



mikro RNA w hodowli zwierząt gospodarskich

Paweł Lisowski¹, Joanna Gościk², Lech Zwierzchowski¹

¹Zakład Biologii Molekularnej, Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt, Polska Akademia Nauk, Jastrzębiec

²Katedra Oprogramowania, Wydział Informatyki, Politechnika Białostocka, Białystok

micro RNA application to livestock

Summary

Post-transcriptional gene regulation guided by micro RNAs has emerged as one of the major gene regulatory mechanisms in higher eukaryotes. micro RNAs regulate gene translation through the recognition of complementary sequences between micro RNAs and their target genes. Recent studies in livestock have revealed that many micro RNAs are species- and tissue-specific, indicating that micro RNAs play important roles in essential physiological processes in livestock, such as metabolism, and muscle and organ development. It is anticipated that many micro RNAs will be linked to phenotypic differences or quantitative trait variations of livestock. The role of micro RNA in developmental decisions that affect animal biology is of significant interest, yet the current literature on livestock models is limited. In this review, we summarize the current micro RNA studies undertaken in livestock.

Key words:

micro RNA, livestock, transcriptome, SNP, QTL.

Adres do korespondencji

Paweł Lisowski,
Instytut Genetyki
i Hodowli Zwierząt,
Polska Akademia Nauk,
ul. Postępu 1,
15-552 Jastrzębiec;
e-mail:
p.lisowski@ighz.pl

1. Wprowadzenie

Zwierzęta gospodarskie są hodowane od tysięcy lat pod kątem specyficznych cech fenotypowych. Mięsnosc i mleczność są przykładem ilościowej cechy ekonomicznej, na którą bydło jest selekcyjonowane. Poszukiwanie loci cech ilościowych (QTL, ang. *Quantitative Trait Loci*), odpowiedzialnych za te cechy polega na „skanowaniu” całych genomów zwierząt gospodarskich i identy-

fikacji w nich mutacji funkcjonalnych, czyli takich, które mają wpływ na daną cechę. QTL o dużym efekcie na masę mięśniową zostało zmapowane na chromosomie 2 bydła, w pobliżu genu miostatyny (*Mstn*). Utrata genu *Mstn* prowadzi do fenotypu podwójnego umięśnienia, zatem gen ten stał się oczywistym kandydatem do poszukiwania w nim mutacji funkcjonalnych, również u innych gatunków zwierząt gospodarskich. Przykładowo, w przypadku owcy, nie znaleziono mutacji w części kodującej białko, tylko w 3'UTR, a mutacja ta utworzyła miejsca wiązania dla mikro RNA (miRNA) skutkujące obniżeniem poziomu transkryptu *Mstn* i wzrostem masy mięśniowej.

Globalna analiza ekspresji genów zwierząt gospodarskich na poziomie transkryptów (transkryptomika) lub białek (proteomika) ma ważny aspekt praktyczny, gdyż pomaga wytypować geny decydujące o cechach produkcyjnych – predyspozycji do wydajnej produkcji mięsa lub mleka o pożądanej jakości i składzie. Poszukiwanie genów wykazujących zróżnicowaną ekspresję u zwierząt różnych ras, różniących się genotypem czy potencjałem produkcyjnym, może doprowadzić do uzyskania nowych sposobów wykorzystania markerów genetycznych w hodowli i selekcji zwierząt gospodarskich, np. dzięki wykryciu tzw. ekspresyjnych QTL (eQTLs, ang. *expression Quantitative Trait Loci*), (1,2).

Na poziom transkrypcji genów wpływają przede wszystkim mutacje w ich rejonach regulatorowych – promotorach, enhancerach, silencerach, a także pośrednio mutacje w innych genach, których produkty białkowe, np. czynniki transkrypcyjne, mogą regulować ekspresję wielu różnych genów. Ścisły związek z poziomem transkrypcji genu mają również mechanizmy epigenetyczne, przebiegające bez zmiany sekwencji nukleotydów w DNA. Najlepiej poznanymi, epigenetycznymi mechanizmami regulacji transkrypcji jest genomowy imprinting (wybiórcza ekspresja alleli matczyńskich lub ojcowskich) i metylacja cytozyn w DNA, która prowadzi do blokady transkrypcji oraz modyfikacje histonów (np. fosforylacja, czy acetylacja), które tworzą strukturę nukleosomową chromatyny. Na podstawie najnowszych badań z zakresu genomiki funkcjonalnej, wskazuje się na potranskrypcyjną regulację ekspresji genów przez miRNA, jako na ważny mechanizm regulacji ekspresji genów człowieka i zwierząt. Zjawiska związane z aktywnością miRNA, w tym polimorfizm sekwencji rejonów niepodlegających translacji, które są celem dla miRNA, mogą wpływać na aktywność szlaków fizjologicznych i tym samym na wydajność produkcyjną zwierząt gospodarskich.

2. Wpływ mikro RNA na procesy fizjologiczne istotne z punktu widzenia produkcji zwierzęcej

miRNA są zaangażowane w wiele procesów związanych z rozwojem i fizjologią organizmów (3,4). Szacuje się, że około 40% genów posiada w swoich transkryptach sekwencje, które są celem dla miRNA. Niektóre z miRNA mają podobny poziom ekspresji w wielu tkankach, ale część z miRNA może mieć charakterystyczny poziom ekspresji dla danej tkanki lub nie ulegać wcale ekspresji w danej tkance (5,6). Jednak

dla większości miRNA i u wszystkich badanych do tej pory gatunków ekspresja miRNA okazała się tkankowo-specyficzna i zmieniała się w zależności od etapu rozwoju danej tkanki, co może odgrywać istotną rolę również w biologii zwierząt hodowlanych (7,8). Przykładowo miRNA-122 (miR-122) kontroluje wątrobowy metabolizm lipidów (9,10), miR-1 i miR-123 rozwój tkanki mięśniowej (11-13). Różnicowanie się mięśni podlega epigenetycznym mechanizmom kontroli, m.in. przez interferencje RNA (12). miR-1 oddziałuje na transkrypt genu HDAC4, który głównie ulega ekspresji w mózgu, sercu i mięśniach szkieletowych oraz odpowiada za represję różnicowania się komórek mięśniowych (12,14,15). W ostatnich badaniach nad miR-26a wykazano, że zmniejsza ono ekspresję Ezh2 (ang. *Enhancer of zeste homolog-2*), który metyluje lizynę w histonie H3, co promuje różnicowanie się miocytów (16).

miR-181 i -214 regulują różnicowanie się prekursorowych komórek mięśniowych, mimo że nie są tkankowo-specyficzne. Specyficzne dla tkanki mięśniowej miR-1, miR-133 razem z miR-206 regulują różne etapy miogenezy (12,17-19). miR-133 powoduje proliferację mioblastów C2C12 poprzez inhibicję SRF (ang. *Serum Response Factor*), ale już miR-1 i -206 odpowiadają za różnicowanie się komórek mięśniowych poprzez oddziaływanie na deacetylazę histonowe (12,20).

Obok mięśni, również tkanka tłuszczowa, ważna m.in. dlatego że wpływa na cechy jakości mięsa i spełnia rolę endokrynną, cechuje się występowaniem specyficznych miRNA. Różnicowanie i metabolizm adipocytów u człowieka i *D. melanogaster* znajdują się pod kontrolą miRNA. miR-14 jest supresorem śmierci komórkowej regulującym cykl komórkowy, oraz metabolizm tłuszczu poprzez wpływ na poziom diacyloglicerydów i triglicerydów (21). miR-143 bierze udział w różnicowaniu komórek tłuszczowych, a zahamowanie ekspresji miR-143 skutkuje zahamowaniem różnicowania preadipocytów (22).

Tak szeroki wachlarz działań miRNA i udział w procesach fizjologicznych, coraz częściej skłania badaczy zajmujących się genomiką funkcjonalną zwierząt gospodarskich do prowadzenia badań uwzględniających biologię miRNA. Ponieważ wiele genowych szlaków regulatorowych znajdujących się pod kontrolą miRNA jest konserwatywnych międzygatunkowo, to zwierzęta gospodarskie stanowią również cenny model do badań nad miRNA z zakresu nauk biomedycznych.

3. Metody badań nad mikro RNA zwierząt gospodarskich

3.1. Identyfikacji genów, których ekspresja jest regulowana przez mikro RNA

Istnieje kilka algorytmów pozwalających na przewidywanie genów regulowanych przez mikro RNA. Większość miRNA łączy się z docelowymi transkryptami poprzez 7 nukleotydów w pozycji 2-8, końca 5' miRNA. Na podstawie rzadkich przypadków parowania niekompletnego sugeruje się, że dokładność końca 5' miRNA

jest podstawowa do rozpoznania docelowego transkryptu (23-25). Parowanie z docelowym mRNA skutkuje jego degradacją w przypadku pełnej komplementarności (26), natomiast niepełna komplementarność powoduje hamowanie translacji (27). Algorytmy służące do detekcji celów dla miRNA lub detekcji odpowiednich miRNA dla mRNA bazują na ocenie stopnia i siły komplementarności dupleksów miRNA:mRNA. Dobrze rozbudowane bazy danych i algorytmy do przewidywania genów regulowanych przez miRNA to miRanda (<http://www.microrna.org>), TargetScan (<http://www.targetscan.org>) i PicTar (<http://www.pictar.org>). Geny regulowane przez miRNA często zawierają miejsca wiązania dla kilku różnych miRNA (28). Dlatego też, do poszukiwania miRNA odpowiednich dla danego genu, wykorzystuje się dane o profilach ekspresji miRNA. Zidentyfikowane grupy miRNA ulegające koekspresji wzbogacają algorytmy do predykcji genów, które są celem dla miRNA. Istnieją również dowody, że ekspresja intronowego miRNA jest skorelowana z ekspresją genu w, obrębie którego znajduje się sekwencja dla danego miRNA (29). Wysoka ekspresja miRNA koreluje z niską ekspresją genu, który reguluje i odwrotnie. Bazując na tych obserwacjach opracowano algorytm HOCTAR (ang. *Host-gene Oppositely Correlated Targets*; <http://hoctar.tigem.it/>), który korzystając z danych mikromacierzowych, identyfikuje geny, których ekspresja odwrotnie koreluje z odpowiednimi miRNA (30). Tego typu przewidywanie, przydatne jest tylko do identyfikacji intronowych miRNA, przy czym wiele miRNA jest kodowanych w eksonach.

Kolejną strategią jest stosowanie metody *knock-down* dla danego miRNA, lub transfekcja lini komórkowych odpowiednimi miRNA i następnie ocena profilu ekspresji genów. Jednakże przy tym podejściu nie można bezpośrednio odróżnić genów, które są bezpośrednim celem danego miRNA od genów, które są regulowane pośrednio, na zasadzie interakcji sieci genowych.

3.2. Analizy profili mikro RNA

Technologie umożliwiające wykrywanie i badanie aktywności transkrypcyjnej miRNA takie jak gotowe zestawy *real-time* PCR (TaqMan, SybrGreen) i mikromacierze są komercyjnie dostępne, jednak ograniczają się do gatunków: człowieka (*H. sapiens*), myszy (*M. musculus*) lub szczura (*R. norvegicus*) i możliwości zastosowania ich do gatunków hodowlanych są ograniczone. Profilowanie ekspresji lub identyfikacja bydłecych miRNA sprowadza się zatem do projektowania własnych sond, bądź starterów na podstawie dostępnych sekwencji w bazach danych. Podejście takie jest jednak bardzo utrudnione ze względu na dostępność sekwencji oraz optymalizację warunków reakcji.

Obecnie, wiele badań prowadzonych jest w kierunku charakterystyki profili miRNA tak jak to ma miejsce w przypadku profili transkryptomu mRNA. Pomimo deponowania w bazach danych coraz większej liczby miRNA, listy gatunkowo i tkankowo-specyficznych miRNA są w dalszym ciągu niekompletne. W przypadku kręgow-

ców najlepiej przebadany został człowiek, mysz i szczur, a w mniejszym stopniu inne gatunki. Nowe, bydłące miRNA są identyfikowane poprzez sekwencjonowanie utworzonych bibliotek miRNA i homologię z innymi gatunkami. Użyteczność algorytmów służących identyfikacji miRNA przez homologię z innymi gatunkami jest ograniczona do miRNA konserwatywnych międzygatunkowo. Liczba zdeponowanych miRNA w bazie danych miRBase (Wersja 14, <http://microrna.sanger.ac.uk/>) wynosi dzisiaj dla bydła 615, świni 77¹, kury 615 i owcy 4.

Jedynie dostępne na rynku bydłące mikromacierze miRNA zapewniał Affymetrix. Czipy te pozwalały na zbadanie ekspresji ponad 400. bydłących miRNA jednakże firma wycofała z produkcji tego typu macierze. Zsekwencjonowanie genomu kury (*G. gallus*) pozwoliło na opracowanie mikromacierzy zawierającej 44 000 sond w tym 150 sond dla kurzych miRNA (31). W przypadku świni (*S. scrofa*) stosowano mikromacierze heterologiczne, zawierające sondy 19. różnych gatunków (32). Brak opracowanych mikromacierzy ekspresyjnych profilowanych na miRNA w przypadku świni, wiąże się również z tym, że genom tego gatunku nie został jeszcze zsekwencjonowany.

Z tych powodów, do badań nad miRNA zwierząt gospodarskich niezbędna staje się technologia sekwencjonowania nowej generacji (NGS, ang. *Next Generation Sequencing*), która pozwala na analizę jakościową i ilościową potencjalnie wszystkich małych RNA obecnych w analizowanej tkance. NGS ma tę przewagę nad tradycyjną metodą Sangera, że nie traci się w procesie przygotowywania biblioteki klonów tych miRNA, które ulegają ekspresji na niskim poziomie.

Zastosowanie NGS nie ogranicza się do znanych sekwencji miRNA, a pozwala na wykrywanie nowych, wszystkich aktywnych w danej tkance miRNA, oraz na jednoczesne, globalne profilowanie ich ekspresji. Jest to jedyna metoda pozwalająca na identyfikację wszystkich miRNA w danej tkance. NGS pozwala na przeprowadzenie kilku milionów odczytów sekwencji, co znacznie zwiększa wydajność metody w porównaniu z metodą Sangera, gdzie jednocześnie można przeprowadzić „tylko” 96 odczytów. Dla porównania sekwencjonowanie całego genomu *D. melanogaster* można wykonać metodą NGS w jeden dzień, a nie w jeden miesiąc, tak jak by to miało miejsce w przypadku metody Sangera. W metodzie NGS zastąpiono klonowanie fragmentów DNA w wektorach poprzez bezpośrednie sekwencjonowanie pofragmentowanego i zamplifikowanego DNA lub cDNA (odczyty do 400 pz). Wysoka przepustowość (~7500M pz) oraz wysoka dokładność (do 99,999%), pozwalają na szerokie zastosowanie NGS do sekwencjonowania i analizy ilościowej cDNA w tym profilowania małych RNA. Wynikiem sekwencjonowania cDNA metodą NGS jest wysokiej rozdzielczości mapa transkryptomu z nie scharakteryzowanymi dotychczas miRNA oraz tkankowo-specyficznymi cSNP. Przy zastosowaniu wariantu NGS, tzw. cyfrowej analizy ekspresji (DGE, ang. *Digital Gene Expression*), można ocenić wartości absolutne

¹ Dane nie uwzględniają wyników sekwencjonowania miRNA, metodą NGS, w tkankach świni przeprowadzonego przez Reddy i wsp. (44) opisanego w dalszej części artykułu.

ilości kopii każdego RNA w badanej próbie. Co więcej, DGE jest bardzo obiecującą, alternatywną dla mikromacierzy metodą badania profili transkryptomicznych ponieważ pozwala ominąć poważne niedogodności technologii mikromacierzy związane z techniczną stroną eksperymentów.

4. Aktualny stan badań nad mikro RNA gatunków gospodarczych

4.1. Profile ekspresji mikro RNA

Większość miRNA w przypadku zwierząt gospodarskich jest identyfikowanych z wykorzystaniem metod sekwencjonowania cDNA i poprzez homologię uzyskanych sekwencji z miRNA człowieka, myszy i szczura. Metody bioinformatyczne porównywania sekwencji wszystkich znanych miRNA w bazach danych pozwoliło na identyfikację 249 bydłęcych, homologicznych do innych gatunków miRNA (33). Porównywanie ludzkich sekwencji miRNA z genomem bydłęcym pozwoliło zidentyfikować 334 bydłęcych miRNA, natomiast sekwencjonowanie bibliotek cDNA otrzymanych z bydłęcych tkanek płodowych, grasicy, jelita i węzłów chłonnych dało 129 sekwencji odpowiadających dojrzałym miRNA, z których 107 odpowiadało ludzkim miRNA, 22 przedstawiało charakterystyczną dla miRNA strukturę drugorzędową lub było homologiczne do miRNA innych kręgowców (34). Na podstawie tych wyników pokazano, że większość miRNA jest tkankowo-specyficzna, np. ekspresja: miR-107, miR-151, miR-18a, miR-193a, miR-199a, miR-21, miR-22-5p, miR-380-3p, miR-545 i miR-545-3p jest charakterystyczna dla tkanek układu immunologicznego bydła. Natomiast miRNA takie jak: miR-26a i miR-103, ulegają ekspresji we wszystkich zbadanych tkankach. Autorzy tych badań sugerują, że miRNA odgrywa podstawową rolę w regulacji aktywności mRNA u bydła.

Kolejnych 59 miRNA zidentyfikowano w tkance tłuszczowej i gruczole mlekowym poprzez klonowanie i sekwencjonowanie uzyskanego z tych tkanek bibliotek cDNA, z których pięć, jak się okazało, nie było homologiczne z innymi znanymi miRNA (35). Opisano co najmniej siedem klastrów miRNA w genomie bydłęcym: miR-15b, miR-16; miR-17, miR-19a, miR-19b; let-7a, let-7f; miR-23a, miR-24; miR-23b, miR-27b; miR-497, miR-195; miR-99b, let-7e, miR-125. Podobnie jak w przypadku koekspresji genów leżących blisko siebie na chromosomie, zauważono koekspresję miRNA zależną od stanu fizjologicznego bydła lub badanej tkanki. Analizując profile ekspresji wykazano, że wysoki poziom transkryptów miR-21, miR-23a, miR-24 i miR-143 jest charakterystyczny dla gruczołu mlekowego, co wskazuje na rolę, konkretnych miRNA, w rozwoju i fizjologii tego organu.

Również w ostatnich badaniach wykazano, że bydłęce miRNA są pogrupowane w genomie bydła w klastry, podobnie jak to ma miejsce u innych gatunków. Przykładem jest loci miRNA miR-368, miR-654, miR-376b, miR-376a oraz loci miR-409-5p,

miR-409-3p, miR-412, miR-369-5p, miR-369-3p, miR-410 znajdujące się na krótkim ramieniu chromosomu 21 (36). Klastry miRNA obserwuje się również w genomie *D. melanogaster* (37), *D. reiro* (38), *M. musculus*, *H. sapiens* (39) i niektórych naczelnych (40), co pokazuje, że miRNA jest pogrupowane w klastry w genomach wielu gatunków. Identyfikacja genów docelowych dla miRNA, charakterystyka profili ekspresji oraz identyfikacja tkankowo-specyficznych miRNA może pomóc w zrozumieniu powodu, dla którego miRNA są w genomie pogrupowane w klastry oraz wskazać na te z nich, które mogą odgrywać istotną rolę w fizjologii poszczególnych narządów.

W przypadku technologii mikromacierzy, czipy produkowane komercyjnie są projektowane głównie do badań transkryptomu miRNA człowieka, myszy i szczura. Ponieważ większość miRNA jest wysoce konserwatywna międzygatunkowo to mikromacierze z sondami komplementarnymi dla wymienionych gatunków są stosowane również do profilowania ekspresji miRNA gatunków gospodarskich. Tesfaye i wsp. (41) zbadali ekspresję miRNA pochodzącego z niedojrzałych i dojrzałych bydłych oocytów stosując macierz z 454. sondami dla człowieka, myszy i szczura. Wykazano, że 59 miRNA ulega zróżnicowanej ekspresji pomiędzy niedojrzałymi i dojrzałymi bydłecy oocytami. 31 miRNA ulega większej ekspresji w niedojrzałych natomiast 28 w dojrzałych oocytach. W przypadku świni, stosowano heterologiczne macierze zawierające sondy dla 1260 miRNA 19. różnych gatunków. W ten sposób określono profil ekspresji 293. miRNA w nasieniu knura (32).

Świnia jest nie tylko ważnym ekonomicznie gatunkiem z punktu widzenia produkcji żywności, ale także jest modelowym organizmem w naukach biomedycznych z powodu wielu podobieństw anatomicznych i biochemicznych do człowieka. Modele świńskie służą do badań nad otyłością, nowotworami, reprodukcją czy ksenotransplantacją. Używając narzędzi bioinformatycznych w 2005 r. Wernerson i wsp. zidentyfikowali 55 konserwatywnych miRNA analizując dostępne sekwencje świńskiego genomu (42). W roku 2008 za pomocą technik bioinformatycznych opisano kolejnych 17 miRNA w genomie świni, jednak dane te były niewystarczające zważywszy, że znanych jest setki konserwatywnych miRNA zwierząt (43). Ponieważ sekwencjonowanie genomu świni nie zostało zakończone Reddy i wsp. (44) zastosowali technologie NGS do kompleksowej charakterystyki jakościowej i ilościowej transkryptomu miRNA 14 tkanek. Wytypowano miR-22, miR-26b, miR-126, miR-29c i miR-30c jako obecne we wszystkich badanych tkankach oraz let-7, miR-98, miR-16 i miR-130a jako ulegające ekspresji we wszystkich tkankach oprócz trzustki. Na podstawie tych danych sugeruje się ważną rolę wymienionych miRNA w regulacji konstytutywnych procesów fizjologicznych w różnych narządach. Kilka miRNA takich jak miR-1, miR-133, miR-499, miR-208, miR-122, miR-194, miR-18, miR-142-3p, miR-101 i miR-143, wykazało zróżnicowany profil ekspresji w zależności od badanej tkanki. Wymienione miRNA regulują ekspresję wielu genów, które z kolei kodują czynniki transkrypcyjne, co oznacza, że zidentyfikowane miRNA leżą u podstaw funkcjonalnych sieci genowych regulujących fizjologię/homeostazę danego narządu.

Profile ekspresji miRNA u innych gatunków zwierząt gospodarskich są jak dotychczas mało scharakteryzowane. Jednakże, w ostatnich badaniach zidentyfikowano 159 miRNA w tkance skórnej kozy i owcy, z czego 105 miRNA rozpoznano jako charakterystyczne dla obu gatunków (45). Kilku ze zidentyfikowanych miRNA, wysoce homologicznych międzygatunkowo (let-7, miR-17, miR-30, miR-15, miR-8) przypisano funkcję dotyczącą różnicowania się i funkcjonowania komórek skóry oraz torebek włosowych. Wskazano również na miR-720 i miR-199b jako determinujące rodzaj wełny.

4.2. Polimorfizm mikro RNA i sekwencji docelowych mikro RNA

Jednym z mechanizmów działania miRNA jest blokowanie procesu translacji mRNA. Mięśniowo-specyficzne miRNA uważa się za czynniki wpływające na cechy produkcyjne zwierząt. Tranzycja G na A w 3'UTR owczej miostatyny tworzy miejsce dla miogennych miRNA miR-1 i miR-206 (13). Rozpoznanie allelu A miostatyny przez miR-1 i miR-206 skutkuje spadkiem ekspresji miostatyny i hipertrofią mięśni owiec rasy Belgian Texel. Wyniki te zrodziły pytanie, na jaką skalę tego typu mutacje są rozprzestrzenione w genomach zwierząt hodowlanych. Poprzez analizy porównawcze genomu człowieka i szympansa zidentyfikowano ponad cztery tysiące mutacji typu SNP (ang. *Single Nucleotide Polymorphism*) wpływających na tworzenie lub zniesienie miejsc wiązania dla miRNA, co dowodzi, że regulacja ekspresji genów poprzez mechanizm związany z miRNA jest powszechny w genomach ssaków. Jednocześnie, analizy te uwiarydliły nową klasę mutacji regulatorowych, które leżą u podstaw QTL.

Mutacje DNA mogą potencjalnie wpływać na siłę wiązania i tworzenie dupleksów miRNA:mRNA. Z kolei SNP występujący w miRNA może zmienić jego strukturę drugorzędową, a tym samym wpłynąć na dojrzewanie danego miRNA. W przypadku gdy miRNA reguluje transkrypcję kilku genów, ekspresja polimorficznego miRNA może mieć istotny efekt fenotypowy. Mutacje miRNA mogą tworzyć nowe interakcje z mRNA lub zmieniać stabilność dupleksów miRNA:mRNA. Na podstawie analizy bioinformatycznych przeprowadzonych na 474. ludzkich pre-miRNA wykazano 65 mutacji typu SNP w 49 pre-miRNA (46). Około 250 mutacji typu SNP w 3'UTR genów, które są celem dla miRNA, wykazuje mutacje funkcjonalne, które tworzą nowe interakcje miRNA:mRNA.

W ostatnich badaniach wskazuje się, że zróżnicowanie alleliczne w sekwencjach wiążących miRNA ma wpływ na zróżnicowane fenotypowe zwierząt hodowlanych. Przykładem jest ulegająca imprintingowi domena *Dlk1-Gtl2* zawierająca locus *callipyge* (*Clpg*) owcy, które jest powiązane z hipertrofią mięśni u tego gatunku. Antysensowy transkrypt ulegający ekspresji z allelu matczynego zawiera miejsca wiązania dla miR-431, miR-433, miR-127, miR-434 i miR-136. Wykazano, że ojcowski allel jest preferencyjnie transkrybowany w mięśniach szkieletowych zwierząt heterozy-

gotycznych, natomiast u homozygot transkrypcja jest blokowana przez miRNA pochodzące z allelu matczyngo (47).

W przypadku bydła, polimorfizm w 3'UTR genu synaptojaniny (*Synj1*), wpływa na tworzenie dupleksu z miRNA let-7 i miR-98, co skutkuje cechą bezroźności u bydła (48). Ciekawą obserwacją jest również fakt, że rozkład sekwencji miRNA w genomie bydła jest istotnie różny w grupach osobników o szybkim i wolnym metabolizmie przy nie zróżnicowanym rozkładzie sekwencji promotorowych, co sugeruje, m.in., że miRNA determinuje tę cechę u bydła (49).

W genomie bydła obserwuje się wiele prekursorów tego samego miRNA. To samo zatem, dojrzałe miRNA prawdopodobnie jest transkrybowane z więcej niż jednego genu (36). Przykładem jest bydlęcy let-7a, który może być transkrybowany z genów chromosomów 5, 15 i 16 oraz miR-29b, który ulega ekspresji z chromosomów 4 i 16. Wskazuje to na specyficzne dojrzewanie poszczególnych transkryptów, a tym samym regulację genów docelowych przez nieznanne mechanizmy.

W wyniku porównywania sekwencji bydlęcych miRNA pochodzących z tkanki tłuszczowej i gruczołu mlekowego wykazano, że miRNA często zawierają różne warianty końców 3' i 5'. Zatem to samo miRNA może być różnie modyfikowane w procesie biogenezy i tym samym może odgrywać różną rolę w regulacji ekspresji docelowych genów (50). Podobne zjawisko zaobserwowano w tych samych tkankach człowieka, myszy i szczura (51). Transkrypty miRNA mogą ulegać edycji A-I oraz U-C i zjawisko to może znieść właściwości danego miRNA do rozpoznawania genu docelowego, a nawet kontrolować potranskrypcyjne zachowanie danego miRNA, włączając w to wpływ na lokalizację w komórce (52,53). Oprócz tkankowo-specyficznej ekspresji, dane miRNA o różnych wariantach końców może wykazywać różną funkcję w komórce (36).

5. Podsumowanie

Badania z zakresu genomiki funkcjonalnej pokazują jak ważny i zróżnicowany wpływ mają zjawiska związane z miRNA na aktywność szlaków fizjologicznych zwierząt gospodarskich. Profile ekspresji miRNA, alleliczne zróżnicowanie i zidentyfikowane polimorfizmy typu SNP rejonów 3'UTR genów, które są celami dla miRNA są powiązane z wieloma ważnymi cechami fenotypowymi. Obserwacje te pozwalają sądzić, że w miarę postępu badań, rola miRNA w determinowaniu cech produkcyjnych będzie rosła. Technologia sekwencjonowania nowej generacji jest kolejnym etapem prowadzącym do poznania i zrozumienia mechanizmów, jakimi rządzą się genomy zwierząt gospodarskich, dla których metody badawcze związane z miRNA są bardzo ograniczone. Wyniki badań nad sekwencjonowaniem i ekspresją miRNA prawdopodobnie przyczynią się do racjonalnego, opartego na znajomości molekularnych mechanizmów, wskazania kandydatów na genetyczne markery związane z cechami produkcyjnymi. Geny miRNA wykazujące międzyosobnicze różnice

w strukturze i poziomie ekspresji, obok genów kodujących białka, mogą się okazać markerami cech produkcyjnych. Badania nad miRNA pozwolą również poznać przyczyny różnic w wydajności i jakości produktów, jakie występują pomiędzy rasami i typami produkcyjnymi zwierząt gospodarskich.

Literatura

1. Kadarmideen H. N., von Rohr P., Janss L. L., (2006), *Mamm. Genome*, 17, 548-564.
2. Hocquette J. F., Lehnert S., Barendse W., Cassar-Malek I., Picard B., (2007), *Animal*, 1, 159-173.
3. Ambros V., Lee R. C., Lavanway A., Williams P. T., Jewell D., (2003), *Curr. Biol.*, 13, 807-818.
4. Alvarez-Garcia I., Miska E. A., (2005), *Development*, 132, 4653-4662.
5. Bentwich I., (2005), *FEBS Lett.*, 579, 5904-5910.
6. Bentwich I., Avniel A., Karov Y., Aharonov R., Gilad S., Barad O., Barzilai A., Einat P., Einav U., Meiri E., Sharon E., Spector Y., Bentwich Z., (2005), *Nat. Genet.*, 37, 766-770.
7. Aboobaker A. A., Tomancak P., Patel N., Rubin G. M., Lai E. C., (2005), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, 18017-18022.
8. Wienholds E., Plasterk R. H., (2005), *FEBS Lett.*, 579, 5911-5922.
9. Krutzfeldt J., Rajewsky N., Braich R., Rajeev K. G., Tuschl T., Manoharan M., Stoffel M., (2005), *Nature*, 438, 685-689.
10. Esau C., Davis S., Murray S. F., Yu X. X., Pandey S. K., Pear M., Watts L., Booten S.L., Graham M., McKay R., Subramaniam A., Propp S., Lollo B. A., Freier S., Bennett C. F., Bhanot S., Monia B. P., (2006), *Cell. Metab.*, 3, 87-98.
11. Jones P. A., Baylin S. B., (2002), *Nat. Rev. Genet.*, 3, 415-428.
12. Chen J. F., Mandel E. M., Thomson J. M., Wu Q., Callis T. E., Hammond S. M., Conlon F. L., Wang D. Z., (2006), *Nat. Genet.*, 38, 228-233.
13. Clop A., Marcq F., Takeda H., Pirottin D., Tordoir X., Bibe 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), *Nat. Genet.*, 38, 813-818.
14. Grozinger C. M., Hassig C. A., Schreiber S. L., (1999), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 4868-4873.
15. McKinsey T. A., Zhang C. L., Olson E. N., (2000), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 14400-14405.
16. Wong C. F., Tellam R. L., (2008), *J. Biol. Chem.*, 283, 9836-9843.
17. Anderson C., Catoe H., Werner R., (2006), *Nucleic. Acids. Res.*, 34, 5863-5871.
18. Nakajima G., Hayashi K., Xi Y., Kudo K., Uchida K., Takasaki K., Yamamoto M., Ju J., (2006), *Cancer Genomics Proteomics*, 3, 317-324.
19. McCarthy J. J., Esser K. A., (2007), *J. Appl. Physiol.*, 102, 306-313.
20. Kim V. N., Nam J. W., (2006), *Trends Genet.*, 22, 165-173.
21. Xu P., Vernooij S. Y., Guo M., Hay B. A., (2003), *Curr. Biol.*, 13, 790-795.
22. Esau C., Kang X., Peralta E., Hanson E., Marcusson E. G., Ravichandran L. V., Sun Y., Koo S., Perera R. J., Jain R., Dean N. M., Freier S. M., Bennett C. F., Lollo B., Griffey R., (2004), *J. Biol. Chem.*, 279, 52361-52365.
23. Reinhart B. J., Slack F. J., Basson M., Pasquinelli A. E., Bettinger J. C., Rougvie A. E., Horvitz H. R., Ruvkun G., (2000), *Nature*, 403, 901-906.
24. Brennecke J., Hipfner D. R., Stark A., Russell R. B., Cohen S. M., (2003), *Cell*, 113, 25-36.
25. Liu J., (2008), *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 20, 214-221.
26. Hutvagner G., Zamore P. D., (2002), *Science*, 297, 2056-2060.
27. Chen X., (2004), *Science*, 303, 2022-2025.
28. Ivanovska I., Cleary M. A., (2008), *Cell Cycle*, 20, 3137-3142.
29. Shyu A. B., Wilkinson M. F., van Hoof A., (2008), *Embo J.*, 27, 471-481.
30. Gennarino V. A., Sardiello M., Avelino R., Meola N., Maseli V., Anand S., Cutilo L., Ballabio A. Banfi S., (2009), *Genome Res.*, 19, 481-490.

31. Li X., Chiang H. I., Zhu J., Dowd S. E., Zhou H., (2008), *BMC Genomics*, 60.
32. Curry E., Ellis S. E., Pratt S. L., (2008), *Mol. Reprod. Dev.*, 76, 218-219.
33. Strozzi F., Mazza R., Malinverni R., Williams J. L., (2009), *Anim. Genet.*, 40, 125.
34. Coutinho L. L., Matukumalli L. K., Sonstegard T. S., van Tassel C. P., Gasbarre L. C., Capuco A. V., Smith T. P., (2007), *Physiol. Genomics*, 29, 35-43.
35. Gu Z., Eleswarapu S., Jiang H., (2007), *FEBS Lett.* 581, 981-988.
36. Long J. E., Chen H. X., (2009), *Biochem. Genet.*, 47, 329-433.
37. Lai E. C., Tomancak P., Williams R. W., Rubin G. M., (2003), *Genome Biol.*, 4, R42.
38. Chen P. Y., Manninga H., Slanchev K., Chien M., Russo J. J., Ju J., Sheridan R., John B., Marks D. S., Gaidatzis D., Sander C., Zavolan M., Tuschl T., (2005), *Genes Dev.*, 19, 1288-1293.
39. Bentwich I., (2005), *Faseb J.*, 19, 875-879.
40. Zhang R., Peng Y., Wang W., Su B., (2007), *Genome Res.*, 17, 612-617.
41. Tesfaye D., Ghanem N., Carter F., Fair T., Sirard M. A., Hoelker M., Schellander K. Lonergan P., (2009), *Reprod. Fertil. Dev.*, 21,451-461.
42. Wernersson R., Schierup M. H., Jorgensen F. G., Gorodkin J., Panitz F., Staerfeldt H. H., Christensen O. F., Mailund T., Hornshøj H., Klein A., Wang J., Liu B., Hu S., Dong W., Li W., Wong G. K., Yu J., Wang J., Bendixen C., Fredholm M., Brunak S., Yang H., Bolund L., (2005), *BMC Genomics*, 6, 70.
43. Kim J., Cho I. S., Hong J. S., Choi Y. K., Kim H., Lee Y. S., (2008), *Mamm. Genome*, 19, 570-580.
44. Reddy A. M., Zheng Y., Jagadeeswaran G., Macmil S. L., Graham W. B., Roe B. A., Desilva U., Zhang W., Sunkar R., (2009), *BMC Genomics*, 10, 65.
45. Wenguan Z., Jianghong W., Jinquan L., Yashizawa M., (2007), *OMICS*, 11, 385-396.
46. Saunders M. A., Liang H., Li W. H., (2007), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 3300-3305.
47. Davis E., Caiment F., Tordoir X., Cavaille J., Ferguson-Smith A., Cockett N., Georges M., Charlier C., (2005), *Curr. Biol.*, 15, 743-749.
48. Cargill E. J., Nissing N. J., Grosz M. D., (2008), *BMC Res. Notes*, 1, 128.
49. Barendse W., Reverter A., Bunch R. J., Harrison B. E., Barris W., Thomas M. B., (2007), *Genetics*, 176, 1893-1905.
50. Gu Z., Eleswarapu S., Jiang H., (2007), *FEBS Lett.*, 581, 981-988.
51. Landgraf P., (2007), *Cell*, 129, 1401-1414.
52. Liang H., Landweber L. F., (2007), *RNA*, 13, 463-467.
53. Hwang H. W., Wentzel E. A., Mendell J. T., (2007), *Science*, 315, 97-100.