

RAZISKAVE MIKRO RNA PRI GOVEDU, PRAŠIČIH, OVCAH IN KOKOŠIH

Neža POGOREVC¹, Minja ZORC², Tanja KUNEJ³

Delo je prispelo 26. maja 2015, sprejeto 30. junija 2015.
Received May 26, 2015; accepted June 30, 2015.

Raziskave mikro RNA pri govedu, prašičih, ovcah in kokoših

Mikro RNA (miRNA) so kratke nekodirajoče RNA, ki imajo pomembno funkcijo pri uravnavanju izražanja genov. Polimorfizmi v prekurzorjih miRNA, v tarčnih genih ali znotraj komponent, ki sodelujejo pri mehanizmu utišanja genov, pomembno prispevajo k fenotipski raznovrstnosti pri živalih. Zaradi te vloge so miRNA postale predmet naraščajočega zanimanja za raziskave v povezavi s proizvodnimi lastnostmi v živalih. V članku smo predstavili primere povezav med miRNA in fenotipom pri štirih vrstah rejnih živali: govedu, prašičih, ovcah in kokoših. Večina raziskav o delovanju miRNA je usmerjenih predvsem v mišično in maščobno tkivo, spolne žleze, razvoj zarodka in imunski odziv organizma. Delovanje miRNA vpliva tudi na produktivnost živali in posledično na ekonomsko uspešnost priraje. S tem, ko razumemo delovanje miRNA v različnih bioloških procesih, jih lahko uporabljamo za razvijanje novih strategij za izboljšanje produktivnosti rejnih živali.

Ključne besede: živinoreja / genetika / mikro RNA

1 UVOD

Mikro RNA (miRNA) so nekodirajoče RNA (ncRNA), dolge približno 21 nukleotidov, ki uravnavajo izražanje tarčnih genov. Ocenili so, da okoli 1000 miRNA uravnava izražanje vsaj tretjine genov pri živalih (Georges in sod., 2007; Wang in sod., 2013).

Prva miRNA je bila odkrita pri *Caenorhabditis elegans*. Od takrat so jih začeli odkrivati pri različnih živalskih in rastlinskih vrstah, kjer igrajo pomembno vlogo pri številnih bioloških procesih, kot so razvoj, apoptoza, diferenciacija in proliferacija celic (Wang in sod., 2013). V številnih študijah so ugotovili, da lahko miRNA vpli-

Micro RNA research in cattle, pig, sheep, and chicken

MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs that play key roles in regulating gene expression. Polymorphisms in miRNA precursors, target genes or within components of silencing machinery contribute significantly to the phenotypic diversity in animals. Due to this role miRNAs became the subject of increased research interest in association with production traits in livestock. In this article we presented examples of associations between miRNA genes and phenotypes of four livestock species: cattle, pig, sheep, and chicken. Most miRNA research studies are focused on their functioning in muscle, adipose tissues, gonads, fetal development and immune system. MicroRNA functions also impact animal productivity and consequently economic success of farming. With understanding miRNA functions in various biological pathways it is possible to develop new strategies for improving the productivity of livestock.

Key words: animal production / genetics / microRNA

vajo na fenotip organizma (Georges in sod., 2007). Eden takšnih primerov je mišična hipertrofija pri ovcah pasme teksel, ki je posledica translacijske inhibicije gena za miostatina, za katero je odgovorna miRNA (Clop in sod., 2006). Poznavanje funkcije miRNA pri rejnih živalih je pomembno za razumevanje regulacije različnih bioloških procesov in možnosti razvijanja novih strategij za izboljšanje proizvodnosti živali (Wang in sod., 2013).

V članku smo opisali biogenezo in delovanje miRNA ter vpliv na fenotipsko variabilnost in razvoj bolezni pri rejnih živalih. Opisali smo vpliv miRNA na ekonomsko pomembne lastnosti pri štirih vrstah: govedu, prašičih, ovcah in kokoših.

¹ Univ. v Ljubljani, Biotehniška fak., Odd. za zootehniko, Groblje 3, SI-1230 Domžale, Slovenija, e-naslov: neza_pogo@hotmail.com

² Isti naslov kot 1, e-naslov: minja.zorc@bf.uni-lj.si

³ Isti naslov kot 1, e-naslov: tanja.kunej@bf.uni-lj.si

2 PREGLED OBJAV

2.1 BIOGENEZA MIKRO RNA

Biogeneza miRNA se začne v jedru s primarnimi prepisi (pri-miRNA), ki so dolgi več sto ali tisoč baznih parov. Te predpise nato proteinski kompleks Drosha razcepi v 60 do 70 nukleotidov dolge prekursorske miRNA (pre-miRNA), ki imajo značilno strukturo lasničnih zank (Lee in sod., 2002; Bartel, 2004). Pre-miRNA preko transportnega proteina Exportin-5 potujejo iz jedra v citoplazmo, kjer jih prepozna encimski kompleks Dicer in jim odcepi zanko. S tem tvori približno 22 nukleotidov dolgo dvojno vijačnico zrele miRNA (angl. mature miRNA) (Hutvagner in sod., 2001). Dvojna vijačnica se razkline in vstopi v ribonukleoproteinski kompleks RISC (Khvorova in sod., 2003), v katerem pride do interakcije miRNA z informacijsko RNA (mRNA), ki privede do utišanja izražanja gena (McDanel, 2009).

2.2 MEHANIZMI DELOVANJA miRNA

Delovanje miRNA pri živalih je kompleksno, saj vključuje različne mehanizme in interakcije med njimi, ki še niso popolnoma raziskane (Georges in sod., 2007). Komplementarnost med miRNA in njeno tarčno mRNA je lahko delna ali popolna. Za vezavo na tarčo je odgovorno zaporedje od drugega do osmega nukleotida s 5' konca verige miRNA, ki ga imenujemo območje "seed" (Wang in sod., 2013).

Predlagane so tri prevladujoče teorije o vlogi miRNA pri uravnavanju izražanja genov. Ko se miRNA vključi v kompleks RISC in veže na 3' konec neprevedene regije s tem (a) povzroči razgradnjo mRNA, (b) onemogoči prevajanje mRNA ali (c) premakne mRNA v P-telesca (angl. P-bodies), kjer se ta kasneje razgradi (McDanel, 2009).

2.3 POLIMORFIZMI POVEZANI Z URAVNAVANJEM IZRAŽANJA GENOV S POSREDOVANJEM miRNA

Znane so tri glavne kategorije polimorfizmov, ki vplivajo na mehanizme uravnavanja izražanja genov s posredovanjem miRNA; v genih za miRNA, v tarčnih genih in v ostalih sodelujočih komponentah tega mehanizma (pregl. 1).

1) V genih za miRNA je lahko spremenjeno zaporedje zrele miRNA, ki povzroči stabilizacijo ali destabilizacijo interakcije s tarčo. Prav tako so polimorfizmi lahko prisotni v pri- ali pre-miRNA in vplivajo na stabilnost ali učinkovitost procesiranja. Mutacije, ki delujejo v *cis* ali *trans* na promotor pri-miRNA lahko vplivajo na raven prepisovanja. Opisane pa so bile tudi različice v številu kopij (angl. copy number variations), ki vplivajo na število kopij miRNA (Georges in sod., 2007).

2) V tarčnih genih za miRNA se lahko pojavijo mutacije, ki vplivajo na funkcionalnost vezavnih mest ter s tem stabilizirajo ali destabilizirajo interakcije z miRNA. Polimorfizmi lahko ustvarijo nova mesta za vezavo miRNA ali pa povzročijo nastanek alternativne poliadenilacije in vplivajo na zgradbo 3' konca tarčnega gena.

3) Polimorfizmi lahko vplivajo tudi na ostale komponente mehanizma za utišanje genov s spreminjanjem zaporedja aminokislin ali s spreminjanjem koncentracije komponent. Prav tako pa se lahko geni nahajajo v območju različic v številu kopij (Georges in sod., 2007).

2.4 RAZISKAVE miRNA PRI REJNIM ŽIVALIM

Raziskave miRNA v živinoreji se osredotočajo predvsem na ekonomsko pomembne lastnosti, ki so povezane s pridelavo mleka, mesa in jajc ter tudi na tiste, ki vplivajo na produktivnost živali, njihovo plodnost, preživetveno sposobnost zarodkov in odpornost proti boleznim. Poleg

Preglednica 1: Kategorije polimorfizmov, ki vplivajo na z miRNA posredovano uravnavanje genov

Table 1: Categories of polymorphisms that affect miRNA-mediated gene regulation

	Polimorfizmi v genih za miRNA	Polimorfizmi v tarčah za miRNA	Polimorfizmi v genih, ki kodirajo komponente mehanizma za utišanje genov (angl. silencing machinery) (npr.: Dicer, Drosha)
i)	Spremenijo zaporedje zrele miRNA, pri- ali pre-miRNA	Spremenijo vezavno mesto za miRNA	Spremenijo zaporedje aminokislin
ii)	Spremenijo zaporedje promotorja pri-miRNA	Ustvarijo neligitimno vezavno mesto za miRNA	Spremenijo koncentracijo proteina
iii)	Različice v številu kopij vplivajo na število kopij miRNA	Spremenijo 3' konec zaporedja gena (npr. alternativna poliadenilacija)	Različice v številu kopij

(prirejeno po Georges in sod., 2007)

Preglednica 2: Mikro RNA in njihove funkcije pri govedu

Table 2: MicroRNAs and their functions in cattle

Mikro RNA	Funkcija miRNA	Vir
<i>miR-143</i>	Diferenciacija in proliferacija preadipocitov	Li in sod., 2011
<i>miR-19a, -92a, -92b, -101, -103, -106, -142-5p, -296, -378</i>	Adipogeneza	Jin in sod., 2010; Romao in sod., 2012
<i>miR-1, miR-206, -181b</i>	Diferenciacija mišičnih celic	Naguibneva in sod., 2006; Miretti in sod., 2010; Townley-Tilson in sod., 2010
<i>miR-106a</i>	Razvoj oocitov	Miles in sod., 2012
<i>miR-205, -150, -122, -96, -146a, -146b-5p</i>	Zorenje oocitov	Abd El Naby in sod., 2011
<i>miR-196a</i>	Zorenje foliklov	Tripurani in sod., 2011
<i>miR-181a</i>	Zgodnji razvoj zarodka in odziv imunskega sistema	Lingenfelter in sod., 2011; Naeem in sod, 2012
<i>miR-21, miR-130a</i>	Zgodnji razvoj zarodka	Guduric-Fuchs in sod., 2012; Mondou in sod., 2012
<i>miR-155, -223</i>	Protivnetna vloga	Izumi in sod, 2012

tega imajo miRNA potencial za razvoj biooznačevalcev (biomarkerjev) za nekatere bolezni in za razvoj diagnostičnih testov (Fatima in Morris, 2013).

Za miRNA velja, da so evlucijsko ohranjene. Veliko miRNA pri človeku ima podobne funkcije in podobna zaporedja kot miRNA pri rejnih živalih, kar kaže na evlucijsko ohranjanje funkcij miRNA. Nekatere družine miRNA pa so specifične za posamezno vrsto, saj jih ob primerjavi z drugimi genomi ne najdejo (Lawless in sod., 2014). Trenutna verzija podatkovne zbirke miRBase (verzija 21, junij 2014) vsebuje 3477 zrelih miRNA pri govedu, kokoših, konjih, prašičih, ovcah in kozah skupaj.

2.4.1 MIKRO RNA PRI GOVEDU

V genomu goveda so do sedaj odkrili 793 zrelih miRNA, ki so kodirane na vseh kromosomih (Lawless in sod., 2014). Študije se osredotočajo predvsem na vlogo miRNA v maščevju, skeletnih mišicah, oocitu in razvoju zarodka. V preglednici 2 je naštetih nekaj teh vlog miRNA.

Izražanje *miR-143* se poveča ob diferenciaciji intramuskularnih preadipocitov v adipocite (Li in sod., 2011). Osem miRNA (*miR-19a, -92a, -92b, -101, -103, -106, -142-5p* in *-296*), ki se izraža v maščobnem tkivu, se odziva na vnos krme z visoko vsebnostjo maščob. Domnevajo, da so del regulatornega omrežja genov, ki posredujejo pri konzumaciji z maščobami obogatene obroka, kar povzroča adipogenezo (Romao in sod., 2012).

Nekatere živali pasme piemontese so imele dvojno omišičenost zaradi točkovne mutacije v genu za miosta-

tin (Berry in sod., 2002). Miretti in sod. (2011) so primerjali izražanje teh dveh miRNA v skeletnih mišicah pri pasmi piemontese in črno-beli pasmi. Ugotovili so, da v izražanju *miR-1* ni razlik med pasmama, medtem ko so za *miR-206* ugotovili višje izražanje pri piemontese kot pri črno-beli, kar pomeni, da *miR-206* prispeva k mišični hipertrofiji pasme piemontese.

Izražanje *miR-106a* v oocitu goveda je bilo višje kot pri kompleksu jajčna celica-kumulus. Izražanje gena *WEE1A*, na katerega deluje *miR-106a*, je bilo v oocitu goveda posledično nižje kot pri kompleksu jajčna celica-kumulus. Te razlike kažejo na vlogo *miR-106a* pri razvoju oocitov s tem, ko znižujejo raven izražanja gena *WEE1A* (Miles in sod., 2012). Podobno delujeta tudi *miR-196a* in *miR-181a*. Prva deluje na gen *NOBOX* (Tripurani in sod., 2011) in druga deluje na gen *NPM2* (Lingenfelter in sod., 2011). Poleg tega so tarče *miR-181a* tudi geni, ki so pomembni pri fagocitozi in procesiranju antigenov (Naeem in sod, 2012).

Ob primerjavi izražanja miRNA v kolostrumu in v zrelem mleku, so ugotovili, da je bilo kar nekaj miRNA višje izraženih v kolostrumu, med njimi *miR-155* in *miR-223* (Izumi in sod, 2012). Pri tem *miR-155* regulira diferenciacijo imunskih T-celic, *miR-223* pa je povezan z aktivacijo nevtrofilcev (Lindsay, 2008).

2.4.2 MIKRO RNA PRI KOKOŠIH

Kokoši so pomembne tako z vidika prireje mesa kot z vidika prireje jajc, zato so vloge miRNA pri razvoju mišičnega in maščobnega tkiva ter pri procesu nastajanja

Preglednica 3: Mikro RNA in njihove funkcije pri govedu**Table 3:** MicroRNAs and their functions in cattle

Mikro RNA	Funkcija miRNA	Vir
<i>miR-1a</i> , -133a, -122, -199	Razvoj maščobnega tkiva in skeletnih mišic	Wang in sod., 2012
<i>miR-206</i> , -10b, -1, -23b, -19b, -23a, -27a	Razvoj skeletnih mišic	Sweetman in sod., 2006; Li in sod., 2011; Wang in sod., 2012
<i>miR-143</i>	Proliferacija in apoptoza celic maščobnega tkiva	Trakooljul in sod., 2010
<i>miR-126</i> , -455-5p, -181b, -145	Diferenciacija maščobnih celic	Wang in sod., 2012
<i>miR-221</i> , -142-3p, -365, -34a	Hondrogeneza	Kim in sod., 2010, 2011a, 2011b, 2012; Guan in sod., 2011;
<i>miR-202*</i> , -101, -31, -202-5p	Razvoj moških in ženskih spolnih žlez	Bannister in sod., 2011; Cutting in sod., 2012
<i>miR-499</i> , <i>miR-1709</i>	Razvoj jajcevoda in nastajanje jajc	Lee in sod., 2012
<i>miR-124a</i> , <i>miR-1669</i>	Razvoj jajcevoda in zarodka	Jeong in sod., 2012
<i>miR-181a*</i>	Diferenciacija in delitev primordialnih zarodnih celic	Lee in sod., 2011
<i>miR-15c</i> , -29b, -383, -222	Metilacija DNA v primordialnih zarodnih celicah	Rengaraj in sod., 2011
<i>miR-302</i> , <i>miR-456</i>	Urnavnanje diferenciacije blastoderma	Lee in sod., 2011

jajc prav tako pomembne (Wang in sod., 2013). Trenutno je v podatkovni zbirki miRBase zbranih že 994 zrelih miRNA. Odkrili so tudi že veliko njihovih vlog, od katerih jih je nekaj predstavljenih v preglednici 3.

V maščobnem tkivu *miR-122* deluje na gene, ki med drugim sodelujejo pri odpornosti na vročinski stres in pri tvorbi hrustanca in kosti. Na drugi strani *miR-133a* v skeletnih mišicah vpliva na gene, ki sodelujejo pri različnih celičnih procesih kot so izražanje mRNA, regulacija sterolov, transport ionov itd. V skeletnih mišicah deluje tudi *miR-1a*. Delovanje te miRNA vpliva na gene, ki tvorijo receptorje na transmembranskih proteinih, ki so pomembni za zvijete, procesiranje, stabilnost in lokalizacijo proteinov in ki domnevno sodelujejo pri diferenciaciji, proliferaciji in smrti celic. V obeh tkivih deluje *miR-199* in sicer v maščevju vpliva na delovanje lipoproteinske lipaze ter v mišicah ureja razvoj GTP-vezavnega proteina (Wang in sod., 2012). Izražanje fibroblastnega rastnega faktorja (FGF4) v mišicah, ki ima ključno vlogo pri miogenezi, vpliva na transkripcijo *miR-1* in *miR-206* (Sweetman in sod., 2006). Skupaj z *miR-10b*, je *miR-206* največkrat dokazana miRNA v skeletnih mišicah tako pri nesnih kot pri pitovnih pasmah kokoših, tudi njuni vlogi sta povezani z razvojem skeletnih mišic (Li in sod., 2013).

Mikro RNA urejajo tudi spolni dimorfizem in vodijo razvoj ženskih in moških spolnih žlez pri kokoših. Eden takšnih je gen *miR-202**, ki je na vseh razvojnih stopnjah testisov višje izražen kot pri razvoju jajčnikov, kar kaže na njegovo vlogo pri razvoju moških gonad

(Bannister in sod., 2011). *MiR-499* in *miR-1709* sta povezani z regulacijo rastnega faktorja pleiotropina (angl. pleiotrophin; PTN) (Lee in sod., 2012). Na izražanje proteina AHCYL1 (angl. S-adenosylhomocysteine hydrolase-like 1), ki je pomemben pri razvoju zarodka, vplivata *miR-124a* in *miR-1669*. Poleg tega so tarčni geni teh dveh miRNA vključeni v razvoj in diferenciacijo jajcevoda (Jeong in sod., 2012).

V primordialnih zarodnih celicah imajo vlogo *miR-181a**, -15c, -29b, -383 in -222. Prva, *miR-181a**, zavira diferenciacijo teh celic in preprečuje njihov vstop v mejozo (Lee in sod., 2011). Ostale miRNA nadzirajo gen *DNMT3B*, ki je odgovoren za metilacijo DNA v zarodnih celicah (Rengaraj in sod., 2011). *MiR-302* in *miR-456* vplivata na transkripcijski dejavnik iz družine SOX in s tem ohranjata celice blastoderma na nediferencirani stopnji (Lee in sod., 2011).

Polimorfizmi posameznih nukleotidov (angl. single nucleotide polymorphism; SNP), ki nastanejo znotraj regije *seed* zrele miRNA pomembno vplivajo na fenotipske lastnosti. Nekaj takšnih so odkrili pri kokoših, med drugimi znotraj gena za *miR-1657*, za te miRNA so ugotovili, da pomembno vplivajo na rast piščancev in na lastnosti kakovosti mesa (Li in sod., 2012). Tudi SNP znotraj gena *miR-1614-3p* posredno vpliva na kakovost mesa s tem, ko vpliva na sposobnost mišic, da zadržujejo vodo, na mehkoobo mesa (angl. muscle tenderness) in na količino abdominalne maščobe (Li in sod., 2013).

Preglednica 4: Mikro RNA in njihove funkcije pri prašičih

Table 4: MicroRNAs and their functions in pigs

Mikro RNA	Funkcija miRNA	Vir
<i>miR-155</i>	Razvoj skeletnih mišic in vloga pri odpornosti	Zhao in sod., 2012)
<i>miR-1, -206, -148a</i>	Miogeneza	Holley in sod, 2011; Tang in sod., 2014
<i>miR-215, -135, -224, -146b, -1a, -133a, -122, -204, -183, -143, -103, -148</i>	Razvoj in rast maščobnega tkiva	Li in sod., 2011; Chen in sod., 2012
<i>miR-122</i>	Metabolizem lipidov	Cirera in sod., 2010
<i>miR-148b</i>	Razkrečenost nog	Maak in sod., 2010
<i>miR-378</i>	Razvoj in delovanje jajčnikov ter miogeneza	Xu in sod., 2011
<i>miR-153, -205, -196, -485-3p, -149*</i>	Regulacija spermatogeneze	Lian in sod., 2012
<i>miR-18a, -21, -24</i>	Pomembni celični procesi pri zarodkih	Stowe in sod, 2012
<i>miR-27a</i>	Velikost gnezda	Lei in sod., 2011

2.4.3 MIKRO RNA PRI PRAŠIČIH

Prašiči so gospodarsko izredno pomembna vrsta živali za prirejo mesa. Poleg tega so tudi dobri modelni organizmi. V številnih raziskavah so raziskovali vpliv miRNA na izboljšanje njihove proizvodnosti. Zrelah miRNA, odkritih pri prašičih, je v podatkovni zbirki miRBase 411. Nekatere vloge miRNA v bioloških procesih so nasete v preglednici 4.

Gen *OLFML3* (angl. olfactomedin-like 3), ki je vključen v formiranje matriksa med mišičnimi celicami, se različno izraža v skeletnih mišicah pasme landrace kot pri pasmi tongcheng na pre- in postnatalni ravni razvoja prašičev. Odkrili so, da izražanje tega gena uravnava *miR-155*. Zvišano raven izražanja te miRNA so odkrili tudi v vranici, kjer ureja imunost (Zhao in sod., 2012).

Ob primerjavi izražanja miRNA v maščevju so ugotovili razlike med pasmami. Pri pasmi veliki beli prašič so bile bolj izražene *miR-215, -135, -224* in *-146b*, pri pasmi meishan pa so bile bolj izražene *miR-1a, -133a, -122, -204* in *-183*. Prašiči pasme meishan so znani kot bolj zamaščeni (Chen in sod., 2012). Z debelostjo povezujejo *miR-122*, ki je pomemben regulator metabolizma lipidov. Pri pujskih, ki so jih krmili z visoko kaloričnim obrokom, so opazili nižjo raven izražanja *miR-122* kot pri tistih, ki so jih krmili z normalnim obrokom (Cirera in sod., 2010).

Hormoni jajčnikov so zelo pomembni pri repro-

dukaciji. Encim aromataza pretvori androgen v estrogen in uravnavanje gena *CYP19* lahko vpliva na razvoj in delovanje jajčnikov. Znižano raven izražanja gena za aromatazo povzroči *miR-378* (Xu in sod., 2011).

Veliko miRNA so našli v oocitih in zarodkih. Med njimi *miR-18a, -21* in *-24*, katerih tarčni geni so vključeni v diferenciacijo in signalizacijo celic in še v nekatere druge celične procese (Stowe in sod., 2012). Polimorfizem posameznega nukleotida v genu za *miR-27a* je bil odkrit pri pasmi veliki beli prašič in pri maternalni liniji modernega mesnega tipa kitajskih prašičev (angl. Dam line of Chinese lean-type new lines pigs). Znotraj slednje se je pokazala velika razlika v velikosti gnezd med posameznimi genotipi, medtem ko pri velikem belem prašiču te razlike niso opazili (Lei in sod., 2011).

2.4.4 MIKRO RNA PRI OVCAH

V literaturi najbolj citirana posledica delovanja miRNA pri rejnih živalih je bila odkrita pri ovcah. To je mišična hipertrofija pri pasmi teksel (angl. texel). Poleg te sta v preglednici 5 prikazani še dve povezavi med miRNA in fenotipom živali. V zbirki miRBase je zbranih 153 zrelih miRNA za to vrsto.

Gen za miostatin je pomemben regulator pri rasti in razvoju skeletnih mišic. Zaradi zamenjave gvanina za adenin na 3' koncu tega gena, nastane na tem delu tarčno mesto za *miR-1* in *miR-206*. Ti dve miRNA z vezavo na tarčno mesto inhibirata gen za miostatin in s tem vplivata na razvoj mišične hipertrofije ovc pasme teksel (Clop in sod., 2006).

V dolgi hrbtni mišici se izraža *let-7g*, ob povišanem izražanju te miRNA se zmanjša, ob znižanem izražanju pa poveča nastajanje adipocitov (Yan in sod., 2013). *MiR-*

Preglednica 5: Mikro RNA in njihove funkcije pri ovcah

Table 5: MicroRNAs and their functions in sheep

Mikro RNA	Funkcija miRNA	Vir
<i>miR-1, miR-206</i>	Mišična hipertrofija	Clop in sod., 2006
<i>let-7g</i>	Adipogeneza	Yan in sod., 2013
<i>miR-22</i>	Razvoj testisov	Torley in sod., 2011

22 se izraža v Sertolijevih celicah, kjer preprečujejo vplivanje estrogena na zarodek v času razvoja testisov (Torley in sod., 2011).

2.4.5 BIOINFORMACIJSKA ORODJA ZA RAZISKAVE MIRNA V ŽIVINOREJI

Kljub pomembni vlogi, ki jo imajo miRNA, je, v primerjavi z drugimi vrstami, raziskav pri rejnih živalih precej manj. Prav tako je pri teh vrstah razvitih manj bioinformacijskih orodij in podatkovnih zbirk. V okviru naših raziskav smo razvili bioinformacijsko orodje miRNA SNIper, ki omogoča analizo genetske variabilnosti pri 15 vrstah živali (Zorc in sod., 2015). Z analizo *in silico* na ravni celotnega genoma smo izdelali katalog polimorfizmov v zrelih miRNA pri rejnih živali.

3 ZAKLJUČEK

Čeprav so miRNA še pred nekaj več kot dvajsetimi leti uvrščali med nefunkcionalne regije genoma, jih danes dojemamo povsem drugače. Z raziskavami so ugotovili, da je tudi ta nekodirajoči del genoma funkcionalen in ima pomembno vlogo pri uravnavanju izražanja kodirajočih genov. S svojim delovanjem vplivajo na potek različnih bioloških poti tudi pri rejnih živalih in posredno s tem na njihove ekonomsko pomembne lastnosti v kmetijstvu. Prisotne so v različni tkivih in telesnih tekočinah, kjer vplivajo na razvoj mišic, rast maščevja, delovanje spolnih žlez, razvoj zarodka in imunske odzive. Informacije o delovanju miRNA, o polimorfizmih, ki vplivajo na njihovo delovanje in o tarčnih genih bi lahko postale pomembne komponente selekcijskih programov za izboljšanje fenotipskih lastnosti rejnih živali. Mehanizmi delovanja miRNA so zelo kompleksni in še niso v celoti raziskani. Dosedanje študije kažejo, da imajo miRNA velik potencial za aplikacijo v kmetijstvu.

4 VIRI

Abd El Naby W.S., Hagos T.H., Hossain M.M., Salilew-Wondim D., Gad A.Y., Rings F., Cinar M.U., Tholen E., Looft C., Schellander K., Hoelker M., Tesfaye D. 2011. Expression analysis of regulatory microRNAs in bovine cumulus oocyte complex and preimplantation embryos. *Zygote*, 21, 1: 31–51. doi:10.1017/S0967199411000566

Bannister S.C., Smith C.A., Roeszler K.N., Doran T.J., Sinclair A.H., Tizard M.L. 2011. Manipulation of estrogen synthesis alters MIR202* expression in embryonic chicken gonads. *Biology of Reproduction*, 85, 1: 22–30. doi:10.1095/biolreprod.110.088476

Bartel D.P. 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116, 2: 281–297. doi:10.1016/S0092-8674(04)00045-5

Berry C., Thomas M., Langley B., Sharma M., Kambadur R. 2002. Single cysteine to tyrosine transition inactivates the growth inhibitory function of Piedmontese myostatin. *American Journal of Physiology Cell Physiology*, 283, 1: C135–C141. doi:10.1152/ajpcell.00458.2001

Chen C., Deng B., Qiao M., Zheng R., Chai J., Ding Y., Peng J., Jiang S. 2012. Solexa sequencing identification of conserved and novel microRNAs in backfat of Large White and Chinese Meishan pigs. *Plos One*, 7, 2: e31426. doi:10.1371/journal.pone.0031426

Cirera S., Birck M., Busk P.K., Fredholm M. 2010. Expression profiles of miRNA-122 and its target CAT1 in minipigs (*Sus scrofa*) fed a high-cholesterol diet. *Comparative Medicine*, 60, 2: 136–141

Clop A., Marcq F., Takeda H., Pirottin D., Tordoir X., Bibé B., Bouix J., Caiment F., Elsen J.M., Eychenne F., Larzul C., Laville E., Meish F., Milenkovic D., Tobin J., Charlier C., Georges M. 2006. A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep. *Natural Genetics*, 38, 7: 813–818. doi:10.1038/ng1810

Cutting A.D., Bannister S.C., Doran T.J., Sinclair A.H., Tizard M.V., Smith C.A. 2012. The potential role of microRNAs in regulating gonadal sex differentiation in the chicken embryo. *Chromosome Research*, 20, 1: 201–213. doi:10.1007/s10577-011-9263-y

Fatima A., Morris D.G. 2013. MicroRNAs in domestic livestock. *Physiological Genomics*, 45, 16: 685–696. doi:10.1152/physiolgenomics.00009.2013

Georges M., Coppieters W., Charlier C. 2007. Polymorphic miRNA-mediated gene regulation: contribution to phenotypic variation and disease. *Current Opinion in Genetics and Development*, 17, 3: 166–176. doi:10.1016/j.gde.2007.04.005

Guan Y.J., Yang X., Wei L., Chen Q. 2011. MiR-365: a mechanosensitive microRNA stimulates chondrocyte differentiation through targeting histone deacetylase 4. *The Journal of Federation of American Societies for Experimental Biology*, 25, 12: 4457–4466. doi:10.1096/fj.11-185132

Guduric-Fuchs J., O'Connor A., Cullen A., Harwood L., Medina R.J., O'Neill C.L., Stitt A.W., Curtis T.M., Simpson D.A. 2012. Deep sequencing reveals predominant expression of miR-21 amongst the small non-coding RNAs in retinal microvascular endothelial cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 113, 6: 2098–2111. doi:10.1002/jcb.24084

Holley C., Topkara V. 2011. An introduction to small non-coding RNAs: miRNA and snoRNA. *Cardiovascular Drugs and Therapy*, 25, 2: 151–159. doi:10.1007/s10557-011-6290-z

Hou X., Tang Z., Liu H., Wang N., Ju H., Li K. 2012. Discovery of MicroRNAs associated with myogenesis by deep sequencing of serial developmental skeletal muscles in pigs. *Plos One*, 7, 12: e52123

Hutvagner G., McLachlan J., Pasquinelli A.E., Balint E., Tuschl T., Zamore P.D. 2001. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small

- temporal RNA. *Science*, 293, 5531: 834–838. doi:10.1126/science.1062961
- Izumi H., Kosaka N., Shimizu T., Sekine K., Ochiya T., Takase M. 2012. Bovine milk contains microRNA and messenger RNA that are stable under degradative conditions. *Journal of Dairy Science*, 95, 9: 4831–4841. doi:10.3168/jds.2012-5489
- Jeong W., Kim J.M., Ahn S., Lee S., Bazer F., Han J., Song G. 2012. AHCYL1 is mediated by estrogen-induced ERK1/2 MAPK cell signaling and microRNA regulation to effect functional aspects of the avian oviduct. *Plos One*, 7, 11: e49204
- Jin W., Dodson M.V., Moore S.S., Basarab J.A., Guan L.L. 2010. Characterization of microRNA expression in bovine adipose tissues: a potential regulatory mechanism of subcutaneous adipose tissue development. *BMC Molecular Biology*, 11, 29: 1–8. doi:10.1186/1471-2199-11-29
- Khvorova A., Reynolds A., Jayasena S.D. 2003. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell*, 115, 2: 209–216. doi:10.1016/S0092-8674(03)00801-8
- Kim D., Song J., Jin E.J. 2010. MicroRNA-221 regulates chondrogenic differentiation through promoting proteosomal degradation of slug by targeting Mdm2. *Journal of Biological Chemistry*, 285, 35: 26900–26907. doi:10.1074/jbc.M110.115105
- Kim D., Song J., Kim S., Chun C.H., Jin E.J. 2011a. MicroRNA-34a regulates migration of chondroblast and IL-1beta-induced degeneration of chondrocytes by targeting EphA5. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 415, 4: 551–557. doi:10.1016/j.bbrc.2011.10.087
- Kim D., Song J., Kim S., Kang S.S., Jin E.J. 2011b. MicroRNA-142-3p regulates TGF-beta3-mediated region-dependent chondrogenesis by regulating ADAM9. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 414, 4: 653–659. doi:10.1016/j.bbrc.2011.09.104
- Kim D., Song J., Kim S., Park H.M., Chun C.H., Sonn J., Jin E.J. 2012. MicroRNA-34a modulates cytoskeletal dynamics through regulating RhoA/Rac1 cross-talk in chondroblasts. *Journal of Biological Chemistry*, 287, 15: 12501–12509. doi:10.1074/jbc.M111.264382
- Kim H.K., Lee Y.S., Sivaprasad U., Malhotra A., Dutta A. 2006. Muscle-specific microRNA miR-206 promotes muscle differentiation. *Journal of Cell Biology*, 174, 5: 677–687. doi:10.1083/jcb.200603008
- Kozomara A., Griffiths Jones S. 2014. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Research*, 42: D68–D73. doi:10.1093/nar/gkt1181
- Lawless N., Vegh P., O'Farrelly C., Lynn D.J. 2014. The role of microRNAs in bovine infection and immunity. *Frontiers in Immunology*, 5, 611: 1–7
- Lee J.Y., Jeong W., Lim W., Kim J., Bazer F.W., Han J.Y., Song G. 2012. Chicken pleiotrophin: regulation of tissue specific expression by estrogen in the oviduct and distinct expression pattern in the ovarian carcinomas. *Plos One*, 7, 4: e34215
- Lee S.I., Lee B.R., Hwang Y.S., Lee H.C., Rengaraj D., Song G., Park T.S., Han J.Y. 2011. MicroRNA-mediated posttranscriptional regulation is required for maintaining undifferentiated properties of blastoderm and primordial germ cells in chickens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 26: 10426–10431. doi:10.1073/pnas.1106141108
- Lee Y., Jeon K., Lee J.T., Kim S., Kim V.N. 2002. MicroRNA maturation stepwise processing and subcellular localization. *The European Molecular Biology Organization Journal*, 21, 17: 4663–4670. doi:10.1093/emboj/cdf476
- Lei B., Gao S., Luo L.F., Xia X.Y., Jiang S.W., Deng C.Y., Xiong Y.Z., Li F.E. 2011. A SNP in the miR-27a gene is associated with litter size in pigs. *Molecular Biology Reports*, 38, 6: 3725–3729. doi:10.1007/s11033-010-0487-2
- Li G., Li Y., Li X., Ning X., Li M., Yang G. 2011. MicroRNA identity and abundance in developing swine adipose tissue as determined by Solexa sequencing. *Journal of Cellular Biochemistry*, 112, 5: 1318–1328. doi:10.1002/jcb.23045
- Li H., Zhang Z., Zhou X., Wang Z., Wang G., Han Z. 2011. Effects of microRNA-143 in the differentiation and proliferation of bovine intramuscular preadipocytes. *Molecular Biology Reports*, 38, 7: 4273–4280. doi:10.1007/s11033-010-0550-z
- Li H., Sun G.R., Lv S.J., Wei Y., Han R.L., Tian Y.D., Kang X.T. 2012. Association study of polymorphisms inside the miR1657 seed region with chicken growth and meat traits. *British Poultry Science*, 53, 6: 770–776. doi:10.1080/00071668.2012.750716
- Li H., Sun G.R., Tian Y.D., Han R.L., Li G.X., Kang X.T. 2013. MicroRNAs-1614-3p gene seed region polymorphisms and association analysis with chicken production traits. *Journal of Applied Genetics*, 54, 2: 209–213. doi:10.1007/s13353-013-0142-4
- Li T., Wu R., Zhang Y., Zhu D. 2011. A systematic analysis of the skeletal muscle miRNA transcriptome of chicken varieties with divergent skeletal muscle growth identifies novel miRNAs and differentially expressed miRNAs. *BMC Genomics*, 12, 186: 1–20. doi:10.1186/1471-2164-12-186
- Lian C., Sun B., Niu S., Yang R., Liu B., Lu C., Meng J., Qiu Z., Zhang L., Zhao Z. 2012. A comparative profile of the microRNA transcriptome in immature and mature porcine testes using Solexa deep sequencing. *The Federation of European Biochemical Societies Journal*, 279, 6: 964–975. doi:10.1111/j.1742-4658.2012.08480.x
- Lindsay M.A. 2008. MicroRNAs and the immune response. *Trends in Immunology*, 29, 7: 343–351. doi:10.1016/j.it.2008.04.004
- Lingenfelter B.M., Tripurani S.K., Tejomurtula J., Smith G.W., Yao J. 2011. Molecular cloning and expression of bovine nucleoplasmin 2 (NPM2): a maternal effect gene regulated by miR-181a. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 9, 40: 1–9. doi:10.1186/1477-7827-9-40
- Maak S., Boettcher D., Komolka K., Tetens J., Wimmers K., Reinsch N., Swalve H.H., Thaller G. 2010. Exclusion of sequence polymorphisms in the porcine ITGA5 and MIR148B loci as causal variation for congenital splay leg in piglets. *Animal Genetics*, 41, 4: 447–448
- McDaneld T.G. 2009. MicroRNA mechanism of gene regulation and application to livestock. *Journal of Animal Science*, 87, 14: E21–E28. doi:10.2527/jas.2008-1303
- Miles J.R., McDaneld T.G., Wiedmann R.T., Cushman R.A., Echterkamp S.E., Vallet J.L., Smith T.P. 2012. MicroRNA expression profile in bovine cumulus-oocyte complexes:

- possible role of let-7 and miR-106a in the development of bovine oocytes. *Animal Reproduction Science*, 130, 1–2: 16–26
- Miretti S., Martignani E., Taulli R., Bersani F., Accornero P., Baratta M. 2011. Differential expression of microRNA-206 in skeletal muscle of female Piedmontese and Friesian cattle. *Veterinary Journal*, 190, 3: 412–413. doi:10.1016/j.tvjl.2010.12.012
- Mondou E., Dufort I., Gohin M., Fournier E., Sirard M.A. 2012. Analysis of microRNAs and their precursors in bovine early embryonic development. *Molecular Human Reproduction*, 18, 9: 425–434. doi:10.1093/molehr/gas015
- Muramatsu H., Zou P., Kurosawa N., Ichihara-Tanaka K., Maruyama K., Inoh K., Sakai T., Chen L., Sato M., Muramatsu T. 2006. Female infertility in mice deficient in midkine and pleiotrophin, which form a distinct family of growth factors. *Genes Cells*, 11, 12: 1405–1417. doi:10.1111/j.1365-2443.2006.01028.x
- Naeem A., Zhong K., Moisa S., Drackley J., Moyes K., Loo J. 2012. Bioinformatics analysis of microRNA and putative target genes in bovine mammary tissue infected with *Streptococcus uberis*. *Journal of Dairy Science*, 95, 11: 6397–6408. doi:10.3168/jds.2011-5173
- Naguibneva I., Ameyar-Zazoua M., Polesskaya A., Ait-Si-Ali S., Groisman R., Souidi M., Cuvellier S., Harel-Bellan A. 2006. The microRNA miR-181 targets the homeobox protein Hox-A11 during mammalian myoblast differentiation. *Nature Cell Biology*, 8, 3: 278–284. doi:10.1038/ncb1373
- Rengaraj D., Lee B.R., Lee S.I., Seo H.W., Han J.Y. 2011. Expression patterns and miRNA regulation of DNA methyltransferases in chicken primordial germ cells. *Plos One*, 6, 5: e19524
- Romao J.M., Jin W., He M., McAllister T., Guan le L. 2012. Altered microRNA expression in bovine subcutaneous and visceral adipose tissues from cattle under different diet. *PLoS One*, 7, 7: e40605
- Stowe H.M., Curry E., Calcaterra S.M., Krisher R.L., Paczkowski M., Pratt S.L. 2012. Cloning and expression of porcine Dicer and the impact of developmental stage and culture conditions on microRNA expression in porcine embryos. *Gene*, 501, 2: 198–205. doi:10.1016/j.gene.2012.03.058
- Sweetman D., Rathjen T., Jefferson M., Wheeler G., Smith T. G., Wheeler G.N., Munsterberg A., Dalmay T. 2006. FGF-4 signaling is involved in mir-206 expression in developing somites of chicken embryos. *Developmental Dynamics*, 235, 8: 2185–2191. doi:10.1002/dvdy.20881
- Tang Z., Liang R., Zhao S., Wang R., Huang R., Li K. 2014. CNN3 is regulated by microRNA-1 during muscle development in pigs. *International Journal of Biological Sciences*, 10, 4: 377–385. doi:10.7150/ijbs.8015
- Torley K.J., da Silveira J.C., Smith P., Anthony R.V., Veeramachaneni D.N., Winger Q.A., Bouma G.J. 2011. Expression of miRNAs in ovine fetal gonads: potential role in gonadal differentiation. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 9, 2: 1–11. doi:10.1186/1477-7827-9-2
- Townley-Tilson W.H., Callis T.E., Wang D. 2010. MicroRNAs 1, 133, and 206: critical factors of skeletal and cardiac muscle development, function, and disease. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 42, 8: 1252–1255. doi:10.1016/j.biocel.2009.03.002
- Trakooljul N., Hicks J.A., Liu H.C. 2010. Identification of target genes and pathways associated with chicken microRNA miR-143. *Animal Genetics*, 41, 4: 357–364
- Tripurani S.K., Lee K.B., Wee G., Smith G.W., Yao J. 2011. MicroRNA-196a regulates bovine newborn ovary homeobox gene (NOBOX) expression during early embryogenesis. *BMC Developmental Biology*, 11, 25: 1–9. doi:10.1186/1471-213x-11-25
- Wang X., Gu Z., Jiang H. 2013. MicroRNAs in farm animals. *Animal*, 7, 10: 1567–1575. doi:10.1017/S1751731113001183
- Wang X.G., Yu J.F., Zhang Y., Gong D.Q., Gu Z.L. 2012. Identification and characterization of microRNA from chicken adipose tissue and skeletal muscle. *Poultry Science*, 91, 1: 139–149. doi:10.3382/ps.2011-01656
- Xu S., Linher-Melville K., Yang B.B., Wu D., Li J. 2011. MicroRNA378 (miR-378) regulates ovarian estradiol production by targeting aromatase. *Endocrinology*, 152, 10: 3941–3951. doi:10.1210/en.2011-1147
- Yan X., Huang Y., Zhao J.X., Rogers C.J., Zhu M.J., Ford S.P., Nathanielsz P.W., Du M. 2013. Maternal obesity downregulates microRNA let-7g expression, a possible mechanism for enhanced adipogenesis during ovine fetal skeletal muscle development. *International Journal of Obesity*, 37, 4: 568–575. doi:10.1038/ijo.2012.69
- Zhao S., Zhang J., Hou X., Zan L., Wang N., Tang Z., Li K. 2012. OLFML3 expression is decreased during prenatal muscle development and regulated by microRNA-155 in pigs. *International Journal of Biological Sciences*, 8, 4: 459–469. doi:10.7150/ijbs.3821
- Zorc M., Omejec S., Tercic D., Holcman A., Dovc P., Kunec T. 2015. Catalog of genetic variants within mature microRNA seed regions in chicken. *Poultry Science*, 94, 9: 2037–2040. doi:10.3382/ps/pev170