

## Abstract (PL)

**Tytuł pracy:** Wpływ wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w diecie na wątrobę świń poprzez analizę zróżnicowanej ekspresji genów oraz analizę sieci ważonej koekspresji genów danych miRNA u świń rasy polskiej białej zwisłouchej i krzyżówki polskiej białej zwisłouchej z duroc.

**Wprowadzenie:** Celem pracy było określenie wpływu kwasów tłuszczowych omega-6 i omega-3 na profil transkryptomu w wątrobie świń, oraz charakterystyka interakcji w ekspresji genów w wątrobie, określenie jej zależności od genotypu świń oraz jej wpływu na szlaki metaboliczne. Choć potencjalny zdrowotny wpływ WNKT został ustalony, to ich oddziaływanie na ekspresję genów na poziomie całego transkryptomu wciąż dostarczyć może nowych cennych informacji, dotyczących indukowanej przez nie regulacji ekspresji genów. Dla potrzeb niniejszych badań wykorzystano świnię zróżnicowaną pod względem rasy oraz zastosowano wzbogaconą i zróżnicowaną pod względem ilości i stosunku kwasów tłuszczowych omega-6 i omega-3 paszę. Po uboju na pobranych próbkach wątroby przeprowadzono sekwencjonowanie RNA, które miało na celu określenie globalnych zmian w ekspresji genów. Uzyskane wyniki posłużyły do bioinformatycznego opracowania wpływu diety omega-6 i omega-3 na transkryptom w tym koekspresję genów w wątrobie u świń, które to dostarczyło nowych cennych informacji charakteryzujących potencjalny wpływ wielonienasyconych kwasów tłuszczowych na prawidłowe funkcje wątroby a tym samym stan zdrowia zwierząt, oraz optymalizację żywienia i poprawę efektywności produkcji świń.

**Metodyka:** Na bazie danych pochodzących z sekwencjonowania micro RNA (miRNA-Seq) z wątroby świń rasy Polish Landrace (PL) (n=6) i Landrace x Duroc (PLxDuroc) (n=6) przeprowadzono analizę sieci ważonej koekspresji genów (WGCNA). Do sekwencjonowania miRNA-Seq wykorzystano platformę MiSeq Illumina (ICNT, UMK, Toruń), zmapowanie odczytów wykonano z wykorzystaniem oprogramowania miRDeep2 i bazy danych miRBase w wersji 22. W ramach analizy zróżnicowanej ekspresji miRNA (DE-miRNA) wykonano 6 porównań, pomiędzy dietami (kontrolna i wzbogacona w PUFA) i rasami (PL i PLxDuroc) identyfikującymi miRNA o zwiększonej i o zmniejszonej ekspresji w wątrobie świń w zależności od rasy i diety. Następnie za pomocą pakietu R/Bioconductor WGCNA wykonano analizę ważonej koekspresji genów. Natomiast przy użyciu oprogramowania ClueGO v 2.2.0 Cytoscape v.3.1.0 oraz bazy danych GO-BiologicalProcess-EBI-UniProt-GOA dla ludzkich genów, scharakteryzowano interakcje biologiczne między sieciami genów a szlakami metabolicznymi genów miRNA.

**Wyniki:** W ramach eksperymentu NGS z wykorzystaniem platformy MiSeq Illumina wygenerowano 12 plików fastq z sekwencjami miRNA w wątrobie świń. Długości odczytów wynosiły od 135 842 do 401 8483 w sekwencji. Najniższa i najwyższa zawartość GC wynosiła odpowiednio 46% i 49%. Wyniki mapowania ujawniły macierz 535 miRNA dla 12 próbek zmapowanych odczytów, które następnie wykorzystano w analizie DEGs i WGCNA transkryptomu wątroby świń rasy PL i mieszańców PLxDuroc. Badanie zróżnicowanej ekspresji miRNA zostało podzielone na cztery grupy, reprezentujące dietę kontrolną i diety wzbogacone w PUFA u świń PL oraz dietę kontrolną i diety wzbogacone w PUFA u świń PLxDuroc. Wykonano łącznie sześć porównań miRNA DEGs. W pierwszym porównaniu między dietą kontrolną a dietą PUFAs u świń PLxDuroc zidentyfikowano 1256 transkryptów miRNA o zróżnicowanej ekspresji, które były wspólne dla obu grup. Porównując dietę kontrolną i dietę PUFAs u świń PLxDuroc, zidentyfikowano 13 istotnie statystycznych ( $p < 0,05$ ) transkryptów miRNA o zróżnicowanej ekspresji, w tym 5 o zwiększonej ekspresji ( $\log_2FC > 2$ ) i 10 o obniżonej ( $\log_2FC > 5$ ). W drugim porównaniu między dietami kontrolnymi PL i PLxDuroc zidentyfikowano 1060 transkryptów miRNA o zróżnicowanej ekspresji, charakterystycznych dla rasy, które były wspólne dla obu grup. Porównując dietę kontrolną i dietę PUFAs u świń PLxDuroc, zidentyfikowano 10 istotnie statystycznych ( $p < 0,05$ ) transkryptów miRNA o zróżnicowanej ekspresji, w tym 21 o wyższej ekspresji ( $\log_2FC > 3$ ) i 31 o niższej ( $\log_2FC > 5$ ). W trzecim porównaniu między dietą kontrolną świń PLxDuroc a dietą PUFAs świń PL, zidentyfikowano 1380 transkryptów miRNA o zróżnicowanej ekspresji, które wspólnie występowały zarówno w diecie kontrolnej, jak i w diecie PUFAs dla świń PL i PLxDuroc. Porównując dietę kontrolną świń PLxDuroc z dietą PUFA u świń PL, zidentyfikowano 54 statystycznie istotne transkrypty miRNA o zróżnicowanej ekspresji ( $p < 0,05$ ), 29 o podwyższonej ( $\log_2FC > 2$ ) i 64 obniżonej ( $\log_2FC > 5$ ) ekspresji. W czwartym porównaniu między dietą kontrolną świń PL a dietą PUFAs świń PLxDuroc zidentyfikowano 696 transkryptów miRNA o zróżnicowanej ekspresji, które wspólnie występowały zarówno w diecie kontrolnej, jak i w diecie wzbogaconej o PUFA dla świń PL i PLxDuroc. Porównując dietę kontrolną świń PL z dietą wzbogaconą o PUFA u świń PLxDuroc, zidentyfikowano 56 statystycznie istotnych transkryptów miRNA o zróżnicowanej ekspresji ( $p < 0,05$ ), 5 o podwyższonej ( $\log_2FC > 2$ ) i 10 o obniżonej ( $\log_2FC > 5$ ) ekspresji. W piątym porównaniu między dietami wzbogaconymi w PUFA świń PL i PLxDuroc zidentyfikowano 986 transkryptów miRNA o zróżnicowanej ekspresji, które wspólnie występowały w dietach PUFA zarówno u świń rasy PL i PLxDuroc. Porównując diety wzbogacone w PUFA pomiędzy świnią PL vs PLxDuroc, 27 statystycznie istotnych transkryptów o



zróźnicowanej ekspresji zostało zidentyfikowanych ( $p < 0,05$ ), 5 o podwyższonej ekspresji ( $\log_2FC > 2$ ) i 10 o obniżonej ( $\log_2FC > 5$ ) ekspresji. W szóstym porównaniu diety kontrolnej z dietą wzbogaconą w PUFA u świń PL, zidentyfikowano 1019 transkryptów miRNA o zróźnicowanej ekspresji, które występowały w diecie kontrolnej i diecie wzbogaconej w PUFA u świń PL. Porównując dietę kontrolną z PUFA u świń PL, zidentyfikowano 34 statystycznie istotne transkrypty miRNA o zróźnicowanej ekspresji ( $p < 0,05$ ), 29 o podwyższonej ( $\log_2FC > 2$ ) i 27 o obniżonej ( $\log_2FC > 5$ ) ekspresji.

W analizie WGCNA, odczyty dla 94 miRNA zostały znormalizowane przy użyciu funkcji „varianceStabilizingTransformation” z biblioteki DESeq2, a zmienna moc progowa została ustalona na poziomie  $\beta=18$  w celu skonstruowania sieci genów typu Topological Overlap Matrix (TOM). Na podstawie TOM, miRNA ulegające koekspresji o najwyższych zależnościach, zostały zgrupowane w moduły, które reprezentowane są przez kolory. W analizie WGCNA zidentyfikowano łącznie 9 modułów związanych z cechami, które są istotnie związane z badanymi cechami fenotypowymi. Ponadto, analiza wewnątrz modułowa dla MEM (miRNA w modułach o danym kolorze) zidentyfikowała cztery cechy fenotypowe istotnie zależne od diety PUFA u świń PL i PLxDuroc: kolor mięsa (a\*), grubość tłuszczu podskórnego w łopatce, przewodność 24 godziny post mortem (PE24) i popiół. Z cechami istotnie statystycznie, skorelowana jest inna liczba wykrytych modułów (9, 7, 2, 8). Mapowanie targetów miRNA ujawniło, że zidentyfikowane 44 miRNA (z 94 miRNA) miały 6719 statystycznie targety z wynikiem docelowym  $>90$ . Największą liczbę targetów w ssc-miR-30e-5p (520) w module o kolorze magenty, następnie ssc-miR-30b-5p (518) w module o kolorze różowym i ssc-miR-30c-5p (518) w module o kolorze żółtym. Najmniej genów docelowych znaleziono dla ssc-miR-126-3p i ssc-miR-423-3p (po 1) w modułach o kolorach fioletowym i brązowym.

Na podstawie zidentyfikowanych modułów istotnie skorelowanych z cechami fenotypowymi przeprowadzono analizę GO/pathway z wykorzystaniem bazy GO-BiologicalProcess-EBI-UniProt-GOA dla genów ludzkich. Analiza ClueGO zidentyfikowała najwyższą liczbę funkcji GO/szlaków powiązanych z targetami modułów miRNA w module o kolorze zielonym (90). Drugą najwyższą liczbę funkcji GO/szlaków wykryto dla targetów miRNA modułu żółtego. Najniższą liczbę funkcji GO/szlaków powiązanych z targetami, wykryto dla modułów: fioletowego (16), turkusowego (14), brązowego (6) i magenty (4).

**Wnioski:** Opracowana w trakcie badań baza danych profilu ekspresji genów miRNA wątroby świń może zostać wykorzystana do dalszych badań nad zależnościami pomiędzy ekspresją miRNA a cechami użytkowymi świń. Przeprowadzone badania wskazały na zróźnicowaną ekspresję miRNA pomiędzy typami diety i rasami. Ponadto, moduły/grupy zidentyfikowane w analizie WGCNA wskazują na silne powiązania pomiędzy ekspresją miRNA. miRNA będące węzłami klastrów można uznać za kandydujące geny miRNA związane z PE24, barwą mięsa, grubością podskórnego tłuszczu łopatki i popiołem. Dodatkowo, miRNA ulegające koekspresji wpływają pośrednio na inne szlaki funkcjonalne, poprzez regulację ich targetów. Zidentyfikowane geny docelowe dla klastrów miRNA odgrywają znaczącą rolę w takich funkcjach biologicznych, jak i) rozwój układu mięśniowego, ii) procesy rozwoju komórki, iii) procesy rozwoju organizmu, iv) procesy metaboliczne, v) rozwój tkanki mięśniowej.

**Słowa kluczowe:** kwasy tłuszczowe, PUFA, świnie, wątroba, sekwencjonowanie nowej generacji, sekwencjonowanie RNA, transkryptom, miRNA, DEG, WGCNA, bioinformatyka

Mateusz Sankajko  
25.03.23