. + = <0,1.

5.3. Leukozyten

Bei bta-miR-2285u war die relative Expression bei der KF 3 bei den PHY Kühen höher als in den anderen Wochen. Bei Betrachtung aller Versuchstiere war bei der KF 3 die relative Expression höher als bei der KF 1 (Abbildung 9).

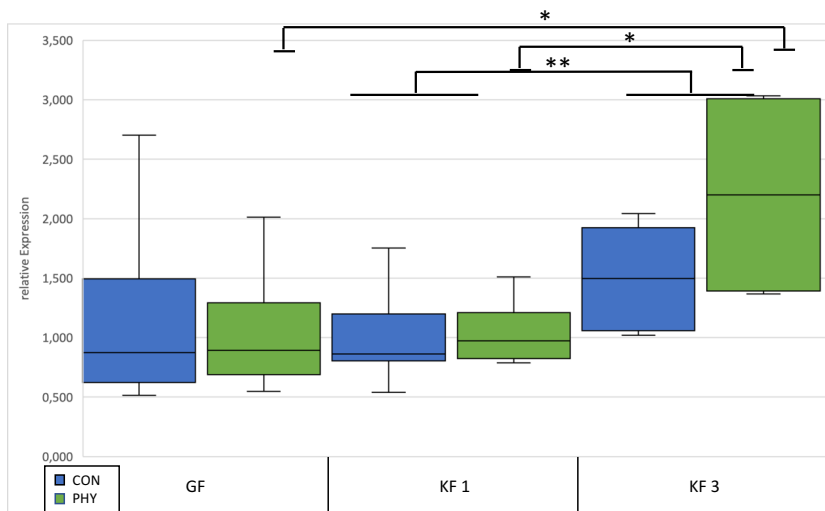


Abbildung 9: Boxplot-Diagramm zur relativen Expression von bta-miR-2285u in den Leukozyten. Auf der x-Achse befinden sich die beiden Fütterungs-Gruppen zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit dem Schema: CON = Kühe der Kontrollgruppe (n = 5), PHY = Kühe mit Zusatzfuttermittel (n = 4), GF = Grundfütterung, KF 1 = Konzentrat-Fütterung für eine Woche, KF 3 = Konzentrat-Fütterung für drei Wochen. Die y-Achse stellt die relative Expression dar. ** = <0,01, * = <0,05.

Bei bta-miR-30b-3p war die relative Expression bei der KF 3 sowohl bei den CON Kühen als auch bei den PHY Kühen höher als bei der KF 1. Bei Betrachtung aller Versuchstiere war die relative Expression bei der KF 3 höher als bei der GF und der KF 1 (Abbildung 10).

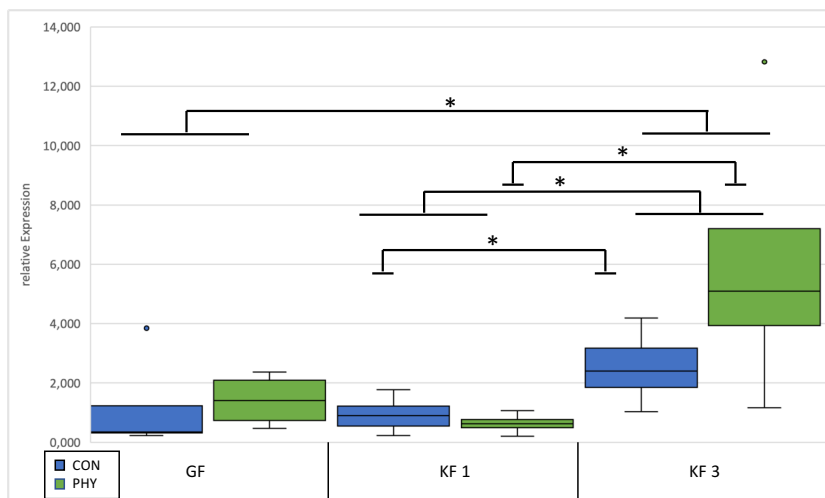


Abbildung 10: Boxplot-Diagramm zur relativen Expression von bta-miR-30b-3p in den Leukozyten. Auf der x-Achse befinden sich die beiden Fütterungs-Gruppen zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit dem Schema: CON = Kühe der Kontrollgruppe (n = 5), PHY = Kühe mit Zusatzfuttermittel (n = 4), GF = Grundfütterung, KF 1 = Konzentrat-Fütterung für eine Woche, KF 3 = Konzentrat-Fütterung für drei Wochen. Die y-Achse stellt die relative Expression dar. * = <0,05.

Für bta-miR-12034 waren keine Expressionsunterschiede erkennbar (Abbildung 11).

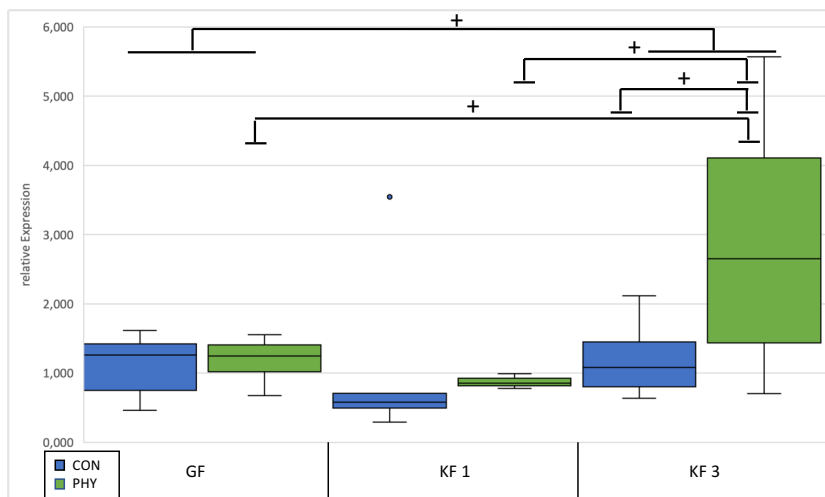


Abbildung 11: Boxplot-Diagramm zur relativen Expression von bta-miR-12034 in den Leukozyten. Auf der x-Achse befinden sich die beiden Fütterungs-Gruppen zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit dem Schema: CON = Kühe der Kontrollgruppe (n = 5), PHY = Kühe mit Zusatzfuttermittel (n = 4), GF = Grundfütterung, KF 1 = Konzentrat-Fütterung für eine Woche, KF 3 = Konzentrat-Fütterung für drei Wochen. Die y-Achse stellt die relative Expression dar. + = <0,1.

Bei bta-miR-11982 war die relative Expression der PHY Kühe bei der KF 3 höher als bei der KF 1. Bei der KF 1 war die relative Expression bei den CON Kühen niedriger als bei den PHY Kühen. (Abbildung 12).

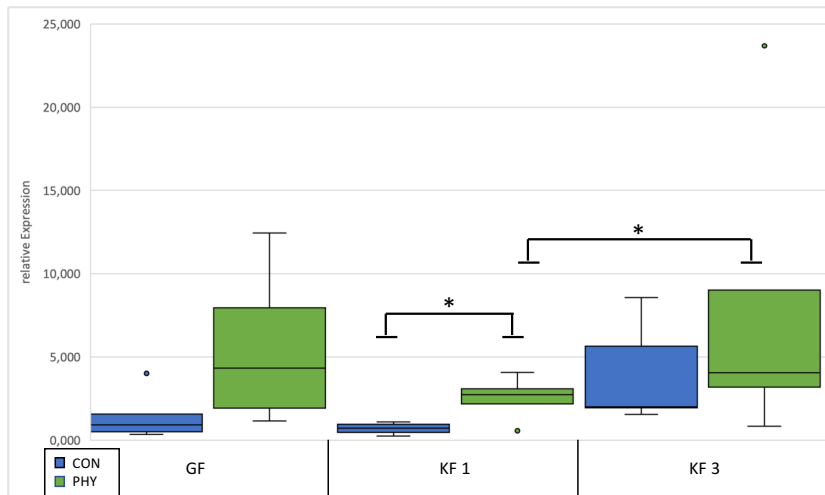


Abbildung 12: Boxplot-Diagramm zur relativen Expression von bta-miR-11982 in den Leukozyten. Auf der x-Achse befinden sich die beiden Fütterungs-Gruppen zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit dem Schema: CON = Kühe der Kontrollgruppe (n = 5), PHY = Kühe mit Zusatzfuttermittel (n = 4), GF = Grundfütterung, KF 1 = Konzentrat-Fütterung für eine Woche, KF 3 = Konzentrat-Fütterung für drei Wochen. Die y-Achse stellt die relative Expression dar. * = <0,05.

Bei bta-miR-1306 war die relative Expression bei der KF 3 niedriger als bei der KF 1 bei den CON Kühen sowie bei Betrachtung aller Versuchstiere (Abbildung 13).

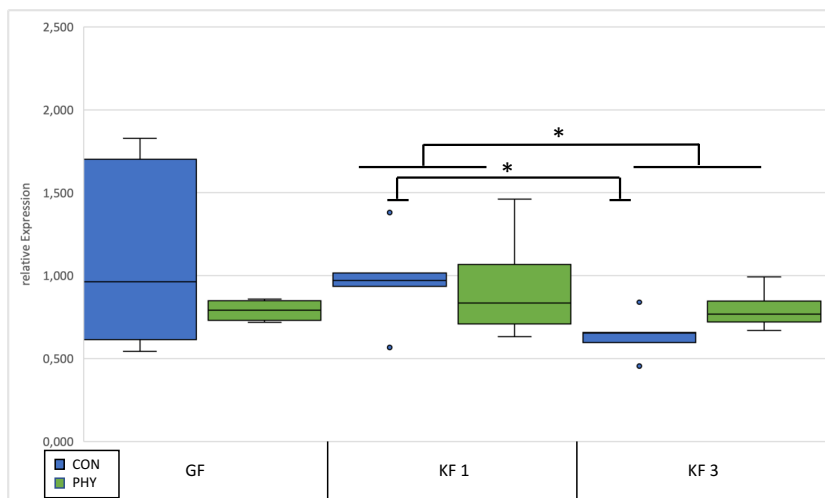


Abbildung 13: Boxplot-Diagramm zur relativen Expression von bta-miR-1306 in den Leukozyten. Auf der x-Achse befinden sich die beiden Fütterungs-Gruppen zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit dem Schema: CON = Kühe der Kontrollgruppe (n = 5), PHY = Kühe mit Zusatzfuttermittel (n = 4), GF = Grundfütterung, KF 1 = Konzentrat-Fütterung für eine Woche, KF 3 = Konzentrat-Fütterung für drei Wochen. Die y-Achse stellt die relative Expression dar. * = <0,05.

Bei bta-miR-1388-5p war die relative Expression bei der KF 3 der CON Kühe und allen Versuchstieren höher als bei der GF und der KF 1 (Abbildung 14).

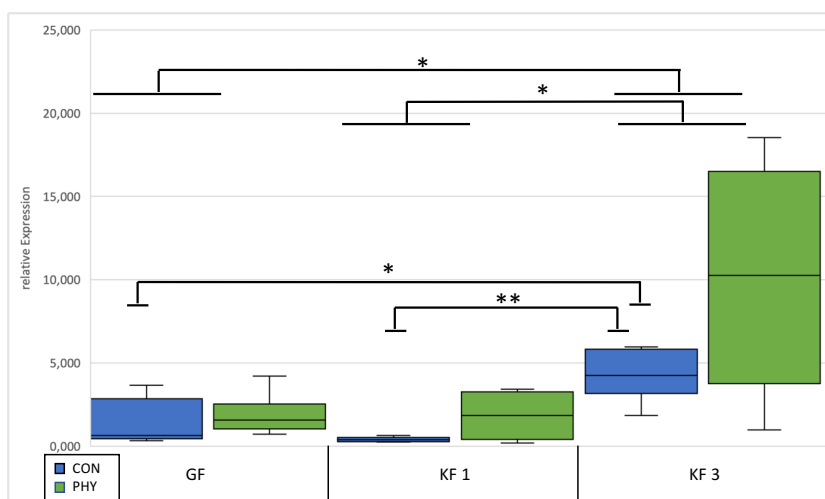


Abbildung 14: Boxplot-Diagramm zur relativen Expression von bta-miR-1388-5p in den Leukozyten. Auf der x-Achse befinden sich die beiden Fütterungs-Gruppen zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit dem Schema: CON = Kühe der Kontrollgruppe (n = 5), PHY = Kühe mit Zusatzfuttermittel (n = 4), GF = Grundfütterung, KF 1 = Konzentrat-Fütterung für eine Woche, KF 3 = Konzentrat-Fütterung für drei Wochen. Die y-Achse stellt die relative Expression dar. ** = <0,01, * = <0,05.

5.4. Papillen

Für bta-miR-2285u waren keine Expressionsunterschiede erkennbar (Abbildung 15).

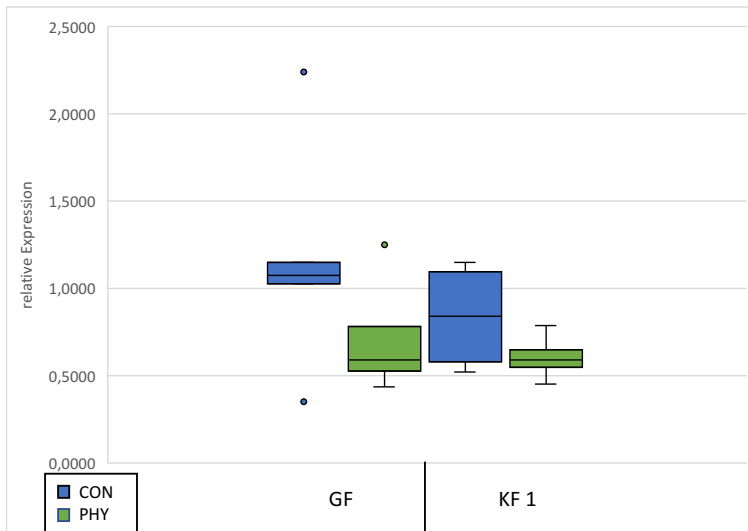


Abbildung 15: Boxplot-Diagramm zur relativen Expression von bta-miR-2285u in den Papillen. Auf der x-Achse befinden sich die beiden Fütterungs-Gruppen zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit dem Schema: CON = Kühe der Kontrollgruppe (n = 5), PHY = Kühe mit Zusatzfuttermittel (n = 4), GF = Grundfütterung, KF 1 = Konzentrat-Fütterung für eine Woche. Die y-Achse stellt die relative Expression dar.

Bei bta-miR-30b-3p war die relative Expression bei den CON Kühen sowohl bei der GF als auch bei der KF 1 höher als bei den PHY Kühen (Abbildung 16).

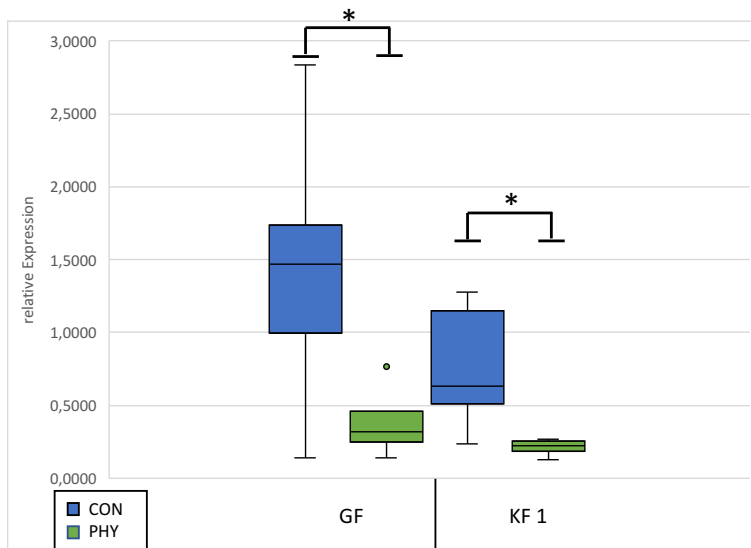


Abbildung 16: Boxplot-Diagramm zur relativen Expression von bta-miR-30b-3p in den Papillen. Auf der x-Achse befinden sich die beiden Fütterungs-Gruppen zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit dem Schema: CON = Kühe der Kontrollgruppe (n = 5), PHY = Kühe mit Zusatzfuttermittel (n = 4), GF = Grundfütterung, KF 1 = Konzentrat-Fütterung für eine Woche. Die y-Achse stellt die relative Expression dar. * = <0,05.

Bei bta-miR-12034 war die relative Expression der CON Kühe bei der GF höher als bei den PHY Kühen (Abbildung 17).

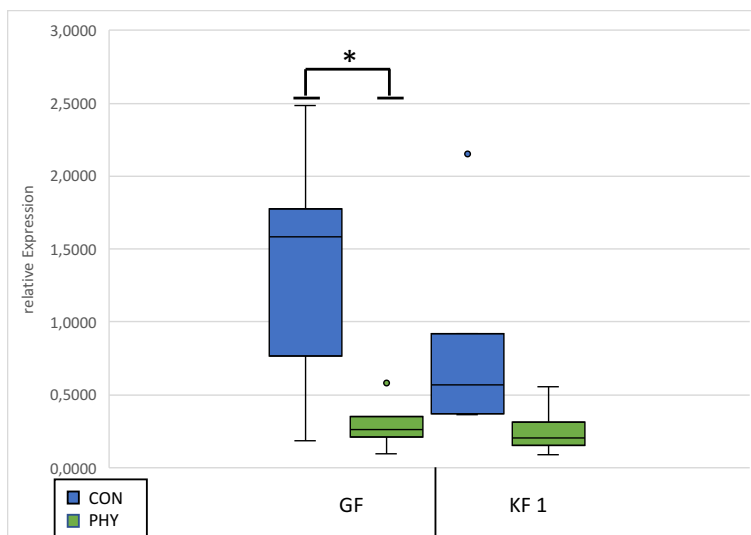


Abbildung 17: Boxplot-Diagramm zur relativen Expression von bta-miR-12034 in den Papillen. Auf der x-Achse befinden sich die beiden Fütterungs-Gruppen zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit dem Schema: CON = Kühe der Kontrollgruppe (n = 5), PHY = Kühe mit Zusatzfuttermittel (n = 4), GF = Grundfütterung, KF 1 = Konzentrat-Fütterung für eine Woche. Die y-Achse stellt die relative Expression dar. * = <0,05..

Bei bta-miR-11982 war die relative Expression bei den CON Kühen sowohl bei der GF als auch bei der KF 1 höher als bei den PHY Kühen. Außerdem war die relative Expression der CON Kühe bei der GF höher als bei der KF 1 (Abbildung 18).

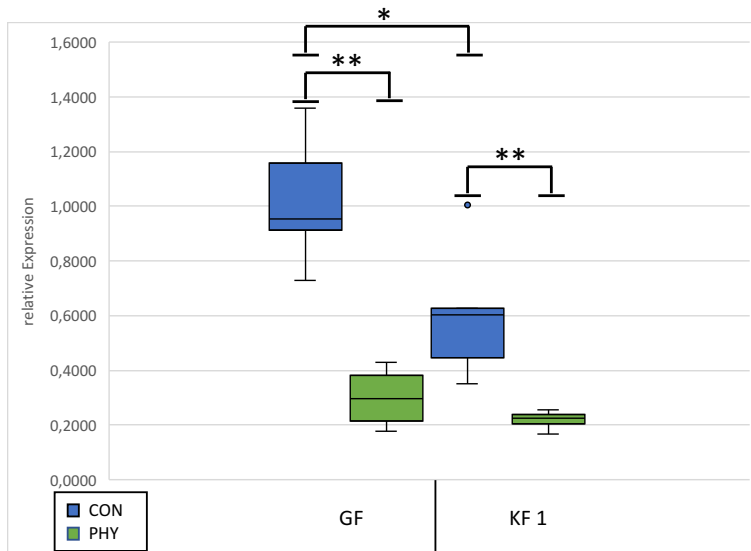


Abbildung 18: Boxplot-Diagramm zur relativen Expression von bta-miR-11982 in den Papillen. Auf der x-Achse befinden sich die beiden Fütterungs-Gruppen zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit dem Schema: CON = Kühe der Kontrollgruppe (n = 5), PHY = Kühe mit Zusatzfuttermittel (n = 4), GF = Grundfütterung, KF 1 = Konzentrat-Fütterung für eine Woche. Die y-Achse stellt die relative Expression dar. ** = <0,01, * = <0,05.

Für bta-miR-1306 waren keine Expressionsunterschiede erkennbar (Abbildung 19).

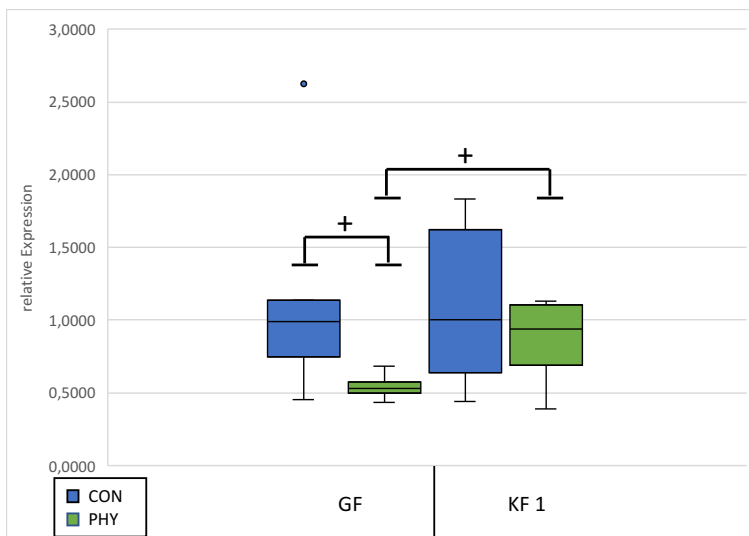


Abbildung 19: Boxplot-Diagramm zur relativen Expression von bta-miR-1306 in den Papillen. Auf der x-Achse befinden sich die beiden Fütterungs-Gruppen zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit dem Schema: CON = Kühe der Kontrollgruppe (n = 5), PHY = Kühe mit Zusatzfuttermittel (n = 4), GF = Grundfütterung, KF 1 = Konzentrat-Fütterung für eine Woche. Die y-Achse stellt die relative Expression dar. + = <0,1.

Bei bta-miR-1388-5p war die relative Expression der CON Kühe bei der KF 1 höher als die der PHY Kühe (Abbildung 20).

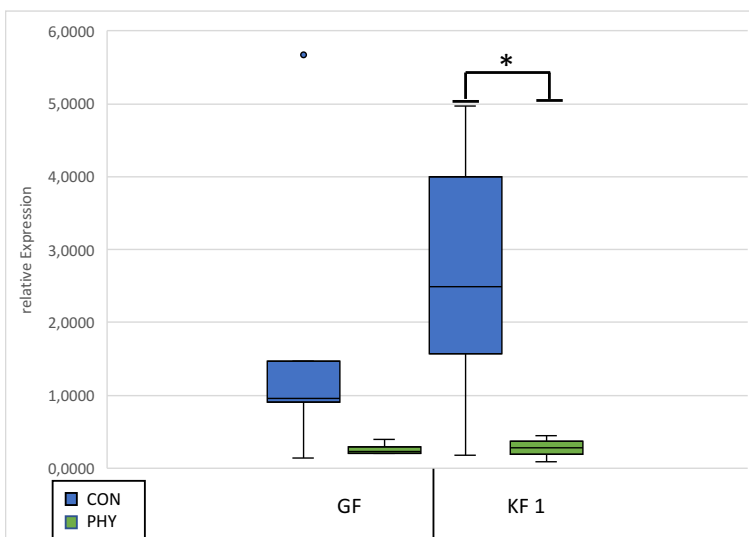


Abbildung 20: Boxplot-Diagramm zur relativen Expression von bta-miR-1388-5p in den Papillen. Auf der x-Achse befinden sich die beiden Fütterungs-Gruppen zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit dem Schema: CON = Kühe der Kontrollgruppe (n = 5), PHY = Kühe mit Zusatzfuttermittel (n = 4), GF = Grundfütterung, KF 1 = Konzentrat-Fütterung für eine Woche. Die y-Achse stellt die relative Expression dar. * = <0,05.

Zusammenfassend sind in Tabelle 4 alle signifikanten ($p < 0,05$) Fütterungseffekte bei steigendem Anteil an Kraftfutter in den Versuchsgruppen (CON = Kontrolltiere, PHY = Kühe mit Supplementierung des phytogenen Zusatzfuttermittels, ALLE = Alle Versuchstiere) dargestellt.

Tabelle 4: Übersicht der signifikanten ($p < 0,05$) Expressionsunterschiede mit steigendem Kraftfutteranteil. ↓ = geringere relative Expression mit steigendem Kraftfutteranteil, ↑ = höhere relative Expression mit steigendem Kraftfutteranteil, x = keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Fütterungsregimen, CON = Kühe der Kontrollgruppe (n = 5), PHY = Kühe mit Zusatzfuttermittel (n = 4), ALLE = Alle Versuchstiere (CON + PHY, n = 9).

	Plasma			Leukozyten			Papillen		
	CON	PHY	ALLE	CON	PHY	ALLE	CON	PHY	ALLE
bta-miR-2285u	↓	x	↓	x	↑	↑	x	x	x
bta-miR-30b-3p	x	x	x	↑	↑	↑	x	x	x
bta-miR-12034	x	x	x	x	x	x	x	x	x
bta-miR-11982	x	x	↓	x	↑	x	↓	x	x
bta-miR-1306	↓	x	↓	↓	x	↓	x	x	x
bta-miR-1388-5p	x	x	x	↑	x	↑	x	x	x

In Tabelle 5 sind die signifikanten ($p < 0,05$) Unterschiede zwischen den Kontrolltieren und den Kühen mit Supplementierung des phytogenen Zusatzfuttermittels in den einzelnen Fütterungswochen ersichtlich.

Tabelle 5: Übersicht der signifikanten ($p < 0,05$) Expressionsunterschiede zwischen den Kontrolltieren und den Kühen mit Supplementierung des phytogenen Zusatzfutters in den Versuchswochen. ↓ = geringere relative Expression bei den mit Zusatzfütterung supplementierten Tieren als bei den Kontrolltieren, ↑ = höhere relative Expression bei den mit Zusatzfütterung supplementierten Tieren als bei den Kontrolltieren, x = keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen, GF = Grundfütterung, KF 1 = Konzentrat-Fütterung für eine Woche, KF 3 = Konzentrat-Fütterung für drei Wochen.

	Plasma			Leukozyten			Papillen	
	GF	KF 1	KF 3	GF	KF 1	KF 3	GF	KF 1
bta-miR-2285u	↓	x	x	x	x	x	x	x
bta-miR-30b-3p	↓	x	x	x	x	x	↓	↓
bta-miR-12034	x	x	x	x	x	x	↓	x
bta-miR-11982	↓	x	x	x	↑	x	↓	↓
bta-miR-1306	↓	x	x	x	x	x	x	x
bta-miR-1388-5p	x	x	x	x	x	x	x	↓

6. Diskussion

Das Ziel dieser Studie war die Identifikation eines Biomarkers für SARA, welcher bevorzugt aus dem Plasma der Kühe stammen soll, weil dies ein leicht verfügbares und in der Entnahme wenig invasives Probenmaterial ist. Um die Ergebnisse sowie den Mechanismus besser darstellen zu können, werden die relativen Expressionen im Plasma, in den Leukozyten und in den Papillen im folgenden Kapitel verglichen und diskutiert.

Eines der wichtigsten Ergebnisse dieser Studie ist der Nachweis aller gewählten miRNAs (bta-miR-2285u, bta-miR-30b-3p, bta-miR-12034, bta-miR-11982, bta-miR-1306 und bta-miR-1388-5p) im Plasma, in den Leukozyten sowie den Papillen. Durch die nachgewiesene Expression der miRNAs in den Papillen ist deren Vorkommen im Pansen bestätigt und setzt somit die Voraussetzung als Biomarker für SARA fungieren zu können. Da die verschiedenen miRNAs jedoch sehr unterschiedliche Expressionsprofile haben, ist deren Verlässlichkeit individuell in Frage zu stellen und im Vergleich zu den Next-Generation-Sequenzierung (NGS) Daten zu betrachten.

Der höher ausgefallene read count beim NGS bei bta-miR-2285u bei der Konzentrat-Fütterung (KF) verglichen mit der Grundfütterung (GF) bestätigt das Potential dieses miRNAs als Biomarker für SARA in Frage zu kommen. Die Daten dieser Studie zeigen jedoch, dass die relative Expression im Plasma bei den Kontrollkühen (CON) bei der GF höher ist als in allen anderen Gruppen. Zum einen könnte dies auf eine Herunterregulierung dieser miRNA im Plasma bei SARA hinweisen, oder zum anderen zeigen, dass möglicherweise die falsche Variante von bta-miR-2285 zur weiteren Analyse gewählt wurde. Diese miRNA ist bereits als pansensspezifisch beschrieben (Sun et al. 2019) und weiters sind 23 Mutationen von bta-miR-2285 aus der vorangegangenen Studie bekannt (Johanns 2021). Daher sollten auch weitere Varianten auf deren Potential als Biomarker für SARA zu fungieren überprüft werden, denn für bta-miR-2285u kann eine verlässliche Assoziation mit SARA in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Beispielsweise sind die read counts von bta-miR-2285b, bta-miR-2285av und bta-miR-2285aa nicht so hoch bei der KF als bei bta-miR-2285u, sie sind aber dafür bei den unterschiedlichen Kühen gleichmäßiger angestiegen. Dies bestätigt, dass wie auch Ioannidis et al. (2018) beschreibt, die Genetik der Kühe das Expressionsverhalten der miRNA erheblich beeinflussen könnte. Im Vergleich dazu ist die Expression in den Leukozyten bei der KF höher als bei der GF und könnte somit einen Zusammenhang zwischen SARA und bta-

2285u bestätigen. Die Expression in den Papillen ergibt keine signifikanten Veränderungen, lediglich eine nicht wesentlich geringere Expression bei den mit phytoenen Zusatzfuttermittel supplementierten Kühen (PHY) im Vergleich zu den CON Kühen. Dies könnte zwar auf eine Wirkung des Zusatzfuttermittelstoffes im Pansen hindeuten, sollte jedoch noch weiter untersucht werden.

Bereits Muroya et al. (2016) beschreiben in deren Studie den Zusammenhang zwischen kraftfutterreicher Fütterung und einer höheren relativen Expression von bta-miR-30b-3p im Plasma. Dieser Effekt ist nicht nur aus den NGS-Daten ersichtlich, sondern ist auch mit dieser Studie als Hochregulierung der relativen Expression im Plasma verifiziert. In den Leukozyten ist eine erhöhte Expression nach drei Wochen KF feststellbar, wohingegen in den Papillen die Expression mit steigender Kraftfutteraufnahme fällt. Der gleichzeitige Anstieg der relativen Expression im Plasma und den Leukozyten spricht gegen eine Sezernierung aus den Leukozyten ins Plasma, da bei dieser die Konzentration in den Leukozyten fallen müsste. Viel mehr deutet die verminderte Konzentration in den Papillen bei gleichzeitigem Anstieg im Plasma darauf hin, dass die miRNAs bei konzentratreicher Fütterung von den Papillen in das Plasma sezerniert werden. Wie genau die miRNAs vom Gewebe in die Blutbahn gelangen ist immer noch unklar, jedoch ist bekannt, dass miRNAs im Gewebe im Laufe eines Krankheitsprozesses herunterreguliert werden (Dong et al. 2017). Somit liegt die Vermutung nahe, dass miRNAs von den Papillen möglicherweise sogar als Vesikel aktiv in die Blutbahn sezerniert werden, anstatt von nekrotischen oder verletzten Zellen passiv freigesetzt zu werden (Sohel 2016). Weitere Möglichkeiten der Sekretion wären zum einen als Exosomen, welche als meisterforschtes Transportmittel für miRNAs gelten (Zhao et al. 2016), oder zum anderen über Umbauprozesse als apoptotische Körper (Sohel 2016). Außerdem ist bekannt, dass miRNAs auch in Verbindung mit Lipoproteinen als Carrier über die Leber in extrazelluläre Flüssigkeiten freigesetzt werden können (Sohel 2016). Zusätzlich ist bei bta-miR-30b-3p bei den PHY Kühen die Expression im Plasma und in den Papillen geringer als bei den CON Kühen, was wiederum auf einen Einfluss des Zusatzfuttermittel hindeuten könnte. Diese phytoenen Futtermittelzusatzstoffe sind reich an bioaktiven pflanzlichen Verbindungen und sollen bei der KF die Stabilität der Pansenmikroben aufrechterhalten. Eine Supplementierung von phytoenen Futtermittelzusätzen während der KF kann Berichten zufolge die Wiederkauaktivität verbessern, die Dauer eines Pansen-pH-Werts <6,0 verkürzen, die Konzentration von Lipopolysacchariden im Pansen verringern und sich somit auch positiv auf die Papillenentwicklung auswirken (Rivera-Chacon et al. 2022).

Bei bta-miR-12034 kann in keinem der Probenmaterialien eine signifikante Regulation festgestellt werden. Lediglich im Plasma zeigt sich eine Tendenz bei der KF hochzuregulieren sowie ein möglicher Effekt des phylogenen Zusatzfuttermittels nach drei-wöchiger Konzentratfütterung. Auch die Tendenzen in den Leukozyten und in den Papillen sind wenig aussagekräftig, da die relativen Expressionen ohne erkennbares Muster steigen und fallen. Außerdem weisen die NGS-Daten auf eine unterschiedliche Expression bei den verschiedenen Kühen hin, was man daran erkennt, dass bei einer Kuh der read count von GF auf KF fällt und bei drei Kühen steigt. Aufgrund dieser beschriebenen Unregelmäßigkeiten und den fehlenden signifikanten Ergebnissen ist dieses miRNA nicht als Biomarker geeignet.

Bta-miR-11982 ist sowohl im Plasma als auch in den Papillen bei der GF höher exprimiert als bei der KF. Dies würde zwar auf eine Herunterregulierung hindeuten, jedoch ist auch hier die große Variation zwischen den einzelnen Kühen nicht vernachlässigbar. Außerdem würden diese Daten auch gegen eine Sezernierung der miRNAs aus den Papillen ins Plasma sprechen. Die Aussagekraft und die Eignung dieses miRNAs muss ebenso in Frage gestellt werden, weil auch hier wie bei bta-miR-12034 in den NGS-Daten zwischen der GF und der KF sowohl ein Abfall als auch ein Anstieg der read counts bei den verschiedenen Versuchstieren beobachtbar ist. In den Leukozyten ist lediglich eine höhere Expression bei den PHY Kühen während der KF beobachtbar, wohingegen in den Papillen sowohl bei der GF als auch bei der KF eine hoch signifikant geringere Expression bei den PHY Kühen als bei den CON Kühen feststellbar ist. Möglicherweise besteht ein Zusammenhang zwischen einem Effekt des Futtermittelzusatzstoffes in den Papillen und gleichzeitig höherer Expression in den Leukozyten.

Obwohl in den NGS-Daten bei bta-miR-1306 eine Kuh aus dem Schema fällt ist bei den restlichen Kühen eine Herunterregulierung im Plasma feststellbar. Auch die relative Expression ist nach 3 Wochen kraftfutterreicher Fütterung im Plasma signifikant geringer als bei der GF. Ebenso in den Leukozyten lässt sich eine Herunterregulierung feststellen, wohingegen in den Papillen keine klare Regulation erkennbar ist. Die gleichzeitige Regulierung im Plasma und in den Leukozyten bekräftigt wiederum, dass die miRNAs vermutlich nicht aus den Leukozyten ins Plasma sezerniert werden, sondern aus einem Gewebe im Pansen stammen. Das phylogene Zusatzfuttermittel hat auf bta-miR-1306 im Plasma keinen oder einen nur sehr geringen Effekt, da die relative Expression bei den CON Kühen von der GF auf die KF 3 hoch signifikant fällt und im Vergleich dazu bei Betrachtung der Gesamtversuchstiere

„nur“ mehr signifikant ist. Der Effekt des Zusatzfuttermittels kann bei diesem miRNA somit stark in Frage gestellt werden, jedoch ist die Gesamtregulierung nach unten sowohl von der GF auf die KF 3 als auch von der KF 1 auf die KF 3 klar erkennbar, weshalb bta-miR-1306 als Biomarker noch weiter untersucht werden sollte.

Bta-miR-1388-5p hat zwar in den NGS-Daten einen höheren read count bei der KF, jedoch kann in der jetzigen Studie lediglich eine Tendenz zur Regulation nach unten bei konzentratreicher Fütterung im Plasma festgestellt werden. In den Leukozyten ist die Expression bei der KF deutlich höher als bei der GF, jedoch sind die NGS-Daten uneinheitlich. Außerdem eignen sich die Leukozyten als Biomarker weniger als das Plasma, wodurch dieses miRNA als Biomarker nicht in Frage kommt. In den Papillen konnte wiederum ein möglicher Effekt des Futtermittelzusatzstoffes festgestellt werden, da bei der KF die relative Expression bei den CON Kühen höher ist als die der PHY Kühe, wobei diese Daten kritisch zu bewerten sind, da im Vergleich von der GF auf die KF keine klare Regulation zu erkennen ist.

Nach der wichtigen Validierung der NGS-Daten zeigen die Ergebnisse dieser Studie ein gut erkennbares Potenzial für miRNAs, um als Biomarker für SARA in Frage zu kommen. Aufgrund der kleinen Versuchstiergruppengröße sollten die gefundenen miRNA-Sets jedoch in einer größeren Herde auf deren Potenzial erneut überprüft werden, um noch eindeutige und genauere Aussagen über deren Praxisrelevanz treffen zu können. Um einen guten assoziierten Biomarker für die Praxis zu erhalten, sollten die hier gefundenen Ergebnisse außerdem anhand einer laktierenden Herde validiert werden.

7. Conclusio

Um als Biomarker für SARA in Frage zu kommen, ist mit dieser Studie das Vorkommen von bta-miR-2285u, bta-miR-30b-3p, bta-miR-12034, bta-miR-11982, bta-miR-1306 und bta-1388-5p in den Pansenpapillen, im Plasma sowie in den Leukozyten von Schwarzbunten Kühen bestätigt. Durch deren Expressionsverhalten und Potential zur Hoch- oder Herunterregulierung im Plasma als leichtverfügbares Probenmaterial sind bta-miR-2285u, bta-miR-30b-3p und bta-miR-1306 die vielversprechendsten Kandidaten, um als potenzielle Biomarker für SARA zu fungieren; sie erfordern jedoch noch weitere Forschung mit anderen Tieren und einer größeren Probandenzahl.

Die Daten dieser Studie deuten außerdem auf einen Effekt des verwendeten phyto-genen Zusatzfuttermittels auf das Expressionsverhalten der miRNA hin. Ob der Einfluss dieses Futtermittels positiv ist, also den negativen Effekt der konzentratreichen Fütterung abschwächt, oder in keiner klaren Relation zu SARA steht, sollte auch noch weiter abgeklärt werden.

8. Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war (i) der Nachweis von sechs microRNAs (bta-miR-2285u, bta-miR-30b-3p, bta-miR-12034, bta-miR-11982, bta-miR-1306 und bta-1388-5p) in Plasma, Leukozyten und Pansenpapillen mittels qPCR, (ii) die Evaluierung von microRNAs als potenzielle Biomarker für subakute Pansenazidose und (iii) die Überprüfung, ob die Beimengung von phytogenen Zusatzfuttermitteln das Expressionsprofil der microRNAs verändern können. Hierzu wurden neun multipare Schwarzbunte Kühe in zwei Versuchsgruppen geteilt, wobei fünf Kühe als Kontrollgruppe dienten und vier Kühe zusätzlich zu deren Ration mit einem phytogenen Zusatzfüttermittel gefüttert wurden. Mithilfe von small RT-qPCR wurde das Expressionsprofil der microRNAs zuerst in einer faserreichen Grundfütterung und anschließend nach einer und drei Wochen konzentratreicher Fütterung untersucht. Infolgedessen konnten alle oben genannten microRNAs in Plasma, Leukozyten sowie Papillen in allen Fütterungsregimen nachgewiesen werden. Die relative Expression von bta-miR-2285u im Plasma war bei der Kontrollgruppe bei der Grundfütterung höher als nach einer und drei Wochen Konzentratfütterung, wohingegen in den Leukozyten die relative Expression nach drei Wochen Konzentratfütterung angestiegen ist. Als bereits als pansenspezifisch bekannte microRNA und aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit, sollten noch mehr Varianten von bta-miR-2285 untersucht werden, da auch beim Next-Generation-Sequencing insgesamt 23 Mutationen von dieser microRNA gefunden wurden. Bei bta-miR-30b-3p stieg im Plasma und in den Leukozyten die relative Expression im Vergleich von Grundfütterung auf Konzentratfütterung an und bestätigte somit die Next-Generation-Sequencing Ergebnisse der Vorgängerstudie. Somit zeigten beide verglichenen Studien das Potential dieses miRNAs bei Konzentratfütterung im Plasma hochreguliert zu werden. Die relative Expression von bta-miR-1306 sankte von Grundfütterung auf Konzentratfütterung im Plasma. Außerdem zeigte sich in den Papillen und zum Teil im Plasma ein Unterschied in der relativen Expression zwischen Kontrollgruppe und den Tieren, die zusätzlich phytogene Futtermittel bekamen. Die Regulation von bta-miR-1306 war weniger eindeutig als bei den beiden zuvor genannten microRNAs, könnte jedoch mithilfe weiter Studien als Biomarker ebenso in Betracht gezogen werden. Bta-miR-12034, bta-miR-11982 und bta-miR-1388-5p zeigten unregelmäßige und nicht konstante Expressionsverhalten und wurden daher als potenzielle Biomarker ausgeschlossen. Zudem konnte in dieser Arbeit ein Einfluss von phytogenen Zusatzfuttermitteln auf das Expressionsmuster der microRNAs, besonders in den Papillen, gezeigt werden.

9. Summary

The aim of this work was (i) to detect the six selected microRNAs (bta-miR-2285u, bta-miR-30b-3p, bta-miR-12034, bta-miR-11982, bta-miR-1306 and bta-1388-5p) in plasma, leukocytes and rumen papillae via small RNA qPCR, (ii) the evaluation of microRNAs as potential biomarkers for subacute ruminal acidosis, and (iii) the verification if the addition of phytogenic supplemented feed alters the expression profile of microRNA. For this purpose, nine multiparous Holstein cows were divided into two experimental groups, where five cows served as control group and four cows were fed a phytogenic supplemented feed. Using small RNA RT-qPCR, the expression profile of microRNAs was analyzed first in a high-fiber basal diet and then after one and three weeks of high-concentrate feeding. As a result, all the above named microRNAs were detected in plasma, leukocytes, as well as papillae in all feeding regimens. The relative expression of bta-miR-2285u in plasma was higher in the control group in the basic feeding than after one and three weeks of concentrate feeding, whereas in leukocytes the relative expression increased after three weeks of concentrate feeding. As a microRNA already known to be rumen specific and based on the promising results of this work, more variants of bta-miR-2285 should be investigated, as a total of 23 mutations from this microRNA were also found by next-generation-sequencing. For bta-miR-30b-3p, the relative expression increased in plasma and leukocytes when compared from basic to concentrate feeding, confirming the next-generation-sequencing results of the previous study. Therefore, both compared studies demonstrated the potential of this miRNA to be upregulated in plasma upon concentrate feeding. The relative expression of bta-miR-1306 decreased from basal feeding to concentrate feeding in plasma. In addition, a difference in relative expression was evident in the papillae and to some extent in the plasma between the control group and the animals that received additional phytogenic feed. The regulation of bta-miR-1306 was less clear than for the two previously mentioned microRNAs but could also be considered as a biomarker with the help of further studies. Bta-miR-12034, bta-miR-11982, and bta-miR-1388-5p showed irregular and nonconstant expression behavior and were therefore excluded as potential biomarkers. In addition, this work demonstrated an influence of phytogenic supplemental feeds on the expression pattern of microRNAs, especially in the papillae.

10. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1:** Zeitpunkte der Probenentnahme. Die orangen Pfeile markieren die Blutprobenentnahme. Die grünen Pfeile markieren die Papillenprobenentnahme. Auf der y-Achse ist der Anteil an Kraftfutter der Ration in % angeführt. Auf der x-Achse sind die verschiedenen Zeitpunkte der Fütterung: GF = Grundfütterung, KF 1 = eine Woche konzentratreiche Fütterung, KF 2 = zwei Wochen konzentratreiche Fütterung, KF 3 = drei Wochen konzentratreiche Fütterung.12
- Abbildung 2:** Plattenschema für die qPCR. No PAP steht für „no poly A polymerase“, dient also der Kontrolle, ob die cDNA-Synthese stattgefunden hat. NTC steht für „no template control“ und dient als Negativkontrolle.20
- Abbildung 3:** Boxplot-Diagramm zur relativen Expression von bta-miR-2285u im Plasma. Auf der x-Achse befinden sich die beiden Fütterungs-Gruppen zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit dem Schema: CON = Kühe der Kontrollgruppe (n = 5), PHY = Kühe mit Zusatzfuttermittel (n = 4), GF = Grundfütterung, KF 1 = Konzentrat-Fütterung für eine Woche, KF 3 = Konzentrat-Fütterung für drei Wochen. Die y-Achse stellt die relative Expression dar. ** = <0,01, * = <0,05.23
- Abbildung 4:** Boxplot-Diagramm zur relativen Expression von bta-miR-30b-3p im Plasma. Auf der x-Achse befinden sich die beiden Fütterungs-Gruppen zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit dem Schema: CON = Kühe der Kontrollgruppe (n = 5), PHY = Kühe mit Zusatzfuttermittel (n = 4), GF = Grundfütterung, KF 1 = Konzentrat-Fütterung für eine Woche, KF 3 = Konzentrat-Fütterung für drei Wochen. Die y-Achse stellt die relative Expression dar. * = <0,05, + = <0,1.24
- Abbildung 5:** Boxplot-Diagramm zur relativen Expression von bta-miR-12034 im Plasma. Auf der x-Achse befinden sich die beiden Fütterungs-Gruppen zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit dem Schema: CON = Kühe der Kontrollgruppe (n = 5), PHY = Kühe mit Zusatzfuttermittel (n = 4), GF = Grundfütterung, KF 1 = Konzentrat-Fütterung für eine Woche, KF 3 = Konzentrat-Fütterung für drei Wochen. Die y-Achse stellt die relative Expression dar. + = <0,1.24
- Abbildung 6:** Boxplot-Diagramm zur relativen Expression von bta-miR-11982 im Plasma. Auf der x-Achse befinden sich die beiden Fütterungs-Gruppen zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit dem Schema: CON = Kühe der Kontrollgruppe (n = 5), PHY = Kühe mit Zusatzfuttermittel (n = 4), GF = Grundfütterung, KF 1 = Konzentrat-Fütterung für eine Woche,

KF 3 = Konzentrat-Fütterung für drei Wochen. Die y-Achse stellt die relative Expression dar.
 ** = $<0,01$, * = $<0,05$25

Abbildung 7: Boxplot-Diagramm zur relativen Expression von bta-miR-1306 im Plasma. Auf der x-Achse befinden sich die beiden Fütterungs-Gruppen zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit dem Schema: CON = Kühe der Kontrollgruppe (n = 5), PHY = Kühe mit Zusatzfuttermittel (n = 4), GF = Grundfütterung, KF 1 = Konzentrat-Fütterung für eine Woche, KF 3 = Konzentrat-Fütterung für drei Wochen. Die y-Achse stellt die relative Expression dar.
 * = $<0,05$26

Abbildung 8: Boxplot-Diagramm zur relativen Expression von bta-miR-1388-5p im Plasma. Auf der x-Achse befinden sich die beiden Fütterungs-Gruppen zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit dem Schema: CON = Kühe der Kontrollgruppe (n = 5), PHY = Kühe mit Zusatzfuttermittel (n = 4), GF = Grundfütterung, KF 1 = Konzentrat-Fütterung für eine Woche, KF 3 = Konzentrat-Fütterung für drei Wochen. Die y-Achse stellt die relative Expression dar.
 + = $<0,1$26

Abbildung 9: Boxplot-Diagramm zur relativen Expression von bta-miR-2285u in den Leukozyten. Auf der x-Achse befinden sich die beiden Fütterungs-Gruppen zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit dem Schema: CON = Kühe der Kontrollgruppe (n = 5), PHY = Kühe mit Zusatzfuttermittel (n = 4), GF = Grundfütterung, KF 1 = Konzentrat-Fütterung für eine Woche, KF 3 = Konzentrat-Fütterung für drei Wochen. Die y-Achse stellt die relative Expression dar. ** = $<0,01$, * = $<0,05$27

Abbildung 10: Boxplot-Diagramm zur relativen Expression von bta-miR-30b-3p in den Leukozyten. Auf der x-Achse befinden sich die beiden Fütterungs-Gruppen zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit dem Schema: CON = Kühe der Kontrollgruppe (n = 5), PHY = Kühe mit Zusatzfuttermittel (n = 4), GF = Grundfütterung, KF 1 = Konzentrat-Fütterung für eine Woche, KF 3 = Konzentrat-Fütterung für drei Wochen. Die y-Achse stellt die relative Expression dar. * = $<0,05$28

Abbildung 11: Boxplot-Diagramm zur relativen Expression von bta-miR-12034 in den Leukozyten. Auf der x-Achse befinden sich die beiden Fütterungs-Gruppen zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit dem Schema: CON = Kühe der Kontrollgruppe (n = 5), PHY = Kühe mit Zusatzfuttermittel (n = 4), GF = Grundfütterung, KF 1 = Konzentrat-Fütterung für eine Woche, KF 3 = Konzentrat-Fütterung für drei Wochen. Die y-Achse stellt die relative Expression dar. + = $<0,1$28

Abbildung 12: Boxplot-Diagramm zur relativen Expression von bta-miR-11982 in den Leukozyten. Auf der x-Achse befinden sich die beiden Fütterungs-Gruppen zu

unterschiedlichen Zeitpunkten mit dem Schema: CON = Kühe der Kontrollgruppe (n = 5), PHY = Kühe mit Zusatzfuttermittel (n = 4), GF = Grundfütterung, KF 1 = Konzentrat-Fütterung für eine Woche, KF 3 = Konzentrat-Fütterung für drei Wochen. Die y-Achse stellt die relative Expression dar. * = <0,05.....29

Abbildung 13: Boxplot-Diagramm zur relativen Expression von bta-miR-1306 in den Leukozyten. Auf der x-Achse befinden sich die beiden Fütterungs-Gruppen zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit dem Schema: CON = Kühe der Kontrollgruppe (n = 5), PHY = Kühe mit Zusatzfuttermittel (n = 4), GF = Grundfütterung, KF 1 = Konzentrat-Fütterung für eine Woche, KF 3 = Konzentrat-Fütterung für drei Wochen. Die y-Achse stellt die relative Expression dar. * = <0,05.....30

Abbildung 14: Boxplot-Diagramm zur relativen Expression von bta-miR-1388-5p in den Leukozyten. Auf der x-Achse befinden sich die beiden Fütterungs-Gruppen zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit dem Schema: CON = Kühe der Kontrollgruppe (n = 5), PHY = Kühe mit Zusatzfuttermittel (n = 4), GF = Grundfütterung, KF 1 = Konzentrat-Fütterung für eine Woche, KF 3 = Konzentrat-Fütterung für drei Wochen. Die y-Achse stellt die relative Expression dar. ** = <0,01, * = <0,05.....30

Abbildung 15: Boxplot-Diagramm zur relativen Expression von bta-miR-2285u in den Papillen. Auf der x-Achse befinden sich die beiden Fütterungs-Gruppen zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit dem Schema: CON = Kühe der Kontrollgruppe (n = 5), PHY = Kühe mit Zusatzfuttermittel (n = 4), GF = Grundfütterung, KF 1 = Konzentrat-Fütterung für eine Woche. Die y-Achse stellt die relative Expression dar.31

Abbildung 16: Boxplot-Diagramm zur relativen Expression von bta-miR-30b-3p in den Papillen. Auf der x-Achse befinden sich die beiden Fütterungs-Gruppen zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit dem Schema: CON = Kühe der Kontrollgruppe (n = 5), PHY = Kühe mit Zusatzfuttermittel (n = 4), GF = Grundfütterung, KF 1 = Konzentrat-Fütterung für eine Woche. Die y-Achse stellt die relative Expression dar. * = <0,05.....32

Abbildung 17: Boxplot-Diagramm zur relativen Expression von bta-miR-12034 in den Papillen. Auf der x-Achse befinden sich die beiden Fütterungs-Gruppen zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit dem Schema: CON = Kühe der Kontrollgruppe (n = 5), PHY = Kühe mit Zusatzfuttermittel (n = 4), GF = Grundfütterung, KF 1 = Konzentrat-Fütterung für eine Woche. Die y-Achse stellt die relative Expression dar. * = <0,05.....32

Abbildung 18: Boxplot-Diagramm zur relativen Expression von bta-miR-11982 in den Papillen. Auf der x-Achse befinden sich die beiden Fütterungs-Gruppen zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit dem Schema: CON = Kühe der Kontrollgruppe (n = 5), PHY = Kühe mit

Zusatzfuttermittel (n = 4), GF = Grundfütterung, KF 1 = Konzentrat-Fütterung für eine Woche. Die y-Achse stellt die relative Expression dar. ** = $<0,01$, * = $<0,05$33

Abbildung 19: Boxplot-Diagramm zur relativen Expression von bta-miR-1306 in den Papillen. Auf der x-Achse befinden sich die beiden Fütterungs-Gruppen zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit dem Schema: CON = Kühe der Kontrollgruppe (n = 5), PHY = Kühe mit Zusatzfuttermittel (n = 4), GF = Grundfütterung, KF 1 = Konzentrat-Fütterung für eine Woche. Die y-Achse stellt die relative Expression dar. + = $<0,1$34

Abbildung 20: Boxplot-Diagramm zur relativen Expression von bta-miR-1388-5p in den Papillen. Auf der x-Achse befinden sich die beiden Fütterungs-Gruppen zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit dem Schema: CON = Kühe der Kontrollgruppe (n = 5), PHY = Kühe mit Zusatzfuttermittel (n = 4), GF = Grundfütterung, KF 1 = Konzentrat-Fütterung für eine Woche. Die y-Achse stellt die relative Expression dar. * = $<0,05$34

11. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: qPCR-Programm zur Primeretablierung.	20
Tabelle 2: Programm für die qPCR am Thermocycler ViiA7.	21
Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Primer und deren für die qPCR verwendeten Anlagerungs-Temperaturen.....	22
Tabelle 4: Übersicht der signifikanten ($p < 0,05$) Expressionsunterschiede mit steigendem Krafftfutteranteil. ↓ = geringere relative Expression mit steigendem Krafftfutteranteil, ↑ = höhere relative Expression mit steigendem Krafftfutteranteil, x = keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Fütterungsregimen, CON = Kühe der Kontrollgruppe (n = 5), PHY = Kühe mit Zusatzfuttermittel (n = 4), ALLE = Alle Versuchstiere (CON + PHY, n = 9).....	35
Tabelle 5: Übersicht der signifikanten ($p < 0,05$) Expressionsunterschiede zwischen den Kontrolltieren und den Kühen mit Supplementierung des phytogenen Zusatzfuttermittels in den Versuchswochen. ↓ = geringere relative Expression bei den mit Zusatzfuttermittel supplementierten Tieren als bei den Kontrolltieren, ↑ = höhere relative Expression bei den mit Zusatzfuttermittel supplementierten Tieren als bei den Kontrolltieren, x = keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen, GF = Grundfütterung, KF 1 = Konzentrat-Fütterung für eine Woche, KF 3 = Konzentrat-Fütterung für drei Wochen.	36

12. Literaturverzeichnis

- Aschenbach JR, Zebeli Q, Patra AK, Greco G, Amasheh S, Penner GB. 2019. Symposium review: The importance of the ruminal epithelial barrier for a healthy and productive cow. *Journal of Dairy Science*, 102 (2): 1866–1882. DOI 10.3168/jds.2018-15243.
- Aschenbach JR, Bilk S, Tadesse G, Stumpff F, Gäbel G. 2009. Bicarbonate-dependent and bicarbonate-independent mechanisms contribute to nondiffusive uptake of acetate in the ruminal epithelium of sheep. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 296 (5): G1098-107. DOI 10.1152/ajpgi.90442.2008.
- Dijkstra J, Ellis JL, Kebreab E, Strathe AB, López S, France J, Bannink A. 2012. Ruminal pH regulation and nutritional consequences of low pH. *Animal Feed Science and Technology*, 172 (1-2): 22–33. DOI 10.1016/j.anifeedsci.2011.12.005.
- Dong H, Gao Q, Peng X, Sun Y, Han T, Zhao B, Liu Y, Wang C, Song X, Wu J and Yang L. 2017. Circulating microRNAs as potential biomarkers for veterinary infectious diseases. *Front. Vet. Sci.* 4:186. DOI: 10.3389/fvets.2017.00186
- Enemark JMD. 2008. The monitoring, prevention and treatment of sub-acute ruminal acidosis (SARA): a review. *Veterinary journal*, 176 (1): 32– 43. DOI 10.1016/j.tvjl.2007.12.021.
- 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.
- 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.
- Ioannidis J, Donadeu FX. 2016. Circulating microRNA profiles during the bovine oestrous cycle. *PLoS ONE*, 11 (6): e0158160. DOI: 10.1371/journal.pone.0158160
- Ioannidis J, Sánchez-Molano E, Psifidi A, Donadeu FX, Banos G. 2018. Association of plasma microRNA expression with age, genetic background and functional traits in dairy cattle. *Scientific reports*, 8 (1): 12955. DOI 10.1038/s41598-018-31099-w.
- Johanns S. 2021. Unravelling the role of miRNAs and its potential as Biomarker in a SARA animal model [Diplomarbeit]. Wien: Veterinärmedizinische Universität.

- Keunen JE, Plaizier JC, Kyriazakis L, Duffield TF, Widowski TM, Lindinger MI, McBride BW. 2002. Effects of a subacute ruminal acidosis model on the diet selection of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 85 (12): 3304–3313. DOI 10.3168/jds.S0022-0302(02)74419-6.
- Kleen JL, Cannizzo C. 2011. 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.
- 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.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods*, 25: 402-408. DOI 10.1006/meth.2001.1262
- Muroya S, Shibata M, Hayashi M, Oe M, Ojima K. 2016. Differences in circulating microRNAs between grazing and grain-fed wagyu cattle are associated with altered expression of intramuscular microRNA, the potential target PTEN, and lipogenic genes. *PloS one*, 11 (9): e0162496. DOI 10.1371/journal.pone.0162496.
- Neubauer V, Petri R, Humer E, Kröger I, Mann E, Reisinger N, Wagner M, Zebeli Q. 2018. High-grain diets supplemented with phytogenic 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.
- O'Brien J, Hayder H, Zayed Y and Peng C. 2018. Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. *Front. Endocrinol.* 9:402. DOI: 10.3389/fendo.2018.00402
- Pacifico, C, Ricci S, Sajovitz F, Castillo-Lopez E, Rivera-Chacon R, Petri RM, Zebeli Q, Reisinger N, Kreuzer-Redmer S. 2022. Bovine rumen epithelial miRNA-mRNA dynamics reveals post-transcriptional regulation of gene expression upon transition to high-grain feeding and phytogenic supplementation. *Genomics*, 114(3), 110333. DOI: 10.1016/j.ygeno.2022.110333
- 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.

- Rivera-Chacon R, Castillo-Lopez E, Ricci S, Petri RM, Reisinger N, Zebeli Q. 2022. Supplementing a phytogenic feed additive modulates the risk of subacute rumen acidosis, rumen fermentation and systemic inflammation in cattle fed acidogenic diets. *Animals*, 12: 1201. DOI: 10.3390/ani12091201
- Salomon F-V, Geyer H, Gille U, Achilles W, Hrsg. 2008. *Anatomie für die Tiermedizin*. Zweite., überarbeitete und erweiterte Aufl. Stuttgart: Enke.
- Sohel MH. 2016. Extracellular/circulating microRNAs: Release mechanisms, functions and challenges. *Achievements in the Life Sciences*, 10: 175–186. DOI: 10.1016/j.als.2016.11.007
- Stenfeldt C, Arzt J, Smoliga G, LaRocco M, Gutkoska J, Lawrence P. 2017. Proof-of-concept study: profile of circulating microRNAs in bovine serum harvested during acute and persistent FMDV infection. *Virology Journal*, 14: 71. DOI: 10.1186/s12985-017-0743-3.
- Sun H-Z, Chen Y, Le Guan L. 2019. MicroRNA expression profiles across blood and different tissues in cattle. *Scientific data*, 6: 190013. DOI 10.1038/sdata.2019.13.
- Wahid F, Shehzad A, Khan T, Kim YY. 2010. MicroRNAs: synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials. *Biochimica et biophysica acta*, 1803 (11): 1231–1243. DOI 10.1016/j.bbamcr.2010.06.013.
- Weiland M, Gao X-H, Zhou L, Mi Q-S. 2012. Small RNAs have a large impact. *RNA Biology*, 9(6), 850–859. DOI: 10.4161/rna.20378
- Zhao K, Liang G, Sun X, Guan LL. 2016. Comparative miRNAome analysis revealed different miRNA expression profiles in bovine sera and exosomes. *BMC Genomics*, 17:630. DOI: 10.1186/s12864-016-2962-1
- Zebeli Q, Ametaj BN. 2009. Relationships between rumen lipopolysaccharide and mediators of inflammatory response with milk fat production and efficiency in dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 92 (8): 3800–3809. DOI 10.3168/jds.2009-2178.
- 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.