

УДК 575.2.084

## РОЛЬ микроРНК В ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ, ПРОЛИФЕРАЦИИ КЛЕТОК И ПАТОГЕНЕЗЕ ЗАБОЛЕВАНИЙ ДОМАШНИХ ПТИЦ

© 2019 г. А. Ф. Яковлев\*

*Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения “Федеральный научный центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста”, Московское шоссе 55а, Санкт-Петербург, Пушкин, 196601 Россия*

*\*e-mail: afyakov@mail.ru*

Поступила в редакцию 15.10.2018 г.

После доработки 23.01.2019 г.

Принята к публикации 25.01.2019 г.

К настоящему времени известно несколько некодирующих РНК, которые играют заметную роль в процессах транскрипции, трансляции и структурной конформации РНК. Путем связывания микроРНК с 3'-нетранслированными областями мРНК регулируется экспрессия генов у животных через ингибирование инициации трансляции, элонгации и другие механизмы. Имеются доказательства дифференциальной экспрессии микроРНК, регулирующих транскрипцию с включением нескольких этапов в клеточной дифференцировке, пролиферации, апоптозе и генезисе опухолей. Известно, что некоторые микроРНК нацелены на 100–200 генов. Полиморфизмы генов микроРНК, особенно в компетентных областях генома, могут представлять собой биомаркеры для фенотипических признаков, важных в процессе разведения птиц. Полученные факты подтверждают ключевую роль микроРНК в контроле метаболического переключателя, который происходит между развитием эмбриона и выводом цыплят. Дифференциально экспрессируемые микроРНК и их возможные гены-мишени включены в функции продуцирования яиц. Имеющиеся данные о микроРНК дополняют наше понимание молекулярно-генетического контроля, лежащего в основе абдоминального накопления жировой ткани и миогенеза у кур. Обнаружены сотни дифференциально экспрессируемых микроРНК от особей, различающихся по массе тела. Формируется новое представление о функциях микроРНК во время быстрого развития куриных гонад. Идентифицированы сотни микроРНК, экспрессируемые генами гипоталамуса и участвующие в начальной фазе быстрого роста гонад. Существуют все более очевидные свидетельства того, что микроРНК играют важную роль в регулировании врожденного иммунного ответа и являются важными эффекторами в сложных сетях взаимодействия хозяин-патоген при сальмонеллезе, болезни Марека, канцерогенных и других заболеваний. Бактериальные патогены способны модулировать экспрессию микроРНК хозяина и влиять на регуляцию микроРНК и на исход инфицирования. Несколько микроРНК индуцируются активацией TLR в иммунных клетках и нацеливают 3'-нетранслируемые области мРНК, кодирующих компоненты системы сигнализации TLR. Современные инструменты редактирования генома птиц позволяют предположить искусственное увеличение разнообразия микроРНК и расширение возможности использования микроРНК для направленного действия. Определение структуры РНК, РНК–РНК, РНК–ДНК, функциональных связей их с микроРНК и рибонуклеопротеидными комплексами становятся быстро развивающейся областью и позволяют получать новые знания о процессах развития и разрабатывать новые молекулярно-генетические приемы и технологии.

*Ключевые слова:* птица, микроРНК, дифференцировка, рост, фенотип, иммунный ответ, заболевания

**DOI:** 10.1134/S047514501903008X

### ВВЕДЕНИЕ

Функциональные элементы генома микроРНК были открыты в 1993 году (Lee et al., 1993). К настоящему времени известно несколько некодирующих РНК, которые играют заметную роль в процессах транскрипции, трансляции и структурной конформации РНК (Bernstein et al., 2001). Обнаружены микроРНК в ряде биологических жидкостей,

включая белок и желток яйца (Wade et al., 2016). Предшественники зрелых микроРНК – ргi-микроРНК транскрибируются в транскрипты до нескольких сотен нуклеотидов, которые сокращаются в ядре до 70 нуклеотидов и экспортируются в цитоплазму, где обрабатываются рибонуклеазой Dicer, в среднем, до размера 22 нуклеотидов зрелых микроРНК (Lagos-Quintana et al., 2001).

Через соединение с 3'-нетранслированными областями мРНК микроРНК регулируют экспрессию генов у животных, ингибируя инициацию трансляции, элонгации и функционирования других механизмов (Huntzinger, Izaurralde, 2011). Достаточно отметить, что таким путем контролируется синтез не менее 60% белков клетки (Peters, Meister, 2007). Показано участие микроРНК в формировании плюрипотентности (Leonardo et al., 2012), эпителиально-мезенхимальных переходов, метастазирования (Bracken et al., 2009), дифференцировки семенников (Rakoczy et al., 2013) и других функций (Park et al., 2010). Большинство белок-кодирующих транскриптов являются мишенями для регулирования микроРНК (Lewis et al., 2005) и, в некоторых случаях, может осуществляться регулирование большого числа целевых мРНК (Fabian et al., 2010), так как многие мРНК птиц содержат целевые сайты для нескольких микроРНК (Schnall-Levin et al., 2011). Представляют определенный интерес взаимодействия микроРНК–мРНК и микроРНК–lncRNA (некодирующие транскрипты длиннее 200 пар оснований) и, особенно, влияние отдельных SNP на такие взаимодействия. Так, было обнаружено, что нуклеотидные последовательности сайтов связывания микроРНК и ряд SNP, расположенных в 3'-UTR мРНК кур, могут влиять на взаимодействия микроРНК–мРНК (Li A. et al., 2015). Очевидно, что система регуляции с участием микроРНК является более сложной и многогранной, чем ожидалось. По крайней мере, современные инструменты позволяют предполагать возможное увеличение разнообразия микроРНК путем редактирования (Trontti et al., 2018), что расширяет возможности использования микроРНК для направленного действия. Создается впечатление, что некодирующие РНК, включая микроРНК, представляются ключевой системой клеточной биологии, биологии развития и, возможно – эволюции (Metczak et al., 2013). Была попытка разработки каталога для работы со зрелыми микроРНК птиц (Kaуа et al., 2011). Известно, что многие микроРНК нацелены, приблизительно, на 200 генов, а генетическая изменчивость генов микроРНК связана с фенотипическими вариациями и восприимчивостью к болезням у разных видов животных и модельных организмов. Поэтому полиморфизмы генов микроРНК, особенно в компетентных областях, могут представлять собой биомаркеры для фенотипических признаков, важных для разведения животных (Zorc et al., 2015).

Таким образом, микроРНК являются классом некодирующих РНК, важных для посттранскрипционной регуляции генов-мишеней. Механизм регулирования требует комплементарности между целевой мРНК и областью микроРНК, ответственной за их распознавание. Определение структуры РНК, РНК–РНК, РНК–ДНК и рибо-

нуклеопротеидных комплексов становится быстро развивающейся областью, требующей разработки новых технологий, таких, как новые поколения секвенирования, РНК Footprinting, исследования с использованием CRISPR-опосредованной мутации. Выясняются логика и иерархия РНК- и белок-опосредованной регуляции экспрессии генов, а также особенностей механизмов и информационного содержания РНК-опосредованной коммуникации как между клетками, так и между организмами (Sarkies, Miska, 2013). Действительно, представляется, что различные типы РНК являются эффективной системой клеточной биологии, биологии развития, функции мозга и, возможно, даже самой эволюции. Сложность и взаимосвязанность этих систем должны быть мотивацией для изучения обширной неизвестной области РНК-регуляции.

### ДИФФЕРЕНЦИРОВКА, ПРОЛИФЕРАЦИЯ И ФОРМИРОВАНИЕ ФЕНОТИПА

Существует довольно обширная информация об идентификации микроРНК в различных тканях (<http://www.miriad-database.org>), которая содержит геномную классификацию всех известных микроРНК, а также классификацию и способы оценки всех белок-кодирующих генов (Hinske et al., 2014). Появление нового поколения глубокого секвенирования и других современных методов дает возможность открывать новые микроРНК и их способности. Охарактеризованы микроРНК, связанные с дифференцировкой эмбриона. Обнаружено, что по мере того, как экспрессия семейства *gga-let-7* птиц возрастает в процессе раннего развития, экспрессия их прямых мишеней TGFBR1 (transforming growth factor beta receptor 1) и LIN28B (ген РНК-связывающих белков) подавляет семейство мРНК *let-7* и облегчает клеточную трансформацию (Lee S. et al., 2015). Действительно, микроРНК *gga-let-7a-5p* и *gga-let-7b* непосредственно связываются с транскриптами генов TGFBR1 и LIN28B, которые поддерживают плюрипотентность. Таким образом, *gga-let-7* действуют как посттранскрипционные регуляторы дифференцировки в бластодермальных клетках, подавляя экспрессию TGFBR1 и LIN28B, которая внутренне контролирует дифференцировку бластодермальных клеток в раннем развитии цыплят.

Использование глубокого секвенирования позволило определить способность отдельных микроРНК птиц часто изменяться по длине (Starega-Roslan, Krzyzosiak, 2013). Роль двух эндорибонуклеаз хорошо оценена, и они являются очевидными регуляторными узлами для изменения экспрессии микроРНК. Изменение выбора вырезания при помощи рибонуклеазы Dicer не только изменяет последовательность нуклеоти-

дов микроРНК, но также влияет на выбор направляющей нити, увеличивая тем самым число мишеней, которые могут в конечном итоге подавить один тип пре-микроРНК.

Метаболический переключатель перед выводом цыплят необходим для того, чтобы цыпленок успешно перешел от метаболизма хранимого яичного желтка к использованию корма на основе углеводов. Обнаружено, что экспрессия более 800 мРНК и 30 микроРНК была изменена в эмбриональной печени между 18-м днем эмбрионального развития и 3-го дня после вывода цыплят. Следует отметить, что многие из этих дифференциально экспрессируемых мРНК и микроРНК оказались связанными с метаболическими процессами (Hicks et al., 2017). В ходе межрядного ремоделирования межпальцевой мезодермы цыплят зарегистрирована экспрессия 612 ранее известных и 401 ранее неопознанных микроРНК (García-Riart et al., 2017). Экспрессия двадцати микроРНК в этот период развития была усилена, по меньшей мере, в 1.5 раза, а шестнадцать – была снижена в 0.5 раза и ряд микроРНК имели проапоптотические функции. Все эти данные указывают на роль микроРНК в контроле тканевой регрессии и гибели клеток в характерном морфогенетическом эмбриональном процессе кур, основанном на массовом апоптозе.

Обнаружена дифференциальная экспрессия микроРНК, регулирующая транскрипцию NRG1 (белок Neuregulin 1) кур в ответ на стимуляцию эстрогена и процесса линьки (Jeong W. et al., 2017a). Регулирование экспрессии, включающее, по крайней мере, 3-х микроРНК курицы, вероятно, является необходимым условием для событий, которые связаны с активностью эстрогена. Отмечено, что микроРНК может играть роль в апоптотической прогрессии репродуктивного тракта во время линьки (Kim J. et al., 2017).

При помощи высокопроизводительного секвенирования ДНК гипофиза и гипоталамуса двух групп кур с низкой и высокой яйценоскостью в возрасте 300 дней обнаружено 46 известных и 27 новых микроРНК с дифференциальной экспрессией (Wu et al., 2017). Среди них было найдено семь SNP, которые могут усилить или ослабить производство зрелых микроРНК. Эти дифференциально экспрессируемые микроРНК и их влияние на гены-мишени свидетельствуют о связи функции микроРНК с продуцированием яиц. Полученные данные дополняют понимание механизма влияния SNP на биогенез и функционирование микроРНК.

Экспрессия miR-26a-5p ингибировала экспрессию мРНК TNRC6A (кодирует тринуклеотидный повтор-содержащий ген 6A белок) путем прямого нацеливания на ее 3'-нетранслируемую область в культивированных куриных клетках те-

ка (Kang et al., 2017). Сверхэкспрессия miR-26a-5p способствовала пролиферации куриных фолликулярных клеток тека *in vitro*. Кроме того, сверхэкспрессия miR-26a-5p и нокадаун TNRC6A значительно повышали активность антиапоптотического гена BCL-2.

Путем высокопроизводительного секвенирования был проведен анализ микроРНК тканей яичников у цыплят с разным уровнем репродукции (Wu N., 2017). Обнаружено 17 существенно дифференцированных экспрессируемых микроРНК ( $P < 0.05$ ), в том числе 11 известных и 6 новых. Все 11 известных микроРНК были вовлечены, главным образом, в пути регуляции репродукции, такие как биосинтез стероидных гормонов и дофаминергический синапс. Некоторые микроРНК, включая gga-miR-34b, gga-miR-34c и gga-miR-216b, регулируют процессы пролиферации, клеточного цикла, апоптоза и дифференциально экспрессируются с высокими скоростями в яичниках кур с активным участием gga-miR-200a-3. Определенный интерес представляют характеристика и опосредованная микроРНК посттранскрипционная регуляция синтеза белка желточной оболочки I в яйцевом взрослой курицы в процессе формирования яйца. Оказалось, что gga-miR-1623, 1552-3p и 1651-3p влияют на посттранскрипционную экспрессию протеина наружного слоя белковой мембраны I (VMO-1) через 3'-UTR (Lee S. et al., 2015a).

Обнаружено, что miR-16 ингибирует пролиферацию миобластов и способствует апоптозу миобластов путем прямого нацеливания на гены Bcl2 (подавляют апоптоз во многих клеточных системах) и ген FOXO1 (транскрипционный фактор, регулирующий глюконеогенез) (Jia et al., 2017). Путем связывания miR-140-3p с 3'-UTR может ингибироваться экспрессия Myomaker и слияние миобластов *in vitro* (Luo W. et al., 2015). Эти результаты подтверждают важную роль Myomaker в слиянии миобластов птиц и показывают, что MYOD, MYOG и miR-140-3p могут регулировать экспрессию Myomaker.

Уже в ранних работах (Rao et al., 2006) были отмечены несколько специфических микроРНК, таких как miR-1, 206 и 133, в участии контроля ключевых этапов скелетного миогенеза. Позднее было показано, что MyoD может инициировать миобластную терминальную дифференцировку и апоптоз путем прямого ингибирования экспрессии miR-1/206 мышц (Hirai et al., 2010). При определении профилей экспрессии микроРНК между гипертрофической грудной мышцей и нормальной грудной мышцей у курицы обнаружили, что miR-16 явно подавляется в гипертрофических мышечных тканях. Далее было показано, что miR-16 ингибирует пролиферацию миобласта и способствует апоптозу миобластов, ориентируясь на Bcl2 и FOXO1 (Jia et al., 2016a).

Проведен систематический анализ взаимодействия мРНК–микроРНК и идентифицированы кандидаты, вовлеченных во взаимодействие между микроРНК и мРНК, которые регулируют рост мышечных тканей кур (Li Z. et al., 2018). Эти данные показали, что miR-142-5p нацеливает FOXO3 (фактор транскрипции) и способствует экспрессии генов, связанных с ростом, и регулирует рост скелетных мышц у кур. Установлена локализация промотора miR-206 у кур (Jia et al., 2016b). Вероятно, в этом регионе многие ключевые факторы транскрипции, включая MyoD (Myogenic transcription factors), c-Myb, SEBPA/β, AP-4, RAP1, Brn2, GATA-1/2/3, E47, Sn, USF и CdxA, могут быть связаны и взаимодействовать с промотором miR-206. Сверхэкспрессия MyoD резко увеличивала экспрессию miR-206 как в клетках фибробласта, так и в миообластах.

Известно, что миогенными спутниковыми клетками являются стволовые клетки, ответственные за рост и регенерацию мышц. Имеются два гена, необходимые для функционирования спутниковых клеток, – синдиكان-4 и глипикан-1. Было определено влияние микроРНК на функцию миогенной спутниковой клетки – одна микроРНК, предсказанная для связывания синдекана-4 (miR-128), и две, предсказанные для связывания глипикана-1 (miR-24 и miR-16), которые ингибировались *in vitro* путем трансфекции ингибиторов, нацеленных на каждую микроРНК (Harding, Velleman, 2016). Ингибирование этих микроРНК по-разному влияло на экспрессию мембранных белков: синдекана-4, глипикана-1, миогенных регуляторных факторов myoD и myogenin. В целом, эти данные демонстрируют, что отдельные микроРНК регулируют гены, необходимые для распространения и дифференцировки миогенной спутниковой клетки.

Скорость роста является важным экономическим признаком бройлеров. Для исследования функции микроРНК при выращивании кур были исследованы ткани грудной мышцы с самой высокой и самой низкой массой. С использованием секвенирования идентифицировано в общей сложности 921 микроРНК, в том числе 733 известных зрелых микроРНК и 188 новых микроРНК (Ouyang H. et al., 2015a). Были обнаружены сотни дифференциально экспрессируемых микроРНК от особей, различающихся по массе тела. В проведенных сравнениях найдено 22 сильно дифференцированных по экспрессии микроРНК, в основном, с достоверными различиями. Были построены схемы регуляторных сетей взаимодействий между микроРНК и их мишенями. Так, рецептор гормона роста (GHR) является мишенью для miR-146b-3p. Очевидно, что miR-34c, miR-223, miR-146b-3p, miR-21 и miR-205a являются ключевыми, связанными в сети с генами-мишенями, влияющими на рост.

Полиморфизмы в генах микроРНК могут потенциально изменять различные биологические процессы, влияя на целевой отбор через процессинг (Li H. et al., 2015). Мутация rs14120863 находится в области предшественников miR-1666. Было подтверждено, что miR-1666 может выполнять свою функцию посредством нацеливания на ген СВФВ из семейства транскрипционных факторов специфичных для гемопоэза, остеогенеза и других функций. SNP в предшественнике miR-1666 может значительно затормозить созревание miR-1666. Он способен дополнительно влиять на функцию miR-1666 через целевой ген СВФВ и на рост цыплят. Разнообразные SNP в микроРНК могут приводить к фенотипическим вариациям животных. Оценено возможное влияние SNP в области предшественника гена микроРНК-1757 (pre-miR-1757) на хозяйственные признаки кур (Li H. et al., 2015). Полиморфизм G/C достоверно коррелировал с массой забоя, массой тела и другими хозяйственными показателями. Таким образом, генетические вариации микроРНК, включая первичные микроРНК, премикроРНК и зрелые микроРНК, могут приводить к фенотипическим изменениям у животных.

Задержка роста, которая характеризуется меньшим весом тела, широко встречается у бройлеров. Двадцать две известные микроРНК и 1159 генов были дифференциально экспрессированы у цыплят с низкой скоростью роста (Li Z. et al., 2015a). Анализ репортера с двойной люциферазой показал, что gga-miR-30b/c непосредственно нацелены на ген CARS (цистеинил-tRNA синтетаза) через связывание с его 3'UTR. Регулирование CARS через miR-30b/c происходит главным образом в печени. В мышцах бедра и гипоталамусе miR-30b/c экспрессируются на более высоких уровнях у цыплят с пониженной скоростью роста по сравнению с контрольными особями.

Обнаружено, что let-7b, miR-128 и MAPK (extracellular signal-regulated kinase)-путь могут играть ключевую роль в потере контролируемой GHR-дефицитной мышечной массы, и снижение клеточного деления и роста являются потенциальными процессами во время развития скелетных мышц кур SLD (the sex-linked dwarf – карликовость связанная с полом) (Wen Luo et al., 2016). Эксперименты *in vitro* показали, что повышенная экспрессия miR-203 ингибировала пролиферацию и дифференцировку миобластов (Luo et al., 2014).

Временные профили экспрессии трех микроРНК, связанных с пролиферацией и дифференцировкой клеток (miR-125b, miR-221 и miR-206) в двух линиях кур, выявили дифференциальные установившиеся уровни этих miR-203 при росте скелетных мышц (Andreote et al., 2014).

Нокдаун гена ZFPМ2 (один из членов семейства регуляторов факторов транскрипции) значительно

повышал пролиферацию куриных преадипоцитов ( $P < 0.01$ ), а избыточная экспрессия кластера miR-17-92 заметно ингибировала репортерную активность люциферазы psi-CHECK2-ZFPM2-3'UTR-WT ( $P < 0.01$ ) по сравнению с контролем (Zhang X. et al., 2017). Трансфекция ингибиторов miR-17-5p, miR-19a и miR-20a увеличивала репортерную активность psi-CHECK2-ZFPM2-3'UTR-WT. Напротив, трансфекция ингибиторов miR-17-5p, miR-19a и miR-20a не оказывала явного влияния на репортерную активность psi-CHECK2-ZFPM2-3'UTR-MUT. В дальнейших исследованиях было показано, что экспрессия ELOVL6 в утиных гепатоцитах находилась под влиянием трансфицированного ингибитора miR-144 (He et al., 2017). Таким образом, представленные факты свидетельствуют о важном вкладе микроРНК в процессы роста и дифференцировки скелетных мышц.

Чрезмерная прибавка жировой массы является важной проблемой при производстве бройлеров. Интегрированный анализ показал, что в общей сложности 106 генов были идентифицированы как гены-мишени и 11 из них вовлечены в пути метаболизма липидов (Huang et al., 2015). МикроРНК gga-miR-19b-3p ускоряли пролиферацию преадипоцитов, а также дифференцировку адипоцитов путем снижения ACSL1 (продуцирует изофермент семейства длинноцепочечных жирнокислотных коферментов А-лигазы). Созданные две библиотеки РНК из эмбрионов кур на 15 и 20 дни развития, с учетом повышенной потребности в энергии в эти периоды, позволили идентифицировать потенциальные мишени для двух дифференциально выраженных новых микроРНК (pc-miR-5 и pc-miR-33), ассоциированных с липогенезом и клеточной пролиферацией (Hicks et al., 2010). Использование системы репортерного гена Luciferase в клеточной линии яичников китайского хомячка (СНО) подтверждает, что miR-33 у гусей являются целевыми для генов CROT карнитин-ацилтрансфераза, которая катализирует обратимый перенос жирных ацильных групп между CoA и карнитином (Zheng et al., 2015).

Были существенно дифференцированы 33 микроРНК между двумя линиями кур, различающихся по содержанию жира в брюшной полости (Wang W. et al., 2015). Исследования *in vitro* показали, что фибробластоподобные преадипоциты могут дифференцироваться в зрелые адипоциты с регулируемой экспрессией микроРНК-143 (Li et al., 2011). Трансфекция фибробластоподобных преадипоцитов антисмысловым ингибитором микроРНК-143 вызывала значительное подавление дифференцировки. Экспрессия генов РКМ2 (изофермент гликолитического фермента пируваткиназы) и FABP5 (ген кодирует белок, связывающий жирные кислоты) в куриной печени регулируется miR-122 (Wang X. et al., 2015). Проведено глубокое

секвенирование микроРНК, экспрессированных в преадипоцитах жировой ткани после 72 часов дифференцировки (Wang S et al., 2018). Прогнозирование мишеней дифференциально экспрессируемых микроРНК показало, что микроРНК участвовали в регуляции множественных путей передачи сигналов, связанных с адипогенезом, включая сигнальный путь рецептора пролифератора пероксисом, путь передачи сигналов инсулина, а также биосинтез жирных кислот и деградацию жирных кислот. Биоинформационный анализ показал, что ген ELOVL жирной кислоты элонгазы 5 (ELOVL5) представляется в качестве предполагаемой мишени miR-218-5p, miR-19a-3p, miR-19b-3p, miR-30a-5p, miR-30b-5p и miR-30e-5p (Zhang M. et al., 2017).

Обширные исследования показали, что экспрессия AroB регулируется на нескольких уровнях (Ma et al., 2017). Идентифицированы микроРНК, которые взаимодействуют с AroB у кур. Результаты показывают, что AroB является мишенью miR-101-2-5p, который подавляет экспрессию AroB путем связывания с 3'UTR AroB.

Большой интерес представляет связь микроРНК с потреблением корма. Были идентифицированы два SNP в геномной области локуса miR-1596, связанные с потреблением корма курицы (Luo C. et al., 2015). Экспрессия gga-miR-15a была значительно выше у птиц с высоким (коэффициентом конверсии корма (Yuan J. et al., 2017)). Результаты могут быть использованы для улучшения понимания молекулярных детерминант эффективности корма.

Таким образом, изложенные факты свидетельствуют о существенной роли микроРНК в регуляции генов и клеточных процессов, которые являются основой формирования фенотипа птиц.

## ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ГОНАД

Начало быстрого роста гонад — это важный процесс в сексуальном развитии, который включает в себя множество генов и регуляторных факторов. 374 консервативных и 46 новых микроРНК были идентифицированы как экспрессируемые генами гипоталамуса у кур (Han W et al., 2015). Показано, что 144 консервативные микроРНК были дифференциально экспрессированы при переходе от двух разных пубертатных стадий до начала развития быстрой гонады и после начала полового созревания. Дальнейший количественный тест ПЦР в реальном времени показал, что из 9 членов miR-217 и miR-375 являются регуляторами зрелости куриного яичника (Kang et al., 2013). В результате анализа профилей экспрессии микроРНК в сыворотке и плазме кур от двух разных пубертатных стадий до начала и после начала полового созревания было обнаружено соответ-

ственно 197 известных и 19 новых микроРНК (Han W et al., 2016). Использование ПЦР в реальном времени позволило показать, что панель с семью микроРНК, включая miR-29c, miR-375, miR-215, miR-217, miR-19b, miR-133a и let-7a, имели большие возможности для использования в качестве новых биомаркеров измерения начала половой зрелости у кур (Bannister et al., 2009).

Исследования, посвященные генетическому обоснованию полового диморфизма с точки зрения кодирующих белков генов, выявили тысячи генов, предрасположенных к полу у млекопитающих и птиц (Harrison et al., 2015). Можно допустить, что в некоторых случаях, экспрессия микроРНК, предрасположенная к полу, может возникать в результате дифференцированной дозы гена (Naqvi et al., 2018). Влияние половых гормональных факторов, связанных с обработкой первичных транскриптов микроРНК в зрелые микроРНК (Warnefors et al., 2017), позволяют предполагать этот механизм в качестве дополнительного посттранскрипционного регулирования полового диморфизма. Определение экспрессии четырех микроРНК (miR-218, -200b, -196 и -206) в куриных эмбриональных гонадах в период эмбрионального развития 3.5–6.5 дней позволило с помощью алгоритмов установить особенности экспрессии и предсказать их целевые гены (Feng et al., 2014). Экспрессия miR-200b была на значительно более высоком уровне в женских гонадах в течение всего интервала. Весь результат гибридизации *in situ* показал значительно более высокую экспрессию в эмбрионах miR-200b у самок, чем у самцов. После проверки ряда кандидатов микроРНК и соответствующих экспрессий генов в трех типах клеток было обнаружено 15 микроРНК и 21 генов-мишеней, которые могут участвовать в сперматогенезе (Xu L. et al., 2017). Было подтверждено, что miR-202-5p связывается с LIMK2, который участвует в развитии зародышевых клеток. В совокупности с открытием новых микроРНК, таких как miR-202-5p, и связанных с ними генов дают новые подсказки для расшифровки молекулярного механизма микроРНК, регулирующих дифференцировку стволовых клеток зародышевой линии и сперматогенеза у кур.

Проведено профилирование экспрессии микроРНК для выявления специфических микроРНК-сигналов в недифференцированной бластодерме и первичных зародышевых клетках (PGCs) (Lee S.I. et al., 2011). Идентифицировали семь микроРНК, которые высоко экспрессировали в бластодерме и 10 микроРНК – в PGC (peroxisome gamma coactivator), влияющих на дифференцировку бластодермы.

Следовательно, рост гонад, сексуальное развитие с включением множества генов в большой степени находятся под контролем процессов, в которых важное участие принимают микроРНК.

## РОЛЬ микроРНК В ПАТОГЕНЕЗЕ ЗАБОЛЕВАНИЙ

### Роль микроРНК при бактериальной инфекции.

Существуют все более очевидные свидетельства того, что микроРНК играют важную роль в регулировании врожденного иммунного ответа, вызванного бактериями (Krol et al., 2010). Бактериальные патогены способны модулировать экспрессию микроРНК хозяина и направлять регуляцию микроРНК на исход инфицирования. Сигнальная способность Toll-подобных рецепторов (TLR) достаточно жестко отрегулирована (O'Neill et al., 2011) и микроРНК, вероятно, появились в эволюции как важные контроллеры сигнализации TLR. Несколько микроРНК индуцируются активацией TLR во врожденных иммунных клетках и нацеливают 3'-нетранслируемые области мРНК, кодирующих компоненты системы сигнализации TLR. Так что, микроРНК являются важной связью между врожденной и адаптивной иммунной системой, и их дисрегуляция играет важную роль в патогенезе воспалительных процессов и иммунного ответа.

Для выявления роли микроРНК в регуляции генов, участвующих в реакции хозяина на инфекцию *Salmonella enteritidis* были идентифицированы потенциально связанные с инфекцией микроРНК – gga-miR-101-3p и gga-miR-155 (Li P. et al., 2017). Они непосредственно подавляли активность репортерного гена люциферазы посредством связывания с 3'-нетранслированными областями иммунных генов IRF4 и LRRC59. Чрезмерно выраженная gga-miR-155 и интерференция gga-miR-101-3p в клетках макрофагов цыплят достоверно изменяли экспрессию их целевых генов и уменьшали продукцию противовоспалительных цитокинов. Были идентифицированы несколько микроРНК (gga-miR-125b-5p, gga-miR-34a-5p, gga-miR-1416-5p и gga-miR-166), ассоциированные с сальмонеллезной инфекцией (Wu et al., 2017). Из 598 обнаруженных микроРНК 37 показали специфическую дифференцированность между инфицированными и неинфицированными цыплятами. Всего было предсказано 2897 уникальных генов-мишеней, регулируемых дифференциально выраженными микроРНК, из которых 841 ген были однозначно в разной степени регулируемые микроРНК. Зарегистрировано 12 иммунных процессов, связанных с такими мишенями (Jia et al., 2017). Дифференциально экспрессируемые микроРНК-мРНК-пары при сальмонеллезной инфекции проявили значительно отрицательные корреляции. Выявлен вклад микроРНК в реакцию на инфекцию при сальмонеллезе в период наступления яйцекладки путем регулирования гомеостаза между метаболизмом и иммунитетом. Например, gga-miR-125b-5p, gga-miR-34a-5p, gga-miR-1416-5p и gga-miR-1662 могут играть

важную роль в инфицировании сальмонеллами путем регулирования их целевых генов (Wu et al., 2017). Обнаруженные факты служат основой для изучения регуляции микроРНК в сальмонеллезной инфекции у кур-несушек.

*Mycoplasma gallisepticum* (MG), один из основных этиологических агентов хронического респираторного заболевания домашней птицы, вызвал значительные экономические потери во всем мире, и в последнее время все больше добыто доказательств того, что микроРНК вовлечены в его микробный патогенез (Zhao et al., 2017a). Через секвенирование микроРНК было обнаружено, что gga-miR-99a значительно снижается в легких эмбрионов кур, зараженных MG. Далее показано, что экспрессия gga-miR-99a значительно снижалась в отношении, как MG-инфицированных легких, так и линии клеток эмбриональной фибробласты курицы. Повышенная экспрессия gga-miR-99a значительно уменьшала экспрессию гена SMARCA5 (помимо других свойств участвует в регуляции транскрипции), тогда как ингибитор gga-miR-99a усиливал экспрессию SMARCA5. Очевидно, gga-miR-99a играет ключевую роль в инфекции MG через регуляцию экспрессии SMARCA5 и дает новое представление о механизмах патогенеза MG.

Были идентифицированы микроРНК, которые связаны с инфекцией MG, вызывающей респираторные заболевания кур, в частности, в легочной ткани после 3 и 10 дней инфицирования (Zhao et al., 2017b). 45 и 68 микроРНК дифференциально экспрессировали с целевыми эффектами с 6280 и 7181 генами соответственно через 3 и 10 дней после инфицирования. Многосторонний анализ показал, что эти микроРНК могут участвовать в регуляции ответа хозяина на инфекцию по многим путям, как эндоцитоз, адгезия, регуляция актинового цитоскелета и другие. Эти результаты пролили свет на новые представления о механизмах микроРНК в регуляции взаимодействий хозяина и патогенного агента.

Патогенная *Escherichia coli* вызывает одно из самых распространенных бактериальных заболеваний домашней птицы. С помощью секвенирования РНК изучили измененные микроРНК и deregулированные гены в селезенке трех групп бройлеров разной тяжести патологии (Jia et al., 2016c). Основываясь на комбинированном анализе дифференциально экспрессируемых микроРНК и мРНК в каждой из трех групп, 43 микроРНК-мРНК-пары проявили значительно отрицательные корреляции ( $r = -0.8$ ). *In vitro* gga-miR-429 непосредственно подавляет активность репортерного гена люциферазы посредством связывания с 3'-нетранслированными областями TMEFF2, NTRK2 и SHISA2. Сверхэкспрессия gga-miR-429 в линии клеток куриных макрофагов HD11 значительно

ингибировала экспрессию TMEFF2 и SHISA2, которые участвуют в индуцированных липополисахаридом тромбоцитарных факторах роста (PDGF) и сигнальных путей Wnt. Полученные результаты проливают свет на роль этих недавно выявленных генетических элементов в механизмах устойчивости хозяина и восприимчивости к *Escherichia coli*.

Таким образом, изложенные факты свидетельствуют о существенном значении микроРНК в иммунном ответе и патогенезе бактериальных заболеваний и послужат надежной основой для изучения этой важной сферы.

**Роль микроРНК при вирусной инфекции.** Несмотря на то, что по симптомам вирусные и бактериальные инфекции часто схожи, имеются существенные различия в реакции иммунитета на вирусную и бактериальную инфекции. При сравнении больных вирусным бронхитом и здоровых цыплят было идентифицировано в общей сложности 58 дифференциально экспрессированных микроРНК, которые, как оказалось, были связаны с метаболическими процессами, каталитическими действиями, экспрессией генов и иммунными ответами (Yang X. et al., 2017).

Как известно, путь сигнализации JAK-STAT (janus kinase/signal transducers and activators of transcription pathway) является важным регулятором клеточной пролиферации, дифференцировки, выживаемости, подвижности, апоптоза, иммунного ответа и развития. Обнаружено 63 зрелые микроРНК, которые изменяют направление функционирования генов этим путем (Truong et al., 2017a). Идентифицированные 116 генов были аннотированы через генную онтологию и сопоставлены с сигнальным путем JAK-STAT. Более того, было обнаружено 68 известных микроРНК, которые по-разному нацелены на генные пути JAK-STAT и дифференциально выражены в двух линиях, индуцированных некротическим энтеритом (Truong et al., 2017b).

Анализ мРНК с микроРНК, lncRNA и вирусными генами позволил идентифицировать ключевые элементы в сложных сетях, используемых во время ответа на ALV (Lan et al., 2017). Подгруппа вирусов птичьего лейкоза J (ALV-J) может вызывать несколько различных лейкоэмических пролиферативных заболеваний в гемопоетической системе цыплят. Репортерный анализ с двойной люциферазой показал (Zhenhui et al., 2015), что IRF1 (регуляторный фактор Интерферон 1) является прямой мишенью miR-23b. Сверхреакция miR-23b ( $P = 0.0022$ ) уменьшала уровни мРНК IRF1 и подавляла репортерную активность IRF1-3'-UTR. Эксперименты *in vitro* показали, что сверхэкспрессия miR-23b усиливает репликацию ALV-J, тогда как потеря функции miR-23b ингибирует репликацию ALV-J. Сверхэкспрессия IRF1 инги-

бировали репликацию ALV-J, а IRF1-нокдаун улучшал репликацию ALV-J. Более того, сверхэкспрессия IRF1 значительно ( $P = 0.0014$ ) увеличивала экспрессию IFN- $\beta$ . Эти результаты показали, что miR-23b может играть важную роль в репликации ALV-J, ориентируясь на IRF1.

Заболевания, вызванные этой подгруппой вирусов птичьего лейкоза J (ALV-J), стали серьезной проблемой для домашней птицы. Из-за отсутствия эффективных вакцин была разработана и использована интерференция микроРНК–siRNA для ингибирования репликации ALV-J *in vitro* и *in vivo* (Wei et al., 2015). Каждая последовательность микроРНК-мишени, полученная из генов gag (p15), pol (p32), env (gp85) и LTR (U3) ALV-J, была встроена в основную цепь miR-155. После отжига их клонировали в вектор pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR соответственно. Для обнаружения интерференционного эффекта рекомбинантные векторы вводили в клетки DF-1 и суточных цыплят, инфицированных ALV-J. Результаты показали, что интерференция микроРНК–siRNA является эффективным методом ингибирования репликации ALV-J. Обнаружена новая опухоль-супрессорная микроРНК – gga-miR-375, которая значительно ингибировала пролиферацию линий дермальных фибробластов посредством нацеливания на онкоген YAP1 (Li H. et al., 2014). Например, gga-miR-375 может функционировать в качестве опухолевого супрессора, играя ключевую роль в опухолегенезе птичьего лейкоза.

Обнаружена потенциальная связь между экспрессией микроРНК и патогенезом инфекции ретикулоэндотелиозного вируса (REV). REV вызывает иммуносупрессию, замедление роста и онкогенез у разных видов птиц. В образцах, собранных на 21 и 28 день после REV-инфекции, было идентифицировано 88 дифференциально экспрессированных микроРНК (Yu et al., 2017).

В исследовании (Li Z. et al., 2017) портерный анализ с двумя люциферазами показал, что MDA5 (Melanoma Differentiation-Associated protein 5 – рецептор опознавания паттерна антивирусного ответа в системе врожденного иммунитета) является прямой мишенью miR-34b-5p. Эти результаты показывают, что miR-34b-5p нацеливает MDA5 на ускорение пролиферации и миграции ALV-J-инфицированных клеток и способствует репликации ALV-J через сигнальный путь MDA5. Задержка роста цыплят, вызванная ALV-J, связана с подавляющим контролем сигналом Wnt/ $\beta$ -catenin (Feng et al., 2017). МикроРНК транскрипционно подавляют мишени и участвуют в развитии различных опухолей птичьего лейкоза. Показано, что miR-221 активируется в опухолях, индуцированных ALV-J (Ren et al., 2018). Целевая система проверки показала, что CDKN1B (cyclin-dependent kinase inhibitor 1B – ингибитор циклин-

зависимой киназы 1B) является мишенью miR-221 и подавляется в ALV-J-инфекции. В последнее время было обнаружено большое количество микроРНК в вирусном геноме галлидского герпесвируса 2 (GaHV-2), который известен как вирус болезни Марека типа 1 (Zhao P. et al., 2015). Вирус болезни Марека (MDV) способен индуцировать быстроразвивающуюся Т-клеточную лимфому в своем естественном хозяине и рассматриваемую как идеальную модель для исследования индуцированного вирусом опухолевого генеза. Было выявлено, что mdv1-miR-M4-5p, вирусный аналог клеточного miR-155, имеет решающее значение для онкогенности MDV (Jia-Qi et al., 2015). Однако, получены данные, которые подтверждают, что кроме mdv1-miR-M4, другие МГК-кластерные микроРНК также играют критическую роль в онкогенезе MDV (Teng et al., 2015). Обнаруженные микроРНК в геноме вируса болезни Марека (MDV) имеют регуляторные роли в онкогенезе. Анализ результатов исследований показал значительную дифференциальную экспрессию 79 микроРНК RNA, что свидетельствует о их возможной важной роли в индуцированном MDV опухолегенезе (Li Z. et al., 2014).

Было показано, что несколько вирусов птиц (Yao, Nair, 2014), главным образом герпесвирусов, кодируют ряд новых микроРНК. К ним относятся сильно онкогенный вирус вируса Марека-1 (26 микроРНК), вирус авирулентного вируса Марека-2 (36 микроРНК), герпесвирус индюков (28 микроРНК), вирус инфекционного ларинготрахеита (10 микроРНК), вирус утиного энтерита (33 микроРНК) и вирус птичьего лейкоза (2 микроРНК). Несмотря на более тесную антигенную и филогенетическую связь между некоторыми из герпесвирусов, микроРНК, кодируемые различными вирусами, не показали сохранения последовательности, хотя местоположения некоторых из микроРНК были сохранены в повторяющихся областях геномов. Однако некоторые из микроРНК, кодируемых вирусом, показали значительную гомологию последовательностей с микроРНК хозяина, демонстрируя их способность служить в качестве функциональных ортологов. Например, mdv1-miR-M4-5p, функциональный ортолог gga-miR-155, имеет решающее значение для онкогенности MDV. MDV вызывает лимфо-пролиферативное расстройство у кур, кодирует ряд микроРНК, полученных в основном из двух мест в геноме MDV. Один кластер генов микроРНК фланкирует онкоген meq, а второй кластер обнаружен в латентно-зависимой области транскрипта. Были сопоставлены последовательности микроРНК MDV из набора полевых и эталонных штаммов с различными уровнями вирулентности и они оказались высоко консервативными (Morgan et al., 2008). Однако микроРНК из meq-кластера были обнаружены на более высоких уров-

нях в лимфомах, вызванных формой вируса, соответствующих высоким вирулентным плюсам (например, vv +, штамм 615K), чем менее вирулентными микроорганизмами. Уровни *mdv1-miR-M4*, которых разделяют по последовательности нуклеотидов с *miR-155*, микроРНК, участвующей в В-клеточной лимфоме, были в три раза выше, а уровни *mdv1-miR-M2 3p* были более чем в шесть раз выше в vv + MDV-индуцированных опухолей, чем у vv MDV-индуцированных опухолей. Напротив, уровни микроРНК из кластера латентно-зависимой области транскрипта были эквивалентны в опухолях, продуцируемых штаммами vv и vv +. Кроме того, *mdv1-miR-M4* представляет собой микроРНК MDV, наиболее выраженную в опухолях, где на нее приходится 72% всех микроРНК MDV. Эти данные свидетельствуют о том, что микроРНК *meq*-кластера играют важную роль в патогенности MDV.

Представляет интерес исследование *gga-miR-9*, экспрессия которой заметно повышалась у цыплят при заражении вирусом бурсальной болезни (IBDV). Однако, биологическая функция *gga-miR-9* при вирусной инфекции оставалась неизвестной. Было установлено, что экопатогенная экспрессия *gga-miR-9* значительно способствовала репликации IBDV (Ouyang W. et al., 2015b) и отрицательно влияла на IBDV-иницированное производство интерферона типа I. Оказалось, что 3'-нетранслируемый участок (UTR) регуляторного фактора 2 интерферона (IRF2) имеет два предполагаемых сайта связывания для *gga-miR-9*. Функциональная сверхэкспрессия *gga-miR-9* с использованием имитаций *gga-miR-9* ингибировала экспрессию мРНК IRF2 и белка. Трансфекция ингибитора *gga-miR-9* отменила подавление экспрессии белка IRF2. Кроме того, нокдаун IRF2 опосредовал усиливающий эффект *gga-miR-9* на опосредованную интерфероном (IFN) антивирусную реакцию. Эти данные показывают, что индуцибельная обратная связь *gga-miR-9* отрицательно регулирует антивирусный врожденный иммунный ответ хозяина, подавляя продукцию IFN типа I посредством нацеливания IRF2.

Были выявлены микроРНК, связанные с инфекциями вируса птичьего гриппа (Wang et al., 2009). Семьдесят три уже известных и тридцать шесть новых микроРНК были дифференциально экспрессированы между инфицированными и неинфицированными цыплятами в легких и трахеях соответственно. Было больше микроРНК, экспрессируемых в неинфицированных тканях, чем в инфицированных тканях. Проанализирован набор дифференциально экспрессированной микроРНК цыплят, инфицированного H5N1 (подтип вируса птичьего гриппа А) для идентификации мишеней в гене NS1. 300 дифференциально экспрессируемых микроРНК анализировали индивидуально для целевых сайтов ряда генов.

Анализ дал ответ, что *gga-miR-1658* в качестве потенциальной микроРНК, нацелена на ген NS1 вируса гриппа H5N1 (Asaf et al., 2015).

Известно, что куры восприимчивы к высокопатогенному штамму вируса птичьего гриппа H5N1 (HPAIV), тогда как утки — устойчивы к этому штамму. Было использовано высокопроизводительное секвенирование для анализа экспрессии микроРНК в селезенке, тимусе и бурсе Fabricius инфицированных и неинфицированных H5N1-HPAIV кур и уток (Li Z. et al., 2015). Наблюдалось большее расхождение между образцами экспрессии микроРНК. Оказалось, что образцы экспрессии микроРНК в гомологичных иммунных органах кур и уток с данным штаммом существенно различаются в иммунных органах, инфицированных HPAIV цыплят и уток. Была идентифицирована экспрессия *miR-143* курицы с использованием метода глубокого секвенирования (Trakoooljul et al., 2010). Анализ результатов исследований с использованием микрочипов показал, что 124 гена были дифференциально экспрессированы анти-*miR-143 in vitro* в эмбриональных спленоцитах цыпленка ( $P < 0.01$ ). Многие из этих генов связаны с пролиферацией клеток, апоптозом и образованием опухоли. Шесть из 124 генов обладают, по меньшей мере, одним потенциальным сайтом связывания *miR-143* в своих 3'UTR. В целом, настоящее исследование предполагает, что *miR-143* повсеместно экспрессируется среди тканей и, вероятно, участвует в регуляции клеточной пролиферации и апоптоза.

Показаны изменения в уровнях экспрессии микроРНК на разных стадиях развития маточной трубы и яичниковом канцерогенезе кур-несушек (Jeong et al., 2017b). Обнаружено участие микроРНК в установлении и поддержании клеточной судьбы иммунных клеток, участвующих во врожденном иммунитете, регулируя сигнализацию TLR и последующий ответ цитокинов (Sonkoly et al., 2008).

Таким образом, за последние два десятилетия произошел взрыв в нашем понимании, ранее скрытым и непредвиденным миром регулирования экспрессии генома при участии некодирующих РНК и, в том числе — микроРНК. Эти процессы являются важными регуляторами клеточной пролиферации, дифференцировки, выживаемости, подвижности, апоптоза, иммунного ответа и развития, играя ключевую роль в опухолегенезе.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Asaf V.N., Kumar A., Raut A.A. et al. In-silico search of virus-specific host microRNAs regulating avian influenza virus NS1 expression // *Theory Biosci.* 2015. V. 134. P. 65–73.
- Bannister S.C., Tizard M.L., Doran T.J. et al. Sexually dimorphic microRNA expression during chicken embry-

- onic gonadal development // *Biol. Reprod.* 2009. V. 81. P. 165–176.
- Bernstein E., Caudy A.A., Hammond S.M. et al. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference // *Nature*. 2001. V. 409. P. 363–366.
- Bracken C.P., Gregory P.A., Khew-Goodall Y. et al. The role of microRNAs in metastasis and epithelial–mesenchymal transition // *Cell. Mol. Life Sci.* 2009. V. 66. P. 1682–1699.
- Fabian M.R., Sonenberg N., Filipowicz W. Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs // *Annu. Rev. Biochem.* 2010. V. 79. P. 351–379.
- Feng Y.P., Chen J.F., Huang P. et al. Expressive analysis of differentially expressed miRNAs in chicken embryos of males and females // *Genet. Mol. Res.* 2014. V. 13. P. 3060–3068.
- Feng W., Zhou D., Meng W. Growth retardation induced by avian leukosis virus subgroup J associated with down-regulated Wnt/ $\beta$ -catenin pathway // *Microb. Pathog.* 2017. V. 104. P. 48–55.
- Garcia-Riart B., Lorda-Diez C.I., Marin-Llera J.C. et al. Interdigital tissue remodelling in the embryonic limb involves dynamic regulation of the miRNA profiles // *J. Anat.* 2017. V. 231. P. 275–286.
- Han W., Zou J., Wang K. High-throughput sequencing reveals hypothalamic microRNAs as novel partners involved in timing the rapid development of chicken (*Gallus gallus*) gonads // *PLoS One*. 2015. V. 10. doi 10.1371/journal.pone.0129738
- Han W., Zhu Y., Su Y. et al. High-throughput sequencing reveals circulating miRNAs as potential biomarkers for measuring puberty onset in chicken (*Gallus gallus*) // *PLoS One*. 2016. V. 11. doi 10.1371/journal.pone.0154958
- Harding R.L., Velleman S.G. MicroRNA regulation of myogenic satellite cell proliferation and differentiation // *Mol. Cell. Biochem.* 2016. V. 412. P. 181–195.
- Harrison P.W., Wright A.E., Zimmer F. et al. Sexual selection drives evolution and rapid turnover of male gene expression // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2015. V. 112. P. 4393–4398.
- He J., Tian Y., Zhao Y. et al. MiR-144 affects fatty acid composition by regulating ELOVL6 expression in duck hepatocytes // *Cell. Biol. Int.* 2017. V. 41. P. 691–696.
- Hicks J.A., Trakooljul N., Liu H.C. Discovery of chicken microRNAs associated with lipogenesis and cell proliferation // *Physiol. Genomics*. 2010. V. 41. P. 185–193.
- Hicks J.A., Porter T.E., Liu H.C. Identification of microRNAs controlling hepatic mRNA levels for metabolic genes during the metabolic transition from embryonic to posthatch development in the chicken // *BMC Genomics*. 2017. V. 18. P. 687.
- Hinske L.C., França G.S., Torres H.A. et al. Galante PA<sup>6</sup>miRIAD-integrating microRNA inter- and intragenic data // *Database (Oxford)*. 2014. V. 6. pii: bau099. doi 10.1093/database/bau099
- Hirai H., Verma M., Watanabe S. MyoD regulates apoptosis of myoblasts through microRNA-mediated down-regulation of Pax3 // *J. Cell. Biol.* 2010. V. 191. P. 347–365.
- Huang H.Y., Liu R.R., Zhao G.P. et al. Integrated analysis of microRNA and mRNA expression profiles in abdominal adipose tissues in chickens // *Scientific Reports*. 2015. V. 5. Article number 16132. doi 10.1038/srep16132
- Huntzinger E., Izaurralde E. Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay // *Nat. Rev. Genet.* 2011. V. 12. P. 99–110.
- Jia X., H., Lin Q., Nie X. et al. Lamont a short insertion mutation disrupts genesis of miR-16 and causes increased body weight in domesticated chicken // *Sci. Rep.* 2016a. V. 6. P. 36433.
- Jia X., Lin H., Abdalla B.A. et al. Characterization of miR-206 promoter and its association with birthweight in chicken // *Int. J. Mol. Sci.* 2016b. V. 17. P. 559.
- Jia X., Nie Q., Zhang X. et al. Novel microRNA involved in host response to avian pathogenic *Escherichia coli* identified by deep sequencing and integration analysis // *Infect. Immun.* 2016c. V. 85: e00688–16. doi 10.1128/IAI.00688–16
- Jia X., Ouyang H., Abdalla B.A. et al. miR-16 controls myoblast proliferation and apoptosis through directly suppressing Bcl2 and FOXO1 activities // *Biochim. Biophys. Acta*. 2017. V. 1860. P. 674–684.
- Jia-Qi Chi, Man Teng, Zu-Hua Yu. et al. Marek's disease virus-encoded analog of microRNA-155 activates the oncogene c-Myc by targeting LTBP1 and suppressing the TGF- $\beta$  signaling pathway // *Virology*. 2015. V. 476. P. 72–84.
- Jeong W., Bae H., Lim W. et al. Differential expression of neuregulin 1 (NRG1) and candidate miRNA regulating NRG1 transcription in the chicken oviduct in response to hormonal changes // *J. Anim. Sci.* 2017a. V. 95. P. 3885–3904.
- Jeong W., Bae H., Lim W. et al. Dicer1, AGO3, and AGO4 microRNA machinery genes are differentially expressed in developing female reproductive organs and overexpressed in cancerous ovaries of chickens // *J. Anim. Sci.* 2017b. V. 95. P. 4857–4868.
- Kang L., Cui X., Zhang Y. et al. Identification of miRNAs associated with sexual maturity in chicken ovary by Illumina small RNA deep sequencing // *BMC Genomics*. 2013. V. 14. P. 352.
- Kang L., Yang C., Wu H. et al. miR-26a-5p regulates TNRC6A expression and facilitates theca cell proliferation in chicken ovarian follicles // *DNA and Cell Biology*. 2017. V. 36. https://doi.org/10.1089/dna.2017.3863.
- Kaya K.D., Karakulah G., Yalciner C.M. et al. mESAdb: microRNA expression and sequence analysis database // *Nucleic Acids Res.* 2011. V. 39.
- Kim J., Lim W., Bazer F.W. et al. Rapid communication: MicroRNA co-expression network reveals apoptosis in the reproductive tract during molting in laying hens // *J. Anim. Sci.* 2017. V. 95. P. 5100–5104.
- Krol J., Loedige I., Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay // *Nat. Rev. Genet.* 2010. V. 11. P. 597–610.
- Lagos-Quintana M., Reinhard R., Winfried L. et al. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs // *Science*. 2001. V. 294. P. 853–858.
- Lan X., Wang Y., Tian K. et al. Integrated host and viral transcriptome analyses reveal pathology and inflammatory response mechanisms to ALV-J injection in SPF chickens // *Sci. Rep.* 2017. V. 12. doi 10.1038/srep46156

- Lee R.C., Feinbaum R.L., Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14* // *Cell*. 1993. V. 75. P. 843–854.
- Lee S.I., Lee B.R., Hwang Y.S. et al. MicroRNA-mediated posttranscriptional regulation is required for maintaining undifferentiated properties of blastoderm and primordial germ cells in chickens // *PNAS*. 2011. V. 108. P. 10426–10431.
- Lee S.I., Jeon M.H., Kim J.S. et al. The *gga-let-7* family post-transcriptionally regulates *TGFBR1* and *LIN28B* during the differentiation process in early chick development // *Mol. Reprod*. 2015. V. 82. P. 967–975.
- Leonardo T.R., Schultheisz H.L., Lorin J.F. et al. The functions of microRNAs in pluripotency and reprogramming // *Nature Cell. Biol.* 2012. V. 14. P. 1114–1121.
- Lewis B.P., Burge C.B., Bartel D.P. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets // *Cell*. 2005. V. 120. P. 15–20.
- Li H., Zhang Z., Zhou X. Effects of microRNA-143 in the differentiation and proliferation of bovine intramuscular preadipocytes // *Mol. Biol. Rep.* 2011. V. 38. P. 4273–4280.
- Li H., Huiqing Shang, Dingming Shu et al. *gga-miR-375* plays a key role in tumorigenesis post subgroup J. avian leukosis virus infection // *PLoS One*. 2014a. V. 9. doi 10.1371/journal.pone.0090878
- Li Z., Zhang Y.P., Li Y., Zheng H.W. et al. Distinct expression pattern of miRNAs in Marek's disease virus infected-chicken splenic tumors and non-tumorous spleen tissues // *Res. Vet. Sci.* 2014b. V. 97. P. 156–161.
- Li A., Zhang J., Zhou Z. et al. Genome-scale identification of miRNA–mRNA and miRNA–lncRNA interactions in domestic animals // *Anim. Genet.* 2015. V. 46. P. 716–719.
- Li Z., Li Y., Xie X. et al. Systematic analysis on mRNA and microRNA expression in runting and stunting chickens // *PLoS One*. 2015. V. 10. doi 10.1371/journal.pone.0127342
- Li H., Wang S., Yan F. et al. Effect of polymorphism within miRNA-1606 gene on growth and carcass traits in chicken // *Gene*. 2015. V. 15. P. 8–12.
- Li Z., Zhang J., Su J. et al. MicroRNAs in the immune organs of chickens and ducks indicate divergence of immunity against H5N1 avian influenza // *FEBS Lett.* 2015b. V. 13. P. 419–425.
- Li P., Wenlei Fan, Qinghe Li. et al. Splenic microRNA expression profiles and integration analyses involved in host responses to *Salmonella enteritidis* infection in chickens // *Front Cell Infect Microbiol.* 2017. V. 24. P. 377.
- Li Z., Luo Q., Xu H. et al. MiR-34b-5p suppresses melanoma differentiation-associated gene 5 (MDA5) signaling pathway to promote avian leukosis virus subgroup J (ALV-J)-infected cells proliferation and ALV-J replication // *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2017. V. 30. P. 7–17.
- Li Z., Bahareldin Ali Abdalla, Ming Zheng et al. Systematic transcriptome-wide analysis of mRNA–miRNA interactions reveals the involvement of miR-142-5p and its target (FOXO3) in skeletal muscle growth in chickens // *Molecular Genetics and Genomics* 2018. V. 293. P. 69–80.
- Liu X.J., Kang X.T., Jiang R.R. et al. Sun assessment of correlation between pre-miRNA-1757 polymorphism and chicken performance traits // *Genetics and Molecular Research*. 2015. V. 14. P. 12184–12195.
- Luo W., Wu H., Ye Y. et al. The transient expression of miR-203 and its inhibiting effects on skeletal muscle cell proliferation and differentiation // *Cell Death Dis.* 2014. V. 17. doi 10.1038/cddis.2014.289
- Luo W., Li E., Nie Q. et al. Regulated by MYOD, MYOG and miR-140-3p, promotes chicken myoblast fusion // *Int. J. Mol. Sci.* 2015. V. 16. P. 26186–26201.
- Luo C., Sun L., Ma J. Association of single nucleotide polymorphisms in the microRNA locus miR-1596 with residual feed intake in chickens // *Anim. Genet.* 2015. V. 46. P. 265–271.
- Luo Wen, Shumao Lin, Guihuan Li et al. Integrative analyses of miRNA–mRNA Interactions Reveal *let-7b*, miR-128 and MAPK pathway involvement in muscle mass loss in sex-linked dwarf chickens // *Int. J. Mol. Sci.* 2016. V. 17. doi 10.3390/ijms17030276
- Ma Z., Li H., Zheng H. et al. MicroRNA-101-2-5p targets the ApoB gene in the liver of chicken (*Gallus gallus*) // *Genome*. 2017. V. 60. P. 673–678.
- Memczak S. Marvin Jens, Antigoni Elefsinioti et al. Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency // *Nature*. 2013. V. 495. P. 333–338.
- Morgan R., Amy Anderson, Erin Bernberg et al. Sequence conservation and differential expression of Marek's disease virus microRNAs // *J. Virol.* 2008. V. 82. P. 12213–12220.
- Naqvi Sahin, Daniel W. Bellott, Kathy S. et al. Conserved microRNA targeting reveals preexisting gene dosage sensitivities that shaped amniote sex chromosome evolution // *Genome Res.* 2018. V. 28. P. 474–483.
- O'Neill L.A., Sheedy F.J., McCoy C.E. MicroRNAs: the fine-tuners of Toll-like receptor signaling // *Nat. Rev. Immunol.* 2011. V. 11. P. 163–175.
- Ouyang H., Xiaomei He, Guihuan Li et al. Deep sequencing analysis of miRNA expression in breast muscle of fast-growing and slow-growing broilers // *Int. J. Mol. Sci.* 2015a. V. 17. P. 16242–16262.
- Ouyang W., Wang Y.S., Du X.N. et al. *gga-miR-9\** inhibits IFN production in antiviral innate immunity by targeting interferon regulatory factor 2 to promote IBDV replication // *Vet. Microbiol.* 2015b. V. 9. P. 41–49.
- Park C.Y., Choi Y.S., McManus M.T. Analysis of microRNA knockouts in mice // *Hum. Mol. Genet.* 2010. V. 19. P. 169–175.
- Peters L., Meister G. Argonaute proteins: mediators of RNA silencing // *Mol. Cell*. 2007. V. 8. P. 611–623.
- Rakoczy J., Fernandez-Valverde S.L., Glazov E.A. et al. MicroRNAs-140-5p/140-3p modulate Leydig cell numbers in the developing mouse testis // *Biol. Reprod.* 2013. V. 88. P. 143.
- Rao P.K., Kumar R.M., Farkhondeh M. et al. Myogenic factors that regulate expression of muscle-specific microRNAs // *PNAS*. 2006. V. 103. P. 8721–8726.
- Ren C., Yu M., Zhang Y. et al. Avian leukosis virus subgroup J promotes cell proliferation and cell cycle progression through miR-221 by targeting CDKN1B // *Virology*. 2018. V. 519. P. 121–130.

- Shan-He Wang, Shun-Hong Wang, Hong Li et al.* SNP in pre-miR-1666 decreases mature miRNA expression and is associated with chicken performance // *Genome*. 2015. V. 58. P. 81–90.
- Sarkies P., Miska E.A.* Molecular biology. Is there social RNA? // *Science*. 2013. V. 341. P. 467–468.
- Schnall-Levin M., Olivia S., Rissland, Wendy K. Johnston et al.* Unusually effective microRNA targeting within repeat-rich coding regions of mammalian mRNAs // *Genome Res*. 2011. V. 21. P. 1395–1403.
- Sonkoly E., Stahle M., Pivarsci A. et al.* MicroRNAs and immunity: novel players in the regulation of normal immune function and inflammation // *Semin. Cancer Biol*. 2008. V. 18. P. 131–140.
- Starega-Roslan J., Krzyzosiak W.J.* Analysis of microRNA length variety generated by recombinant human Dicer // *Methods Mol. Biol*. 2013. V. 936. P. 21–34.
- Teng M., Yu Z.H., Sun A.J. et al.* The significance of the individual Meq-clustered miRNAs of Marek's disease virus in oncogenesis // *J. Gen. Virol*. 2015. V. 96. P. 637–649.
- Trakooljul N., Hicks J., Liu H.C.* Identification of target genes and pathways associated with chicken microRNA miR-143 // *Anim. Genet*. 2010. V. 41. P. 357–364.
- Trontti K., Väänänen J., Sipilä T. et al.* Strong conservation of inbred mouse strain microRNA loci but broad variation in brain microRNAs due to RNA editing and isomiR expression // *RNA*. 2018. V. 24. P. 643–655.
- Truong A.D., Rengaraj D., Hong Y. et al.* Differentially expressed JAK-STAT signaling pathway genes and target microRNAs in the spleen of necrotic enteritis-afflicted chicken lines // *Res. Vet. Sci*. 2017a. V. 115. P. 235–243.
- Truong A.D., Rengaraj D., Hong Y. et al.* Analysis of JAK-STAT signaling pathway genes and their microRNAs in the intestinal mucosa of genetically disparate chicken lines induced with necrotic enteritis // *Vet. Immunol. Immunopathol*. 2017b. V. 187. P. 1–9.
- Wade Ben, Michelle Cummins, Anthony Keyburn et al.* Isolation and detection of microRNA from the egg of chickens // *BMC Research Notes*. 2016. V. 9. P. 283.
- Wang Y., Brahmakshatriya V., Zhu H. et al.* Identification of differentially expressed miRNAs in chicken lung and trachea with avian influenza virus infection by a deep sequencing approach // *BMC Genom*. 2009. V. 10. P. 512.
- Wang X., Shao F., Yu J.* MicroRNA-122 targets genes related to liver metabolism in chickens // *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol*. 2015. V. 184. P. 29–35.
- Wang W., Zhi-Qiang Du, Bohan Cheng et al.* Expression profiling of preadipocyte microRNAs by deep sequencing on chicken lines divergently selected for abdominal fatness // *PLoS One*. 2015. V. 10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117843>.
- Wang S., Zhang Y., Yuan X. et al.* Identification of differentially expressed microRNAs during preadipocyte differentiation in Chinese crested duck // *Gene*. 2018. V. 30. P. 126–132.
- Warnefors M., Katharina Mössinger, Jean Halbert et al.* Sex-biased microRNA expression in mammals and birds reveals underlying regulatory mechanisms and a role in dosage compensation // *Genome Res*. 2017. P. 1961–1973.
- Wei R., Ma X., Wang G. et al.* Synergistic inhibition of avian leukosis virus subgroup J replication by miRNA-embedded siRNA interference of double-target // *Virology*. 2015. V. 45. doi 10.1186/s12985-015-0277-5
- Wu Guixian, Yukai Qi, Xiaoyi Liu et al.* Cecal microRNAome response to *Salmonella enterica* serovar Enteritidis infection in White Leghorn Layer // *BMC Genomics*. 2017. V. 18. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3413-8>.
- Wu N., Gaur U., Zhu Q. et al.* Expressed microRNA associated with high rate of egg production in chicken ovarian follicles // *Anim. Genet*. 2017. V. 48. P. 205–216.
- Xu L., Guo Q., Chang G. et al.* Discovery of microRNAs during early spermatogenesis in chicken // *PLoS One*. 2017. V. 12. doi 10.1371/journal.pone.0177098
- Yang X., Gao W., Liu H. et al.* MicroRNA transcriptome analysis in chicken kidneys in response to differing virulent infectious bronchitis virus infections // *Archives of Virology*. 2017. V. 162. P. 3397–3405.
- Yao Yongxiu, Nair Venugopal.* Role of virus-encoded microRNAs in avian viral diseases // *Viruses*. 2014. V. 6. P. 1379–1394.
- Yu Z., Gao X., Liu C. et al.* Analysis of microRNA expression profile in specific pathogen-free chickens in response to reticuloendotheliosis virus infection // *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 2017. V. 101. P. 2767–2777.
- Yuan J., Chen S., Shi F. et al.* Genome-wide association study reveals putative role of gga-miR-15a in controlling feed conversion ratio in layer chickens // *BMC Genomics*. 2017. V. 6. P. 699.
- Zhang M., Li C.C., Li F. et al.* Estrogen promotes hepatic synthesis of long-chain polyunsaturated fatty acids by regulating ELOVL5 at post-transcriptional level in laying hens // *Int. J. Mol. Sci*. 2017. V. 18. doi 10.3390/ijms18071405
- Zhang X.F., Song H., Liu J. et al.* Identification and analysis of ZFPM2 as a target gene of miR-17-92 cluster in chicken // *Yi Chuan*. 2017. V. 20. P. 333–345.
- Zheng Yun, Shibeijiang, Yihui Zhang et al.* Detection of miR-33 expression and the verification of its target genes in the fatty liver of geese // *Int. J. Mol. Sci*. 2015. V. 16. P. 12737–12752.
- Zhao P., Xiu-Jie Li, Man Teng et al.* In vivo expression patterns of microRNAs of Gallid herpesvirus 2 (GaHV-2) during the virus life cycle and development of Marek's disease lymphomas // *Virus Genes*. 2015. V. 50. P. 245–252.
- Zhao Y., Wang Z., Hou Y. et al.* gga-miR-99a targets SMARCA5 to regulate *Mycoplasma gallisepticum* (HS strain) infection by depressing cell proliferation in chicken // *Gene*. 2017a. V. 627. P. 239–247.
- Zhao Y., Hou Y., Zhang K. et al.* Identification of differentially expressed miRNAs through high-throughput sequencing in the chicken lung in response to *Mycoplasma gallisepticum* HS // *Comp. Biochem. Physiol. Part. D Genomics. Proteomics*. 2017b. V. 22. P. 146–156.
- Zhenhui Li, Biao Chen, Min Feng et al.* MicroRNA-23b promotes avian leukosis virus subgroup J (ALV-J) replication by targeting IRF1 // *Sci. Rep*. 2015. V. 5. P. 10294. doi 10.1038/srep10294
- Zorc M., Omejec S., Tercic D. et al.* Catalog of genetic variants within mature microRNA seed regions in chicken Poultry // *Science*. 2015. V. 94. P. 2037–2040.

## The Role of miRNA in Differentiation, Cell Proliferation and Pathogenesis of Poultry Diseases

A. F. Yakovlev\*

*Russian Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding-Branch of the Ernst  
Federal Science Center for Animal Husbandry,  
Moscow shosse, 55a, St. Petersburg, Pushkin, 196601 Russia*

*\*e-mail: afyakov@mail.ru*

Received October 15, 2018; revised January 23, 2019; accepted January 25, 2019

To date, several non-coding RNAs are known, which play a prominent role in the processes of transcription, translation, and structural conformation of RNA. By binding miRNA to 3'-untranslated regions, mRNA regulates gene expression in animals through inhibition of translation initiation, elongation, and other mechanisms. There is evidence of the differential expression of miRNA that regulate transcription with the inclusion of several stages of myoblast proliferation, differentiation and apoptosis. The role of these molecules is significant in cell differentiation, proliferation, apoptosis and the genesis of tumors. Some miRNAs are known to target 100–200 genes. Polymorphisms of miRNA genes, especially in the competent regions of the genome, can be biomarkers for phenotypic traits important in the process of breeding birds. The findings confirm the key role of miRNA in controlling the metabolic switch that occurs between embryo development and chick hatching. Differentially expressed miRNAs and their possible target genes are included in egg production functions. The available miRNA data complement our understanding of the molecular genetic control underlying abdominal fat accumulation and myogenesis in chickens. Hundreds of differentially expressed miRNAs from individuals differing in body weight were found. A new understanding of the functions of miRNA during the rapid development of chicken gonads is being formed. Hundreds of miRNAs expressed by hypothalamic genes and involved in the initial phase of rapid gonad growth have been identified. There is increasingly clear evidence that miRNA play an important role in regulating the innate immune response and are important effectors in complex host-pathogen interaction networks for salmonellosis, Marek's disease, carcinogenic and other diseases. Many of the miRNAs are associated with cell proliferation, apoptosis and tumor formation. Bacterial pathogens are able to modulate the expression of the host miRNA and affect the regulation of miRNA and the outcome of infection. Several miRNAs are induced by TLR activation in innate immune cells and target the 3'-untranslated regions of the mRNA encoding the components of the TLR signaling system. Modern genome editing tools suggest an artificial increase in the diversity of miRNA and the increased use of miRNA for directional action. Determination of the structure of RNA, RNA-RNA, RNA-DNA and ribonucleoprotein complexes are becoming a rapidly developing area requiring the development of new technologies.

*Keywords:* bird, miRNA, differentiation, growth, phenotype, immune response, diseases